



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

JOÃO DANILLO MOURA SOARES

**“A FAMÍLIA GÊNICA DA GLUTAMINA SINTETASE EM
Coffea arabica: ASPECTOS MOLECULARES”**

Londrina
2015



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agronômico do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

JOÃO DANILLO MOURA SOARES

**“A FAMÍLIA GÊNICA DA GLUTAMINA SINTETASE EM
Coffea arabica: ASPECTOS MOLECULARES”**

JOÃO DANILLO MOURA SOARES

**“A FAMÍLIA GÊNICA DA GLUTAMINA SINTETASE EM
Coffea arabica: ASPECTOS MOLECULARES”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Douglas Silva Domingues

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S676f Soares, João Danillo Moura.

A família gênica da glutamina sintetase em *Coffea arabica* :
aspectos moleculares / João Danillo Moura Soares. –
Londrina, 2015.
91 f. : il.

Orientador: Douglas Silva Domingues.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) –
Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa
de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Genética vegetal – Teses. 2. Café – Biologia molecular – Teses. 3.
Enzimas – Teses. 4. Nitrogênio na agricultura – Teses. 5. Plantas – Efeito do
stress – Teses. I. Domingues, Douglas Silva. II. Universidade Estadual de
Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CDU 581.169

JOÃO DANILLO MOURA SOARES

“A FAMÍLIA GÊNICA DA GLUTAMINA SINTETASE EM *Coffea arabica*: ASPECTOS MOLECULARES”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Douglas Silva Domingues
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Profa. Dra. Maria Magdalena Rossi
Universidade de São Paulo – USP

Prof. Dr. Laurival Antonio Vilas Boas
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 27 de março de 2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as oportunidades concedidas;

Aos meus pais, João e Sueli, pelo carinho, compreensão e suporte em todos os momentos;

Ao orientador Douglas Silva Domingues, pelos ensinamentos durante esses anos, pela confiança e amizade;

Aos doutores Luis Filipe Protasio Pereira e Luiz Gonzaga Esteves Vieira, pelas importantes contribuições para aperfeiçoamento desse trabalho;

A doutora Andrea Akemi, pelas sugestões, ajuda e amizade;

A Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, por proporcionar meios para que esse projeto se tornasse possível;

Ao Instituto Agrônomo do Paraná, pela disponibilização de sua infraestrutura;

Aos amigos Tiago B. dos Santos e Viviane Yumi Baba, pela amizade e auxílio na execução dos experimentos;

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Biotecnologia Vegetal do IAPAR, pela amizade e companheirismo na convivência diária;

E a todos que de alguma maneira contribuíram direta ou indiretamente para a realização e desenvolvimento deste trabalho. Muito Obrigado!

SOARES, João Danillo Moura. **A família gênica da glutamina sintetase em *coffea arabica*: aspectos moleculares**. 2015. 91f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

O nitrogênio (N) é o nutriente mineral requerido em grandes quantidades pelas plantas. É um elemento fundamental para o desenvolvimento e crescimento vegetal, e necessário para a síntese de diversas biomoléculas, como proteínas, ácidos nucleicos, clorofila, bases nitrogenadas, entre outras. O metabolismo de N pode ser dividido em três fases principais: 1) absorção; 2) assimilação e 3) remobilização e reutilização, as quais envolvem a participação de diversas enzimas. A glutamina sintetase (GS) é considerada uma enzima chave no metabolismo de compostos nitrogenados, pois é responsável pela assimilação de amônio inorgânico em aminoácidos, que serão doadores de fontes nitrogenadas para os diversos processos celulares. Esta enzima é codificada por uma pequena família gênica, com isoformas citosólicas e plastidiais. No entanto, existem poucos estudos sobre os aspectos moleculares e genômicos de GS em espécies lenhosas, mais especialmente no cafeeiro e sobre seu papel no desenvolvimento de frutos. Dessa forma, o objetivo desse trabalho é identificar e caracterizar os membros constituintes da família gênica de GS em dicotiledôneas lenhosas, e em *Coffea arabica* avaliar o perfil transcricional desses genes em resposta a estresses abióticos. Foram utilizadas plantas das cultivares IAPAR 59 e Catuaí Vermelho cultivadas sob altas temperaturas e altas concentrações de NaCl ou supressão de N, bem como frutos dessas cultivares em 3 fases de desenvolvimento. Avaliou-se os níveis transcricionais por meio de qPCR bem como foram realizadas quantificações de atividade enzimática de GS, níveis de clorofila, perda de eletrólitos e concentração de proteínas totais. A atividade transcricional da família gênica GS foi influenciada por estresses abióticos e ao longo do desenvolvimento de frutos e os genótipos analisados não respondem igualmente a tais condições. A atividade enzimática de GS sofreu variações menos pronunciadas que padrão transcricional e picos no perfil transcricional não estão diretamente associados com maior atividade enzimática. Esses fatos sugerem a ocorrência de outros mecanismos de regulação de GS, além do transcricional. A participação dessa família gênica no processo de enchimento de grãos pode ser notada tanto nos níveis de expressão quanto na atividade enzimática, com aumento em função do estágio de desenvolvimento, principalmente em endosperma. Esse trabalho fornece um painel detalhado para o entendimento do mecanismo de assimilação de N em diversas condições e em diferentes órgãos de *C. arabica*.

Palavras-chave: Estresses abióticos. Frutos. Assimilação de nitrogênio.

SOARES, João Danillo Moura. **The glutamine synthetase gene family in *coffea arabica*: molecular approaches**. 2015. 91p. **Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.**

ABSTRACT

Nitrogen (N) is one of the most important mineral nutrient for plants. It is an essential element for plant growth and development and it is important to synthesis of several biomolecules, such as proteins, nucleotides and chlorophyll. N metabolism can be divided in three steps: 1) absorption, 2) assimilation and 3) remobilization/reutilization, which involve several enzymes. Glutamine synthetase (GS) is a key enzyme in metabolism of nitrogen compounds, assimilating inorganic ammonium in aminoacids, which will be the N donor for all cellular processes. However, there are few studies about molecular and genomics approaches of GS in woody eudicots, including coffee trees. In this way, the aim of this work is identify and characterize GS gene family in woody eudicots, and to evaluate the transcriptional pattern in during different abiotic stresses and along fruit development in *Coffea arabica*. *C. arabica* cv. IAPAR 59 and Catuaí Vermelho plants were submitted to heat stress, salinity or nitrogen starvation, and fruits were collected in three development stages. Transcriptional pattern of GS genes were evaluated by qPCR, and we also evaluated enzymatic activity, chlorophyll levels, electrolyte leakage and protein content. GS genes were differentially modulated by abiotic stresses, and fruit development stage; genotypes displayed different patterns in response to stress. Transcriptional pattern did not followed enzymatic activity. This suggest a that GS gene family in coffee trees is modulated by other processes than transcriptional regulation. During fruit development, GS transcriptional profile and enzymatic activity have a crescent activity, mainly in endosperm This study contributes to improve knowledge about nitrogen assimilation in several conditions and in different organs of *C. arabica*.

Keywords: Abiotic stress. Fruits. Nitrogen assimilation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1

Figure 1: Phylogenetic tree of cytosolic glutamine synthetase with schematic representation of gene structure.....	22
Figure 2: Phylogenetic tree of plastidic glutamine synthetase with schematic representation of gene structure.....	23
Figure 3: Regulatory elements in the 5` upstream region of cytosolic isoforms.....	25
Figure 4: Regulatory elements in the 5` upstream region of plastidial isoforms.....	26
Figure 5: Genevestigator expression map of GS gene family over <i>A. thaliana</i> development.....	27
Figure 6: Genevestigator expression map of GS gene family over <i>S. lycopersicum</i> development.....	27
Figure 7: Transcriptional profile of cytosolic GS genes in <i>Citrus sinensis</i> leaves 6 hours after inoculation with <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. citri (Xac) and <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. aurantifolii (Xaa).....	29
Figure 8: Transcriptional profile of cytosolic GS genes in <i>Citrus sinensis</i> after inoculation with <i>Candidatus liberibacter asiaticus</i>	29
Figure 9: Transcriptional profile of cytosolic GS genes in pulp, skin and seed of <i>Vitis vinifera</i> subjected to drought stress.....	18
Figure 10: Transcriptional profile of cytosolic GS genes in berries of <i>Vitis vinifera</i> subjected to high temperature.....	30

Capítulo 2

Figura 1: História evolutiva do alotetraplóide <i>Coffea arabica</i>	39
Figura 2: Modelo simplificado da assimilação primária e reciclagem do nitrogênio em células vegetais.	45
Figura 3: Representação esquemática do desenvolvimento do estresse térmico em plantas de <i>C. arabica</i>	53

Figura 4: Representação esquemática para o desenvolvimento de supressão de nitrogênio em plantas de <i>C. arabica</i>	54
Figura 5: Árvore filogenética de GS citosólica.	62
Figura 6: Árvore São mostrados valores de bootstrap acima de 50%.	63
Figura 7: Padrão transcricional dos genes de GS em folhas de duas cultivares de <i>Coffea arabica</i> o submetidas a altas concentrações de NaCl.....	65
Figura 8: Padrão transcricional de GS em folhas e raízes de duas cultivares de <i>Coffea arabica</i> submetidas a altas temperaturas	66
Figura 9: Padrão transcricional de GS em folhas e raízes de duas cultivares de <i>Coffea arabica</i> sob supressão de nitrogênio..	67
Figura 10: Padrão transcricional dos genes de GS em diferentes tecidos de frutos de <i>Coffea arabica</i> em diferentes fases de desenvolvimento.....	68
Figura 11: RT-PCR semi-quantitativo dos genes de GS nos diferentes tecidos do cafeeiro: flor, botão flora, ramo novo e ramo velho.	69
Figura 12: Atividade <i>in vitro</i> de Glutamina Sintetase em folhas de dois genótipos de <i>C. arabica</i> expostos altas concentrações de NaCl.....	70
Figura 13: Atividade <i>in vitro</i> de Glutamina Sintetase em folhas e raízes de dois genótipos de <i>C. arabica</i> expostos altas temperaturas..	71
Figura 14: Atividade <i>in vitro</i> de Glutamina Sintetase em folhas e raízes de dois genótipos de <i>C. arabica</i> sob supressão de N..	71
Figura 15: Atividade <i>in vitro</i> de Glutamina Sintetase em diferentes tecidos de frutos de <i>Coffea arabica</i> em diferentes fases de desenvolvimento.....	73
Figura 16: Quantificação de proteínas totais em folhas de dois genótipos de <i>C. arabica</i> submetidos a altas concentrações de NaCl..	74
Figura 17: Quantificação de proteínas totais em folhas e raízes de dois genótipos de <i>C. arabica</i> expostos a altas temperaturas.....	75
Figura 18: Quantificação de proteínas totais em folhas e raízes de dois genótipos de <i>C. arabica</i> sob supressão de nitrogênio.....	76
Figura 19: Quantificação de proteínas totais em diferentes tecidos de frutos de <i>Coffea arabica</i> em diferentes fases de desenvolvimento.	77

Figura 20: Condutividade elétrica (%) em discos foliares de duas cultivares de <i>C. arabica</i> submetidas a estresse salino.	78
Figura 21: Análise de Western blot para polipeptídios de GS1 e GS2 em folhas de <i>C. arabica</i> submetidas a altas concentrações de salinidade.	78
Figura 22: Análise de Western blot para polipeptídios de GS1 e GS2 em folhas e raízes de <i>C. arabica</i> submetidas a altas temperaturas.	79
Figura 23: Análise de Western blot para polipeptídios de GS1 e GS2 em folhas e raízes de <i>C. arabica</i> com ausência de fontes nitrogenadas.	79
Figura 24: Análise de Western blot para polipeptídios de GS1 e GS2 ao longo do desenvolvimento de frutos de <i>C. arabica</i> com ausência de fontes nitrogenadas.	80

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Table 1: Overall features of GS genes identified in the present study. The sequence name is the same used for Phytozome. P: Plastidic; C: Cytosolic and M: Mitochondria	20
--	----

Capítulo 2

Tabela 1: Primers selecionados para caracterização transcricional e eficiência de amplificação.....	56
Tabela 2: Primers selecionados para amplificação de genes inteiros de GS.....	56
Tabela 3: Sequências de GS identificadas em <i>C. arabica</i> . pI (ponto isoelétrico), MW (peso molecular).....	60
Tabela 4: Sequenciamento dos fragmentos gerados durante caracterização transcricional de genes de GS em duas cultivares de <i>C. arabica</i>	65

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1.	CAPÍTULO 1: ARTIGO	14
1.1.1.	Introduction	15
1.1.2.	Material and Methods	17
1.1.3.	Results	19
1.1.4.	Discussion	30
1.1.5.	Conclusion	32
1.1.6.	Reference	33
1.2.	Capítulo 2: A Família Gênica da Glutamina Sintetase em <i>Coffea arabica</i> : Aspectos Moleculares	37
1.2.1.	O café: Aspectos econômicos	37
1.2.2.	<i>Coffea arabica</i> : aspectos botânicos	37
1.2.3.	Nitrogênio	41
2.	JUSTIFICATIVA	49
3.	OBJETIVOS	50
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1.	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE GS EM <i>COFFEA ARABICA</i>	51
4.2.	ANÁLISE FILOGENÉTICA	51
4.3.	MATERIAL VEGETAL	52
4.3.1.	Experimento de Estresse Salino	52
4.3.2.	Experimento de Estresse Térmico	53
4.3.3.	Supressão de Nitrogênio	53
4.3.4.	Análise do Desenvolvimento de Frutos	54
4.4.	EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA	55
4.5.	SELEÇÃO DE PRIMERS	55
4.6.	PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL	56
4.7.	RT-PCR SEMI-QUANTITATIVO	57
4.8.	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	58
4.8.1	Atividade Enzimática de Glutamina Sintetase	58

4.8.2. Proteínas Totais.....	58
4.8.3. Vazamento de Eletrólitos	59
4.9. Análises Estatísticas	59
4.10. Western Blot.....	59
5. RESULTADOS	60
5.1. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GS	60
5.2. ÁRVORE FILOGENÉTICA.....	61
5.3. ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE GLUTAMINA SINTETASE.....	63
5.3.1 Estresse Salino	64
5.3.2. Estresse Térmico	65
5.3.3. Supressão de Nitrogênio	66
5.3.4. Frutos.....	67
5.3.5. Padrão Transcricional em Botão Floral, Flor e Ramos.....	68
5.4. ANÁLISES BIOQUÍMICAS	69
5.4.1. Atividade <i>in vitro</i> da Glutamina Sintetase	69
5.4.2. Concentração de Proteínas Totais	73
5.4.4. Vazamento de Eletrólitos	77
5.5. Quantificação Proteica de GS.....	78
5.5.1. Estresse Salino	78
5.5.2. Estresse Térmico.....	79
5.5.3. Supressão de Nitrogênio	79
5.5.4. Frutos.....	80
6. DISCUSSÃO	81
7. CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

INTRODUÇÃO

A dissertação foi dividida em dois capítulos: o primeiro se refere a um artigo de revisão a ser submetido para a revista *Trees* e aborda aspectos genômicos e estruturais sobre a família gênica da glutamina sintetase em espécies dicotiledôneas lenhosas. O segundo capítulo trata sobre a caracterização molecular dessa família gênica em *Coffea arabica*.

1.1. CAPÍTULO 1: ARTIGO

Glutamine Synthetase (GS) in eudicots: a genome-wide analysis in woody plants

João Danillo Moura Soares^{1,2}, Laurival Antônio Villas-Boas², Halley Caixeta de Oliveira³, Luiz Filipe Protasio Pereira^{1,2,4}, Douglas Silva Domingues^{1,2*}

¹Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Instituto Agronômico do Paraná, Londrina, PR, Brazil, CP 86047-902.

²Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil, CP 86057-970.

³Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil, CP 86057-970.

⁴Embrapa Café, Brasília-DF, Brazil, CP 70770-901.

*Corresponding author at doug@iapar.br

Abstract: Glutamine synthetase (GS) is a key enzyme in nitrogen metabolism, which catalyzes assimilation of inorganic ammonium into organic compounds, thus affecting nitrogen use efficiency in plants. There are two main GS isoforms in angiosperms: a cytosolic form and a plastidial one. Several studies have investigated this gene family in model plants, grasses and legumes, with most focusing on their biotechnological potential or in response in stress conditions, but little is known about molecular aspects in non-leguminous dicot species. In this paper, we used public genomic and transcriptomic data to characterize GS gene family in 11 woody eudicot species, including transcriptional patterns during several development stages in two model genomes and two woody plant species, and the *cis* regulatory elements in ten woody plant species. GS has a variable copy number in woody plants, including two plastidial members in four species. Total exon number ranges from 12 to 14 in chloroplastic forms and from 9 to 13 in cytosolic ones. We also found *cis* elements responsive to abiotic stress (ABRE) and involved in transcription (Poly dA-dT) in

upstream regions. Our data provide an important overview about genomic structure of an important enzyme in nitrogen assimilation in eudicot woody plants.

Keywords: Nitrogen use efficiency, trees, mineral nutrition, N assimilation, genomic characterization.

1.1.1. Introduction

Nitrogen (N) is one of the most important limiting factors for plant growth and development, since it is the mineral nutrient that is required in the greatest quantity for plant tissues and it is constituent of essential biomolecules, such as nucleotides, proteins and chlorophyll (Kraiser *et al.*, 2011). Consequently, the use of nitrogen fertilizers has been increasing in recent years, aiming to improve crop yield. However, in many agricultural systems, N fertilization can represent the highest input cost; in addition, the excess of N compounds can affect air, water, and soil quality (Betti *et al.*, 2012). Given that, it is important to understand how plants absorb, assimilate and remobilize the different N forms, in order to avoid excessive use of N fertilizer. These processes affect plant nitrogen use efficiency (NUE), which is given by total biomass or grain yield in relation to total N fertilizer applied (Xu *et al.*, 2012). NUE can change in function of different plant physiological aspects and by fertilizer characteristics. An important step in NUE is assimilation, the mechanism by which the N acquired by plants is converted into organic molecules, thus contributing to total biomass or grain yield (Xu *et al.*, 2012). The major inorganic forms of N available in soils are nitrate and ammonium, and their concentrations are usually a limiting factor for plant development and yield (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010).

Nitrate must be reduced by a series of enzymes before its assimilation. The first step is catalyzed by Nitrate Reductase (NR; EC 1.6.6.1), a cytosolic enzyme that promotes nitrate reduction to nitrite. Nitrite is toxic for plant cells, and it is reduced to ammonium in plastids by Nitrite Reductase (NiR; EC 1.7.7.1), the second enzyme in this pathway. The ammonium resulting from nitrite reduction, as well as that provided from other sources (direct uptake by roots and photorespiration), is assimilated into organic compounds by the glutamine synthetase/glutamine-2-oxoglutarate aminotransferase (GS/GOGAT) cycle (Lea and Mifflin, 1974; Wang *et al.*, 2013). The glutamine and glutamate produced by these reactions act as N donor for

biosynthesis of several N compounds. Glutamine Synthetase (GS; E.C 6.3.1.2) is a key enzyme in nitrogen assimilation that catalyzes the ATP dependent addition of ammonium into glutamate to produce glutamine, being at the center of nitrogen flow in plants (Castro-Rodríguez *et al.*, 2011). There are three major GS types: I, II and III - the latter not found in plants (Swarbreck *et al.*, 2011). GSI is found in several plant genomes, but a recent study in *Arabidopsis thaliana* (Doskočilová *et al.*, 2011) showed that this gene is a fusion between a nodulin and a GS isoform, resulting in a larger protein of approximately 840 amino acids, which lost its enzymatic activity and might be involved in root morphogenesis. GSII is the most commonly studied GS type and in higher plants it is classified in two main isoforms: a cytosolic form (GS1), and a plastidial one (GS2). GS1 is encoded by a variable number of genes, according to the species, and acts mainly assimilating ammonium from external sources, biological nitrogen fixation or during remobilization of N forms (Thomsen *et al.*, 2014). The expression pattern revealed that cytosolic isoform is predominantly expressed in non-photosynthetic tissues, without overlapping functions (Yajun *et al.*, 2008). Until recently, only one GS2 gene was found to encode the plastidial isoform in plants; subsequently, a second gene expressed during seed development was discovered in *Medicago truncatula* (Seabra *et al.*, 2010) and in *Populus trichocarpa*, which has a complete duplicated GS gene family (Castro-Rodríguez *et al.*, 2011). Their expression is preferential in mesophyll cells and participates in the assimilation of the ammonium generated during photorespiration or nitrate reduction (Wang *et al.*, 2013).

Given the importance of glutamine synthetase in nitrogen metabolism, the most recent studies have focused on biotechnological potential of this enzyme or its characterization in stress conditions. These studies are mostly performed in model plants, i.e *Arabidopsis thaliana* (Peng *et al.*, 2014) and rice (Singh and Ghosh, 2013), legumes (Seabra *et al.*, 2010), or grasses (de Matos Nogueira *et al.*, 2005; Goodall *et al.* 2013). However, little is known about molecular aspects of GS in eudicot woody plants. In this context, the aim of this work is to do a genome-wide characterization of members from the GSII gene family in 11 non-leguminous woody dicots and analyze their phylogenetic relationship, transcriptional pattern and promoter elements.

1.1.2. Material and Methods

1.1.2.1 Identification and characterization of GS genes in woody plants

To identify GS orthologs in different plant genomes, we used some of the woody species selected by Mochida *et al.* (2013) together with other trees with agronomic relevance, in a total of 10 species: *Malus domestica*, *Prunus persica*, *Theobroma cacao*, *Eucalyptus grandis*, *Citrus sinensis*, *Citrus clementina*, *Jatropha curcas*, *Vitis vinifera*, *Manihot esculenta*, *Ricinus communis*. We also included GS gene family described in *Populus* (Castro-Rodriguez *et al.*, 2011) and GS sequences from the fruit-model *Solanum lycopersicum*. *Arabidopsis* GS protein sequences (Ishiyama *et al.*, 2004) were used as queries to search in plant genomes by TBLASTN in Phytozome (www.phytozome.net) for all species in Table 1, in exception of *Jatropha curcas*, whose genome is available in <http://www.kazusa.or.jp/jatropha/>. Only hits with e- values below e-20 and that present the conserved domain of GS were kept for further analyses. Molecular weight and isoelectric point were calculated in the ExPasy Proteomics Server (Gasteiger *et al.*, 2003) and cellular location deduced using TargetP 1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2000).

1.1.2.2. Phylogenetic analysis

To investigate the evolutionary relationship among woody plants, we obtained two phylogenetic trees, one for each GS isoform. The coding sequence of each gene was aligned with algorithm Muscle (Edgar, 2004). Additionally, sequences of model species were included. The resultant alignment was used to perform a test to choose the best substitution model for each set of sequences and to generate the phylogenetic tree by Maximum Likelihood method, with a 1,000 bootstrap replicates. These analyses were carried out in MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013).

1.1.2.3. Exon-intron structure

The genomic, transcript, amino acids and coding sequences were downloaded and used for further characterization. Transcript and genomic sequences were aligned

using bl2seq (Tatusova *et al.*, 1999) in order to infer intron and exon regions, which were drawn using Fancy Gene v1.4 (Rambaldi and Ciccarelli, 2009).

1.1.2.4. Transcriptional and posttranscriptional regulation

Regulation of transcriptional pattern is essential in a gene family composed of several genes expressed in different conditions. To identify regulatory elements (RE) involved in GS expression, a 1500bp-upstream ATG codon as selected to analyze in NsiteM (Solovyev *et al.*, 2010). We analyzed GS1 and GS2 upstream sequences separately. This tool has a database composed of several well-characterized REs in plants. We only considered results found in plus strand, present in 50% or more sequences and with similarity levels higher than 60% between RE in the database and motif. Since GS genes can also be regulated by post-transcriptional modifications, we also investigated microRNA targeting and protein phosphorylation. The search for microRNA targeting was carried out in miRBase (Griffiths-Jones *et al.*, 2006) against a plant database. Phosphorylation residue analysis was carried out in NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-2.0/>), considering serine, tyrosine and threonine as possible candidates.

1.1.2.5. Expression analysis

For GS, most transcriptional studies focus on response to stress and participation of enzymes in crop production or yield (Lee *et al.*, 2013; Bao *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2014). Here, in order to gain further insight into GS transcriptional activity throughout developmental stages, we used public microarray data available in GENEVESTIGATOR (Zimmermann *et al.*, 2005) to analyze the expression profile of GS genes in *A. thaliana* and *S. lycopersicum*, species that have the most complete dataset for several conditions. Only four genes of tomatoes were found in the dataset and the gene identified as Les.2973.1.S1_at is the Solyc11g011380.1.1 of Table 1. We also analyzed the GS transcriptional pattern in two fruit trees (*Citrus sinensis* and *Vitis vinifera*) using microarray data from PLEXdb (Dash *et al.*, 2012) for available GS genes under biotic and abiotic stress conditions. Only cytosolic isoforms were available in microarray chips. Results are expressed as signal intensity in Affymetrix

microarray chip, with MAS5.0 normalization. Differences among treatments were analyzed by one-way ANOVA using Tukey's multiple range test at $P < 0.05$.

1.1.3. Results

1.1.3.1. Glutamine synthetase gene family

The GS gene family has two distinct isoforms, which display specific characteristics, mainly observed in molecular weight and isoelectric point. All identified sequences presented two specific conserved domains of the GS family: glutamine synthetase catalytic domain (PF00120) and glutamine synthetase beta-grasp domain (PF03951) (Table 1). Differences in molecular weight and isoelectric point among isoforms were observed in all identified sequences. Molecular weight (MW) of cytosolic isoforms ranged from around 38 to 42 kDa and plastidial presented higher predicted MW (around 50 kDa). PI differs between cytosolic and plastidial isoforms: GS2 has a higher PI (Table 1). In *Citrus sinensis*, *Theobroma cacao* and *Prunus persica* we did not find any plastidial isoform; however, in *Vitis vinifera*, *Manihot esculenta*, *Citrus clementina* and *Eucalyptus grandis*, we verified the occurrence of two genes for GS2. Furthermore, a sequence from *M. esculenta* (cassava4.1_008086m) demonstrated all characteristics of a plastidial isoform: isoelectric point, molecular weight, conserved domains and sequence length. However, the subcellular location indicated a mitochondrial enzyme.

Table 1: Overall features of GS genes identified in the present study. The sequence name is the same used for Phytozome. P: Plastidic; C: Cytosolic and M: Mitochondria.

GS Gene Sequences	PI	MW (kDa)	Conserved Domains	Subcellular Location	Phosphorilation Residues
<i>Vitis vinifera</i>					
GSVIVT01011072001	7.11	47.67	Beta Grasp / Catalytic Domain	P	23
GSVIVT01017868001	7.58	47.91	Beta Grasp / Catalytic Domain	P	26
GSVIVT01008483001	5.79	39.19	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	22
GSVIVT01012040001	5.4	39.02	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	23
GSVIVT01030697001	5.69	39.3	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	24
<i>Solanum lycopersicum</i>					
Solyc01g080280.2.1	6.29	47.53	Beta Grasp / Catalytic Domain	P	21
Solyc11g011380.1.1 (Les.2973)	5.49	38.62	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	21
Solyc05g051250.2.1	5.79	38.92	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	23
Solyc04g014510.2.1	5.61	39.21	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	21
Solyc12g041870.1.1	5.65	39.72	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	14
<i>Citrus clementina</i>					
Ciclev10011785m	8.32	47.47	Beta Grasp / Catalytic Domain	P	29
Ciclev10005007m	6.29	48.86	Beta Grasp / Catalytic Domain	P	25
Ciclev10031939m	5.78	39.2	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	21
<i>Citrus sinensis</i>					
orange1.1g018434m	5.73	39.18	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	21
orange1.1g018391m	5.78	39.21	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	22
<i>Eucalyptus grandis</i>					
Eucgr.L02175	8.34	48.79	Beta Grasp / Catalytic Domain	P	23
Eucgr.B01163	7.57	47.93	Beta Grasp / Catalytic Domain	P	21
Eucgr.J01606	5.95	39.33	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	23
Eucgr.G02570	6.16	39.32	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	22
Eucgr.F02872	5.78	39.25	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	16
Eucgr.K02283.1	5.33	38.03	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	20
<i>Manihot esculenta</i>					
cassava4.1_008019m	6.53	47.89	Beta Grasp / Catalytic Domain	P	22
cassava4.1_008086m	6.27	47.18	Beta Grasp / Catalytic Domain	M	25
cassava4.1_010581m	5.73	39.28	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	25
cassava4.1_010597m	5.37	39.21	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	22
<i>Theobroma cacao</i>					
Thecc1EG007743t1	6.02	39.12	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	21
Thecc1EG012973t1	5.79	39.35	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	22
Thecc1EG017447t1	5.79	39.29	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	22
<i>Prunus persica</i>					
ppa007772m	5.87	38.97	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	21
ppa007771m	6.19	38.9	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	21
ppa007728m	5.78	39.45	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	18
<i>Ricinus communis</i>					
29726.m003921	6.68	47.84	Beta Grasp / Catalytic Domain	P	23
29675.m000392	6.12	39.2	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	25
<i>Jatropha curcas</i>					
Jcr4S00007.130	8.11	46.76	Beta Grasp / Catalytic Domain	P	25
Jcr4S00507.10	6.03	39.2	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	22
Jcr4S01376.50	5.87	39.08	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	22
Jcr4S06509.10	5.49	39.28	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	20
<i>Malus domestica</i>					
MDC008520.339	7.05	46.89	Beta Grasp / Catalytic Domain	P	25
MDC009950.283	6.03	41.17	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	21
MDC021549.89	5.55	38.89	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	19
MDC020415.152	6.03	39.67	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	23
MDC020415.111	5.87	38.4	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	22
MDC018099.109	9.08	43.52	Beta Grasp / Catalytic Domain	C	18

1.1.3.2. Phylogenetic analysis

The origin of glutamine synthetase has been estimated to be 2500 Mya (Pesole *et al.*, 1995), before the divergence between eukaryotes and prokaryotes (Kuamada *et al.*, 1993), thus constituting one of the oldest duplicated genes. In plants, two types of GS have arisen by a duplication event. This fact is supported by the presence of GSI

in higher plants (Mathis *et al.*, 2000) and it probably occurred before the separation between monocots and eudicots (Bernard *et al.*, 2008).

Phylogenetic reconstruction shows a cluster splitting monocots and eudicots for both isoforms. The evolutionary relationship observed for *GS1* is similar to that proposed for angiosperm diversification (Fig 1). The plastidial isoform of GS has been used for phylogeny analysis in several situations (Doyle *et al.*, 2003; Yockteng *et al.*, 2004), mainly because it was believed that only a single gene encoded this enzyme. However, as shown in Figure 2, some species have more than one gene of *GS2* and it occurs in different angiosperm families. In this way, phylogenetic analysis based only on *GS2* genes require more careful study to confirm the number of genes in each species and the accuracy of their phylogeny tree.

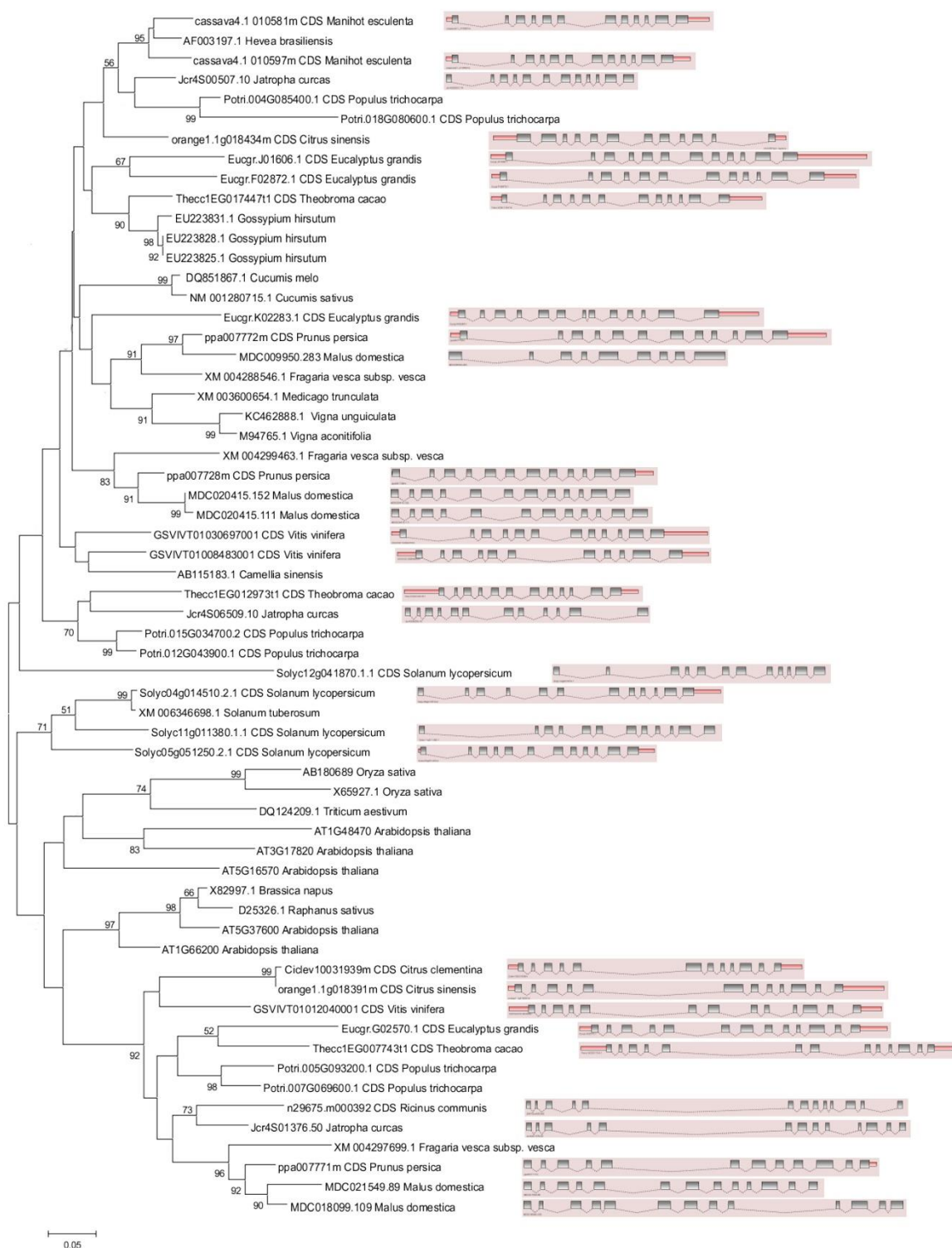


Figure 1: Phylogenetic tree of cytosolic glutamine synthetase with schematic representation of gene structure. The tree was inferred using the Maximum Likelihood method based on the General Time Reversible model. A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites. The analysis involved 61 nucleotide sequences. There were a total of 394 positions in the final dataset. Bootstrap values over 50% are shown.

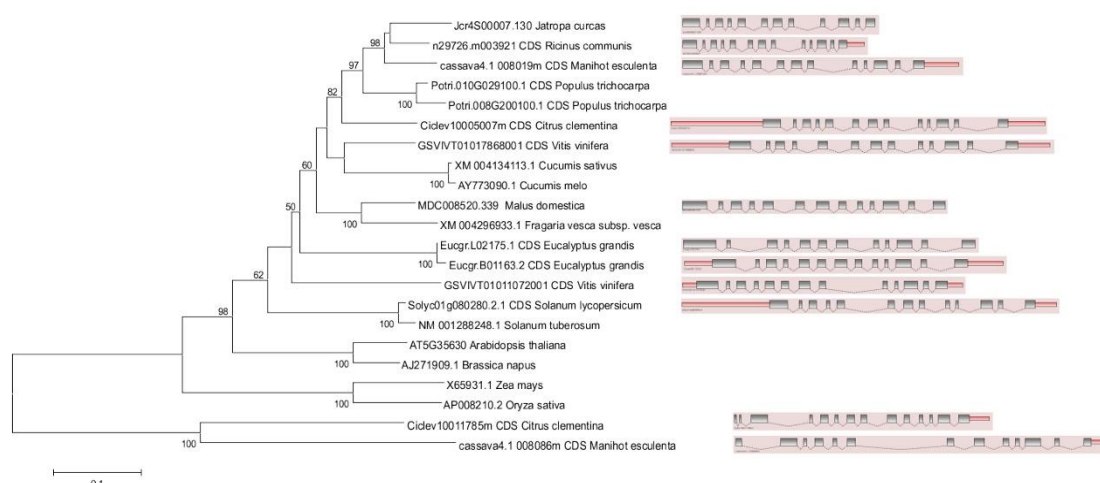


Figure 2: Phylogenetic tree of plastidic glutamine synthetase with schematic representation of gene structure. The tree was inferred using the Maximum Likelihood method based on the General Time Reversible model. A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites. The analysis involved 22 nucleotide sequences. There were a total of 990 positions in the final dataset. Bootstrap values over 50% are shown.

1.1.3.3. GS gene structure

Exon numbers were relatively constant in both isoforms: in *GS1*, exons ranged from 9 to 13; and in *GS2*, from 12 to 13. Exon distribution was similar in all genes analyzed, with most variations observed in intron length (Fig.1 and 2).

1.1.3.4. Regulatory and posttranscriptional elements

Poly(dA:dT) was the most commonly found RE in regulatory regions of cytosolic isoforms (Fig. 3). This element is found only in eukaryote genomes and plays a fundamental role in transcription. Segal and Widom (2009) suggest that the function of this element is to resist the incorporation into nucleosomes. The presence of poly(dA:dT) regions in a sequence reduces nucleosome stability, thus, promoting gene activation.

In plastidial isoforms, the CT element is observed in various sequences (Fig. 4). In a study in *Pinus sylvestris* (Gómez-Maldonado *et al.*, 2004), it was demonstrated that this element is essential for transcription of *GS1a*. The second element more

commonly found in *GS2* is poly(dA:dT), which suggests the complex regulation involved in the *GS* gene family. Other elements were also observed, most of them involved in transcriptional regulation.

Among all identified genes, we did not find targets that can suffer regulation by miRNA. However, these proteins are highly sensitive to phosphorylation modifications. The number of phosphorylation residues found for *GS* genes in woody species range from 21 to 29 in plastidial isoforms, and from 14 to 25 for cytosolic enzymes. In barley, a similar pattern was found, with 14 to 24 residues in four genes of *GS1* (Thomsen *et al.*, 2014). Phosphorylation of *GS* is catalyzed by a protein kinase in the presence of both ATP and Mg^{2+} . After this step, phosphorylated enzymes present an increase in protection against protein degradation and regulation of reversible phosphorylation is given by light/dark interactions and influenced by the ATP/AMP ratio. Phosphorylated *GS* could interact with 14-3-3 proteins and increase their activity (Finnemann *et al.*, 2000).

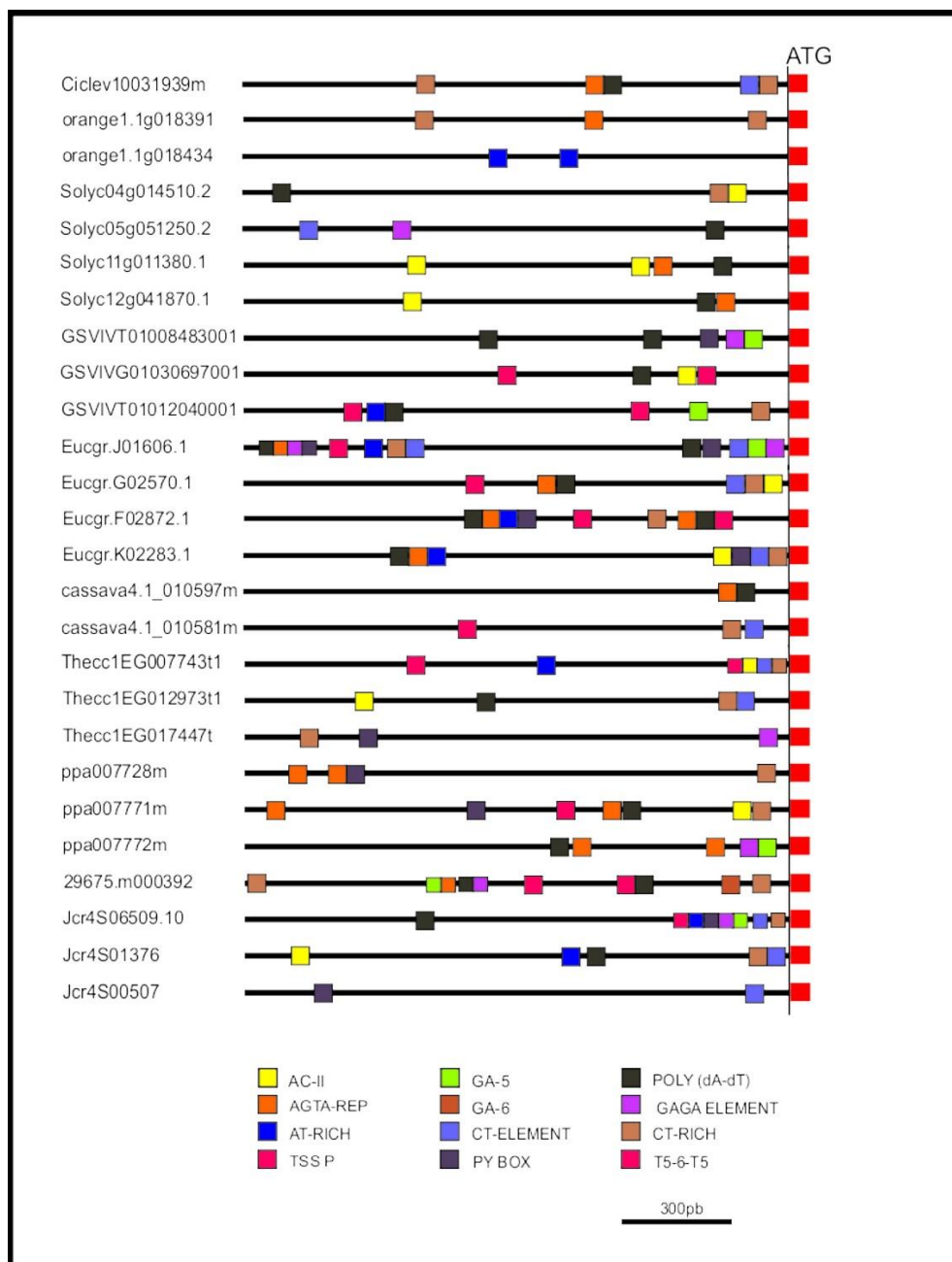


Figure 3: Regulatory elements in the 5' upstream region of cytosolic isoforms. Elements are represented by colored box. The ATG position is marked on the right.

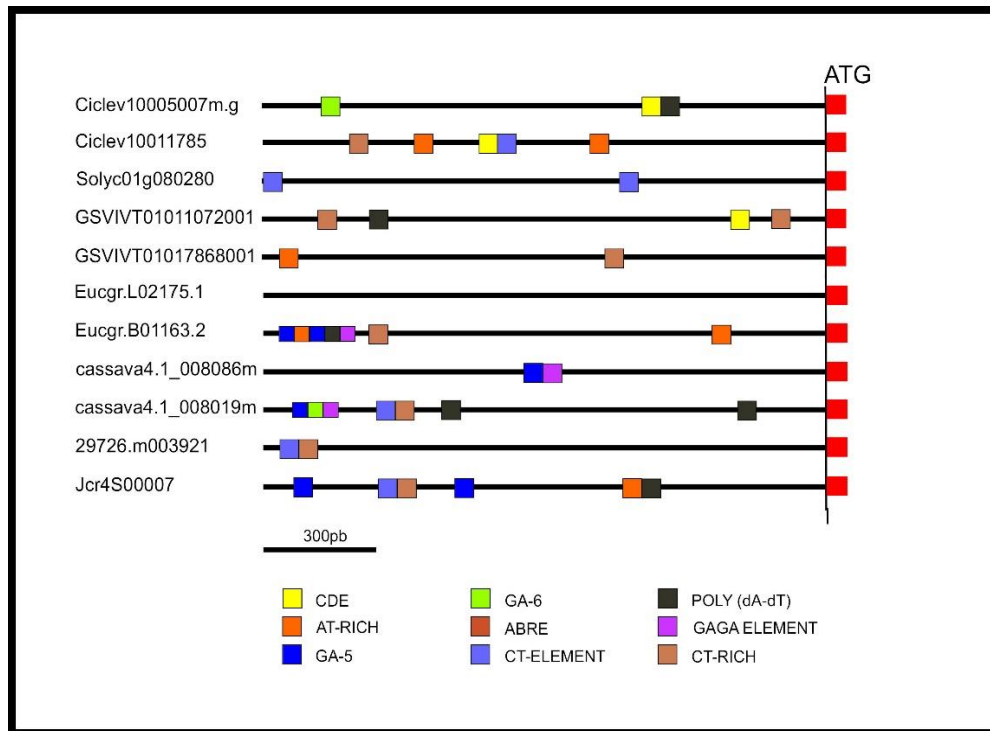


Figure 4: Regulatory elements in the 5' upstream region of plastidial isoforms. Elements are represented by colored box. The ATG position is marked on the right.

1.1.3.5. GS gene expression under stress conditions and in different development stages

Transcriptional pattern of GS expression can change in different situations and in response to several stress. As shown in Figure 5, the GS transcriptional profile of *A. thaliana* exhibits striking changes in the senescence stage: the plastidial isoform (AT5G35630) shows a considerable decrease in expression, while a cytosolic isoform (AT1G48470) enhances their levels. Other genes maintain a constant pattern throughout all development stages, changing only in senescence. Cytosolic enzymes (AT5G37600, AT1G66200 and AT3G17820) show a higher level of expression in initial stages, followed by a notable decrease in senescence. AT5G16570 presents a relatively constant level in all stages (Fig. 5). Tomatoes display a similar pattern: GS2 (Solyc01g080280.2) also shows a decrease in transcripts during fruit development. Among the cytosolic isoforms, transcripts increase during development and fruit ripening (Les.2973.1.S_at), and another with a lower (Solyc04g014510.2) decrease when a plant produces the first fruits (Fig. 6).

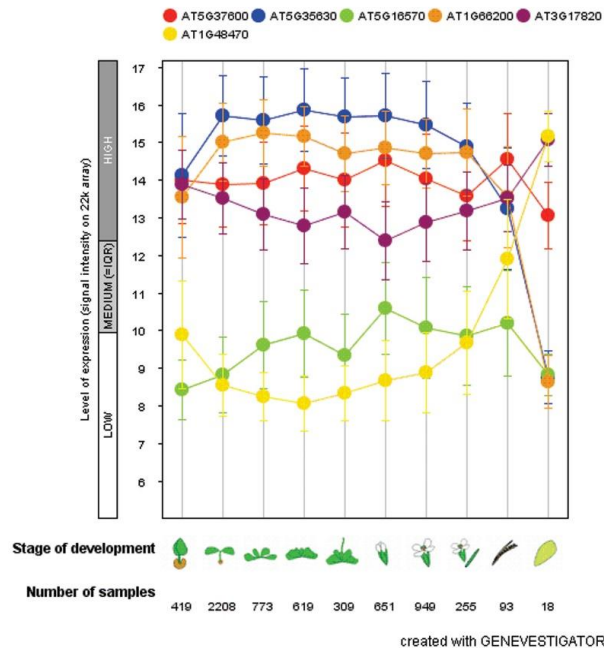


Figure 5: Genevestigator expression map of GS gene family over *A. thaliana* development. Growth stages from seed germination to senescence are shown. Error bars represent standard error. Plastidial: AT5G35630. Cytosolic: AT5G37600, AT5G16570, AT1G66200, AT3G17820, AT1G48470

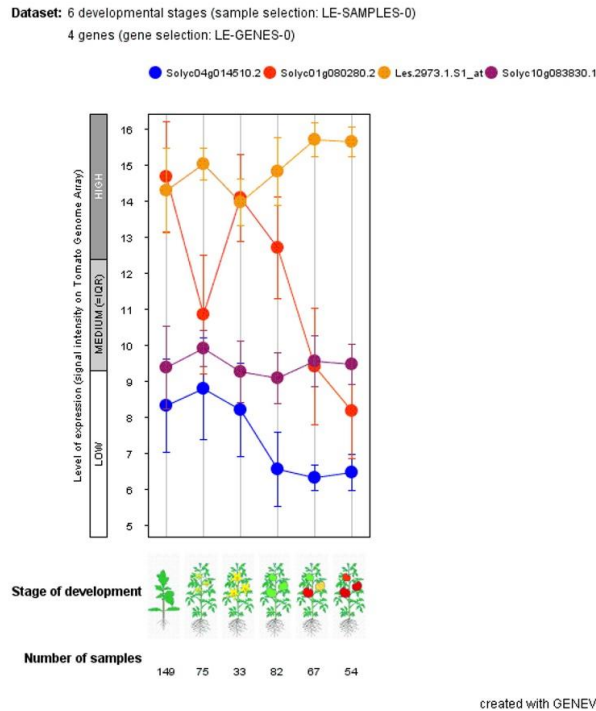


Figure 6: Genevestigator expression map of GS gene family over *S. lycopersicum* development. Growth stages from seed germination to senescence are shown. Error

brs represent standard error. Plastidial: Solyc01g080280.2.1 Cytosolic: Les.2973, Solyc04g014510.2.1, Solyc10g083380.1.

In citrus, two biotic stress experiments were selected, with different pathogens. In the study carried out with *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (*Xac*) and *Xanthomonas axonopodis* pv. aurantifolii (*Xaa*), both pathogens promote an increase in transcriptional levels of GS genes 6 hours after inoculation (Fig. 7). After infection by *Candidatus liberibacter asiaticus* there are no statistically significant changes among treatments. As proposed by Pageau *et al.* (2006) pathogens can interact with plant metabolism to direct N compounds for their own growth. Furthermore, plants may remobilize their nutrients to uninfected organs, which could explain the difference in transcriptional pattern of GS genes. Each GS gene have a particular transcriptional pattern: orange1.1g018391m is highly expressed in both experiments, while orange1.1g018434m revealed a lower transcriptional pattern in both situations (Fig. 8).

In grapevine, we selected experiments of berries under hydric stress and high temperatures. In water deficit stress, GSVIVT01030697001 presented the lowest values in pulp, skin and seeds. GSVIVT01008483001 is not affected by abiotic stresses. However, GSVIVT01012040001 is downregulated in pulp and upregulated in seeds during drought-stress (Fig. 9). In high temperatures, GSVIVT01030697001 again presented the lowest expression among cytosolic isoforms. GSVIVT01008483001 was upregulated in 6 weeks after stress (Fig. 10), while GSVIVT01012040001 has no statistically significant changes during stress. Recently, GS activity was detected in fruits and their protein profile in leaves is different according to developmental stage (Famiani *et al.*, 2014).

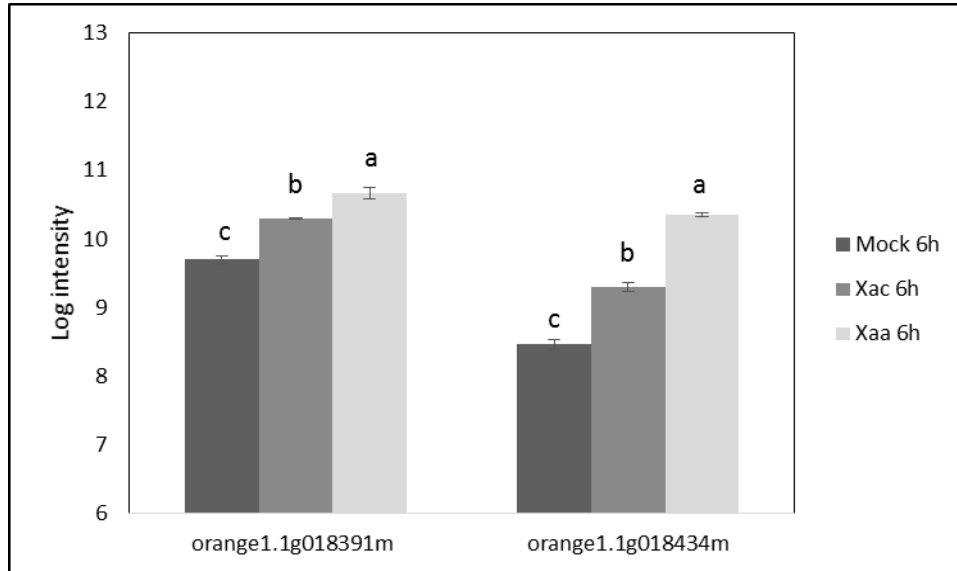


Figure 7: Transcriptional profile of cytosolic GS genes in *Citrus sinensis* leaves 6 hours after inoculation with *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (Xaa). Values are presented as mean \pm SE. Lowercase letters refer to the gene comparison in different treatments. The data were retrieved from PLEXdb database.

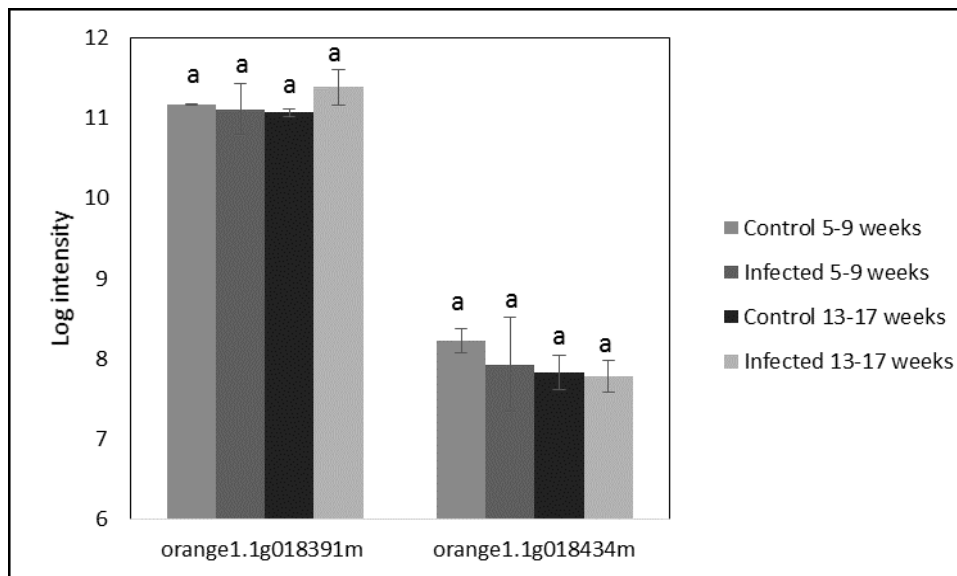


Figure 8: Transcriptional profile of cytosolic GS genes in *Citrus sinensis* after inoculation with *Candidatus liberibacter asiaticus*. Values are presented as mean \pm SE. Lowercase letters refer to the gene comparison in different treatments. The data were retrieved from PLEXdb database.

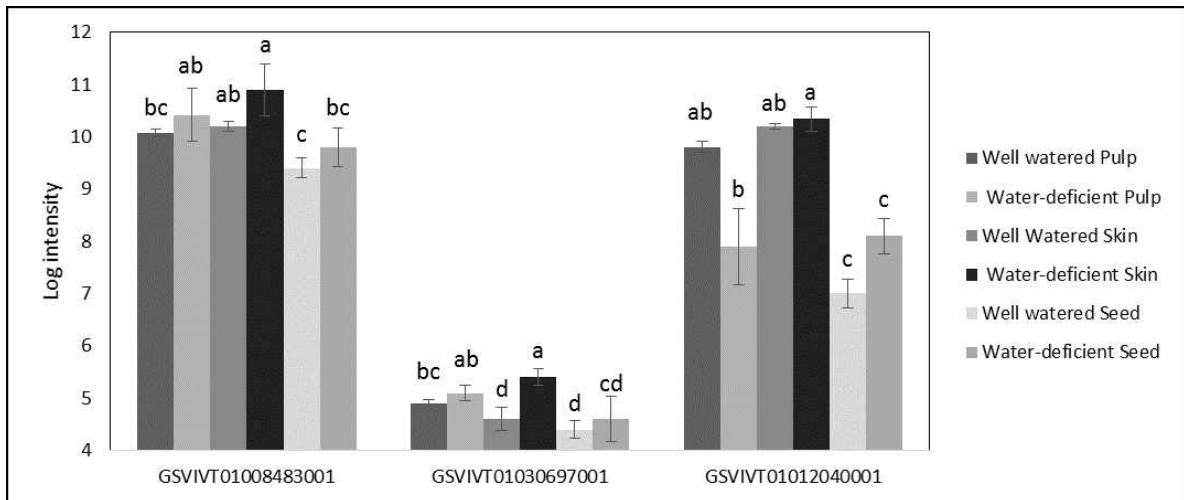


Figure 9: Transcriptional profile of cytosolic GS genes berries of *Vitis vinifera* subjected to drought stress. Values are presented as mean \pm SE. Lowercase letters refer to the gene comparison in different treatments. The data were retrieved from PLEXdb database.

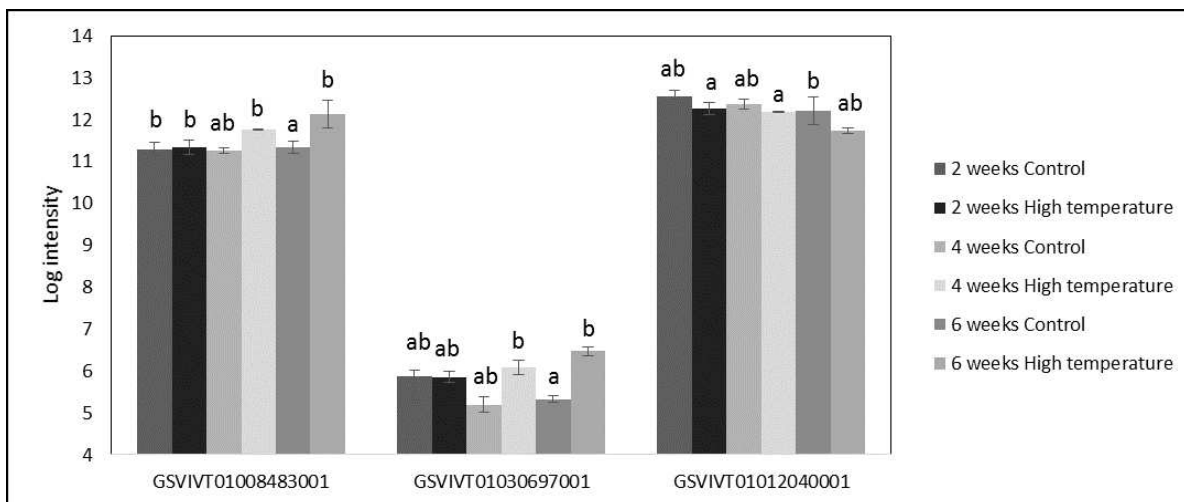


Figure 10: Transcriptional profile of cytosolic GS genes berries of *Vitis vinifera* subjected to high temperature. Values are presented as mean \pm SE. Lowercase letters refer to the gene comparison in different treatments. The data were retrieved from in PLEXdb database.

1.1.4. Discussion

Glutamine synthetase present a complex and particular gene family. We found and characterize GS members in several plant species. Results indicated a clear distinction between cytosolic and chloroplastic isoforms and are consistent with

another species, *i. e.*, barley (Goodall *et al.*, 2013), and *Populus trichocarpa* (Castro-Rodríguez *et al.*, 2011), whose cytosolic GS usually ranges from 38.97 to 39.44 kDa, with pI from 5.14 to 5.95 and open reading frame composed of 356 to 358 amino acids; plastidial GS range from 47.74 to 47.89 kDa, with a PI of 6.48 and most proteins contains 432 amino acids. Most papers describe the GS gene family with only one gene for the plastidial isoform. In recent years, a second plastidial gene was described, first in germinating seeds of *Medicago trunculata* (Seabra *et al.*, 2010) and then in *Populus* (Castro-Rodríguez *et al.*, 2011). Based on results obtained, occurrence of a second gene coding for GS2 may be more common in plants than described until now, suggesting that GS2 evolution can be much more complex than originally described (Clarkson *et al.*, 2010). Another important point is the existence of GS dual targets to mitochondria and chloroplasts. It was described in *A. thaliana* (Taira *et al.*, 2004), where the same gene is targeted to both organelles. In this case, cassava has two GS2: one targeted to chloroplast, and one targeted to mitochondria. During photorespiration, high quantities of ammonium are released in mitochondria, thus the occurrence of GS in this organelle would contribute for localized assimilation of this cation.

Phylogenetic analysis and gene structure shows a high level of conservation among GS in all species. Principal differences are observed mainly in introns regions.

Transcriptional pattern in plants under stress conditions and different stages of development shows a separation among genes in functional organization according to plant stage. Depending to the plant status, different GS members are active. Arabidopsis modulate transcriptional activity of GS mainly in senescence, where GS2 decrease their levels and a cytosolic isoform (AT1G48470) increase. In senescent organs, hydrolytic enzymes are activated, leading to the breakdown of several molecules, including, proteins, and chlorophyll. Ammonium is then released and reassimilated for the use in biosynthetic pathways in non-senescent organs. Miflin and Habash (2002) suggest a fundamental role of GS1 in senescent tissues, participating in nitrogen recycling and remobilization. In tomato, alterations occurs mainly in fruit formation. Fruit development and maturation are complex processes that demand several changes, in molecular and biochemical patterns. In this step nutrients are remobilized to enable the development of new structures (Scarpeci *et al.*, 2007). Therefore, GS2 levels usually decrease and GS1 levels, which acts in nitrogen remobilization, greatly increase. This pattern was observed in tomato plants

under high nutrition (Scarpeci *et al.*, 2007), where only *GS1* is found in red fruits. To keep this transcriptional pattern, great number of regulatory elements were found, mainly involved in transcription. GS is an enzyme involved in basic metabolism, which can explain great number of elements related to transcriptional steps. In addition, there are posttranslational regulation that can modulate enzymatic activity by phosphorylation.

1.1.5. Conclusion

Several features of glutamine synthetase are still poorly understood. There is a lack of information on molecular and genomic aspects of GS in several species, including woody eudicot species. This study presents an *in silico* approach to investigate gene characteristics of GS members in woody eudicot plants. We used public data from sequencing and microarrays to understand GS genomic and transcriptional features in woody eudicot plants. GS genes are present in a variable number among species, and this difference is given mainly by variations of cytosolic enzymes. Despite divergences, GS are evolutionary conserved enzymes playing a fundamental role in plant metabolism. Thus, all genes have similar exon numbers, similar disposition and present all of the expected characteristics. However, differing from what is described in the literature, several species have a second plastidial enzyme. We found more than one gene in four of eleven genomes analyzed, but until now this event was molecularly described only in two species as notable exceptions. Furthermore, in one of these species, one *GS2* gene is apparently targeted to mitochondria. Despite that these data are only based on *in silico* analysis and require further molecular studies, our observations of the dataset open new perspectives regarding GS distribution in plants.

The GS gene family has a complex transcriptional pattern, since it is composed of a variable number of genes and each one presents a specific role, with non-overlapping function. Thus, a great number of regulatory elements were found, acting in transcriptional and translational levels. Phosphorylation is an important mechanism for regulating enzymatic activity, and our analysis indicated that phosphorylation sites are very frequent among GS genes, reinforcing the idea of expression regulation at a post-translational level.

As a result of the development of new sequencing techniques, data available for different species in diverse conditions have been dramatically enhancing our understanding of biological processes. These data are important tools that could help further characterize many genes with biotechnological interest, including GS.

1.1.6. Reference

1. Kraiser T, Gras DE, Gutiérrez AG, González B, Gutiérrez RA (2011) A holistic view of nitrogen acquisition in plants. *J Exp Bot* 62:1455-1466
2. Betti, M., García-Calderón, M., Pérez-Delgado, C. M., Credali, A., Estivill, G., Galván, F., ... & Márquez, A. J. (2012). Glutamine synthetase in legumes: recent advances in enzyme structure and functional genomics. *International journal of molecular sciences*, 13(7), 7994-8024.
3. Xu, G., Fan, X., & Miller, A. J. (2012). Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual review of plant biology*, 63, 153-182.
4. Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., & Suzuki, A. (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany*, 105(7), 1141-1157.
5. Lea, P. J., & Mifflin, B. J. (1974). Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature*, 251, 614-616.
6. Wang, M., Shen, Q., Xu, G., & Guo, S. (2013). New insight into the strategy for nitrogen metabolism in plant cells. *International review of cell and molecular biology*, 310, 1-37.
7. Castro-Rodríguez, V., García-Gutiérrez, A., Canales, J., Avila, C., Kirby, E. G., & Cánovas, F. M. (2011). The glutamine synthetase gene family in *Populus*. *BMC plant biology*, 11(1), 119.
8. Swarbreck S. M., Defoin-Platel, M., Hindle, M., Saqi, M., Habash, D. Z. (2011) New perspectives on glutamine synthetase in grasses. *Journal of Experimental Botany*, 62(4), 1511-1522.
9. Doskočilová, A., Plíhal, O., Volc, J., Chumová, J., Kourová, H., Halada, P., ... & Binarová, P. (2011). A nodulin/glutamine synthetase-like fusion protein is implicated in the regulation of root morphogenesis and in signaling triggered by flagellin. *Planta*, 234(3), 459-476.
10. Thomsen, H. C., Eriksson, D., Møller, I. S., & Schjoerring, J. K. (2014). Cytosolic glutamine synthetase: a target for improvement of crop nitrogen use efficiency?. *Trends in plant science*, 19(10), 656-663.

11. Yajun, H., Wangzhen, G., Xinlian, S., & Tianzhen, Z. (2008). Molecular cloning and characterization of a cytosolic glutamine synthetase gene, a fiber strength-associated gene in cotton. *Planta*, 228(3), 473-483.
12. Seabra, A. R., Vieira, C. P., Cullimore, J. V., & Carvalho, H. G. (2010). *Medicago truncatula* contains a second gene encoding a plastid located glutamine synthetase exclusively expressed in developing seeds. *BMC plant biology*, 10(1), 183.
13. Peng, Y., Zhang, X., Takano, T., Liu, S., & Bu, Y. (2014). Functional Comparative Study of *Arabidopsis thaliana* Glutamine Synthetase gene GLN1; 1 and GLN1; 5 in Response to Salt Stress during Germination. *Molecular Soil Biology*, 5(5).
14. Singh, K. K., & Ghosh, S. (2013). Regulation of glutamine synthetase isoforms in two differentially drought-tolerant rice (*Oryza sativa* L.) cultivars under water deficit conditions. *Plant cell reports*, 32(2), 183-193.
15. de Matos Nogueira, E., Olivares, F. L., Japiassu, J. C., Vilar, C., Vinagre, F., Baldani, J. I., & Silva Hemerly, A. (2005). Characterization of glutamine synthetase genes in sugarcane genotypes with different rates of biological nitrogen fixation. *Plant Science*, 169(5), 819-832.
16. Goodall, A. J., Kumar, P., & Tobin, A. K. (2013). Identification and expression analyses of cytosolic glutamine synthetase genes in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant and Cell Physiology*, 54(4), 492-505.
17. Mochida K, Yoshida T, Sakurai T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LS. (2013). TreeTFDB: an integrative database of the transcription factors from six economically important tree crops for functional predictions and comparative and functional genomics. *DNA Research*, 20:151-162.
18. Ishiyama, K., Inoue, E., Watanabe-Takahashi, A., Obara, M., Yamaya, T., & Takahashi, H. (2004). Kinetic properties and ammonium-dependent regulation of cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(16), 16598-16605.
19. Tatusova, T. A., & Madden, T. L. (1999). BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS microbiology letters*, 174(2), 247-250.
20. Rambaldi, D., & Ciccarelli, F. D. (2009). FancyGene: dynamic visualization of gene structures and protein domain architectures on genomic loci. *Bioinformatics*, 25(17), 2281-2282.
21. Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic acids research*, 31(13), 3784-3788.
22. Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., & von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of molecular biology*, 300(4), 1005-1016.

23. Taira, M., Valtersson, U., Burkhardt, B., & Ludwig, R. A. (2004). *Arabidopsis thaliana* GLN2-encoded glutamine synthetase is dual targeted to leaf mitochondria and chloroplasts. *The Plant Cell Online*, 16(8), 2048-2058.
24. Clarkson, J. J., Kelly, L. J., Leitch, A. R., Knapp, S., & Chase, M. W. (2010). Nuclear glutamine synthetase evolution in *Nicotiana*: Phylogenetics and the origins of allotetraploid and homoploid (diploid) hybrids. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55(1), 99-112.
25. Pesole, G., Gissi, C., Lanave, C., & Saccone, C. (1995). Glutamine synthetase gene evolution in bacteria. *Molecular biology and evolution*, 12(2), 189-197.
26. Kumada, Y., Benson, D. R., Hillemann, D., Hosted, T. J., Rochefort, D. A., Thompson, C. J., ... & Tateno, Y. (1993). Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(7), 3009-3013.
27. Mathis, R., Gamas, P., Meyer, Y., & Cullimore, J. V. (2000). The presence of GSI-like genes in higher plants: support for the paralogous evolution of GSI and GSII genes. *Journal of molecular evolution*, 50(2), 116-122.
28. Bernard, S. M., Møller, A. L. B., Dionisio, G., Kichey, T., Jahn, T. P., Dubois, F., ... & Habash, D. Z. (2008). Gene expression, cellular localisation and function of glutamine synthetase isozymes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant molecular biology*, 67(1-2), 89-105.
29. Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792-1797.
30. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., FilipSKI, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
31. Doyle, J. J., Doyle, J. L., & Harbison, C. (2003). Chloroplast-expressed glutamine synthetase in Glycine and related Leguminosae: phylogeny, gene duplication, and ancient polyploidy. *Systematic Botany*, 28(3), 567-577.
32. Yockteng, R., & Nadot, S. (2004). Phylogenetic relationships among *Passiflora* species based on the glutamine synthetase nuclear gene expressed in chloroplast (ncpGS). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31(1), 379-396.
33. Lee, H. J., Abdula, S. E., Jang, D. W., Park, S. H., Yoon, U. H., Jung, Y. J., ... & Cho, Y. G. (2013). Overexpression of the glutamine synthetase gene modulates oxidative stress response in rice after exposure to cadmium stress. *Plant cell reports*, 32(10), 1521-1529.
34. Bao, A., Zhao, Z., Ding, G., Shi, L., Xu, F., & Cai, H. (2014). Accumulated Expression Level of Cytosolic Glutamine Synthetase 1 Gene (OsGS1; 1 or OsGS1; 2) Alter Plant Development and the Carbon-Nitrogen Metabolic Status in Rice. *PLoS one*, 9(4), e95581.

35. Zimmermann, P., Hennig, L., & Gruissem, W. (2005). Gene-expression analysis and network discovery using Genevestigator. *Trends in plant science*, 10(9), 407-409.
36. Miflin, B. J., & Habash, D. Z. (2002). The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *Journal of Experimental Botany*, 53(370), 979-987.
37. Scarpeci, T. E., Marro, M. L., Bortolotti, S., Boggio, S. B., & Valle, E. M. (2007). Plant nutritional status modulates glutamine synthetase levels in ripe tomatoes (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom). *Journal of plant physiology*, 164(2), 137-145.
38. Dash, S., Van Hemert, J., Hong, L., Wise, R. P., & Dickerson, J. A. (2012). PLEXdb: gene expression resources for plants and plant pathogens. *Nucleic acids research*, 40(D1), D1194-D1201.
39. Pageau, K., Reisdorf-Cren, M., Morot-Gaudry, J. F., & Masclaux-Daubresse, C. (2006). The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. *Journal of Experimental Botany*, 57(3), 547-557.
40. Famiani, F., Moscatello, S., Ferradini, N., Gardi, T., Battistelli, A., & Walker, R. P. (2014). Occurrence of a number of enzymes involved in either gluconeogenesis or other processes in the pericarp of three cultivars of grape (*Vitis vinifera* L.) during development. *Plant Physiology and Biochemistry*.
41. Solovyev, V. V., Shahmuradov, I. A., & Salamov, A. A. (2010). Identification of promoter regions and regulatory sites. In *Computational Biology of Transcription Factor Binding* (pp. 57-83). Humana Press.
42. Segal, E., & Widom, J. (2009). Poly (dA: dT) tracts: major determinants of nucleosome organization. *Current opinion in structural biology*, 19(1), 65-71.
43. Gómez - Maldonado, J., Avila, C., Barnestein, P., Crespillo, R., & Canovas, F. M. (2004). Interaction of cisacting elements in the expression of a gene encoding cytosolic glutamine synthetase in pine seedlings. *Physiologia Plantarum*, 121(4), 537-545.
44. Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., Van Dongen, S., Bateman, A., & Enright, A. J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research*, 34(suppl 1), D140-D144.
45. Finnemann, J., & Schjoerring, J. K. (2000). Post translational regulation of cytosolic glutamine synthetase by reversible phosphorylation and 1433 protein interaction. *The Plant Journal*, 24(2), 171-181.

1.2. CAPÍTULO 2: A FAMÍLIA GÊNICA DA GLUTAMINA SINTETASE EM *Coffea arabica*: ASPECTOS MOLECULARES

1.2.1. O café: Aspectos econômicos

O café é uma das mais importantes commodities agrícolas, e responsável por aproximadamente metade das exportações de produtos oriundos de países tropicais (MONDEGO *et al.*, 2011). Produzido em mais de 60 países, representa uma importante fonte de renda para várias nações em desenvolvimento (VIDAL *et al.*, 2010). Além disso, também é importante para muitos países desenvolvidos, que são altamente envolvidos na industrialização e comércio do produto, aliado ao fato de serem grandes consumidores da bebida (MONDEGO *et al.*, 2011).

A produção mundial depende de duas principais espécies: *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, as quais são responsáveis por cerca de 65% e 35%, respectivamente, da safra mundial (LASHERMES *et al.*, 2014). O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café e o segundo maior consumidor da bebida. Os principais estados produtores são Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Paraná e Rondônia. De acordo com as estimativas para a safra de 2014/15 espera-se uma produção entre 44,11 e 46,61 milhões de sacas de 60kg (CONAB, 2014).

Em 2013 o Brasil exportou mais de 1,7 milhões de toneladas de café beneficiado, o que gerou uma receita de aproximadamente US\$ 5,2 bilhões de dólares (CONAB, 2014).

1.2.2. *Coffea arabica*: aspectos botânicos

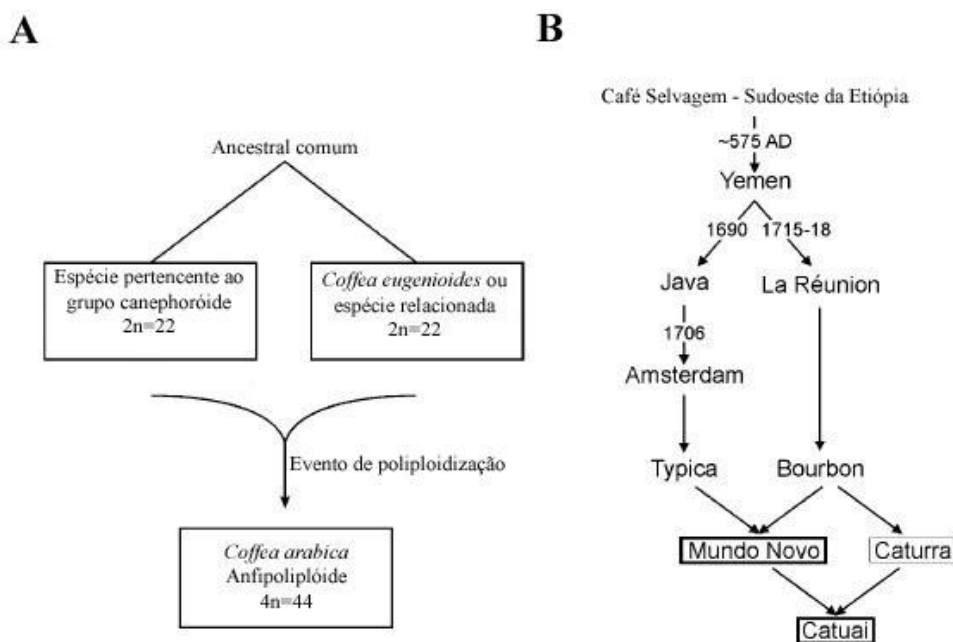
O café pertence à família Rubiaceae, a qual compreende 500 gêneros e mais de 6000 espécies. A maioria dessas espécies são árvores e arbustos tropicais, além de gardênias e plantas produtoras de quinina; no entanto, *Coffea* é o gênero de maior interesse econômico. O gênero *Coffea* agrupa 124 espécies (DAVIS *et al.*, 2011), distribuídas em três seções, de acordo com sua abrangência geográfica. As espécies de interesse agrônômico (*C. arabica* e *C. canephora*) encontram-se na seção *Eucoffea*.

Os cafeeiros cultivados são arbustos perenes, cuja altura varia entre dois e seis metros. Sua copa apresenta um formato cilíndrico com apenas um ramo vertical de onde saem, regularmente, ramificações laterais horizontais. As folhas, quando adultas, são de coloração verde-escura e brilhantes, em formato elíptico, com bordas onduladas, nervuras secundárias de pequena profundidade e domácias glabras parcialmente desenvolvidas. As inflorescências se desenvolvem a partir da axila foliar e dão origem a até quatro flores, em uma estrutura denominada glomérulo. Os frutos são de formato oblongo, podendo apresentar coloração amarela ou vermelha, e possuem duas sementes envolvidas por uma membrana resistente (CARVALHO, 2008).

C. arabica, a principal espécie cultivada, é originária do sudoeste da Etiópia, sudeste do Sudão e norte do Quênia, em faixas de altitude que variam entre 1.000 e 2.000 metros. Sua dispersão se deu através do Iêmen e chegou ao Brasil em 1727, com a introdução de apenas três plantas que foram, posteriormente, difundidas por todo o território nacional (CARVALHO, 2008). *C. arabica* é um alotetraplóide com $2n = 4x = 44$ cromossomos e autofértil com cerca de 10% de polinização cruzada. Diversos estudos apontam que a espécie teve sua origem por meio da hibridação de gametas não reduzidos de outras espécies diploides do gênero. Lashermes *et al.* (1999) sugerem que *C. canephora* e *C. eugenioides*, ou suas formas ancestrais, seriam os parentais da espécie (Fig. 1A).

O cruzamento entre essas espécies ocorreu em um período relativamente recente, há cerca de 1 milhão de anos atrás e provavelmente deu origem a todos os cafeeiros arábica, resultando em uma estreita base genética. Este problema é ampliado na maioria dos genótipos cultivados no Brasil, os quais foram selecionados a partir de duas populações: Typica e Bourbon (VIDAL *et al.*, 2010) (Fig. 1B).

Figura 1: História evolutiva do alotetraplóide *Coffea arabica*. Legenda: A) Origem de *C. arabica*. Os genomas progenitores são representados pelo diplóide *C. eugenioides* e *C. canephora*. *C. arabica* surgiu de 1 a 2 milhões de anos atrás a partir da fusão de *C. canephora* (ou espécies relacionadas) e *C. eugenioides*. B. Origem de cultivares de *C. arabica* no Brasil. (Retirado de Vidal *et al.*, 2010 e baseado em Anthony *et al.* 2002).



1.2.2.1. *Coffea arabica* cv IAPAR 59

A cultivar IAPAR59 originou-se do cruzamento entre a cultivar Villa Sarchi CIFC 971/10 e o Híbrido de Timor CIFC 832/2, realizado no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), em Portugal. Em ensaios conduzidos pelo Instituto Agrônômico do Paraná, a geração F₄ desse material se destacou e deu origem ao IAPAR59 (CARVALHO *et al.*, 2008).

De acordo com análises realizadas pelo CIFC, a cultivar IAPAR59 apresenta resistência completa à ferrugem do cafeeiro. As plantas apresentam porte mais baixo, menor diâmetro e menor volume de copa quando comparadas as da cultivar Catuaí, permitindo seu uso em plantios adensados. Seus frutos apresentam maturação precoce, grãos de bom tamanho e maturação mais uniforme. *C. arabica* cv IAPAR59 apresenta uma alta produtividade e a bebida resultante é de boa qualidade (CARVALHO *et al.*, 2008).

1.2.2.2. *Coffea arabica* cv Catuaí Vermelho

A cultivar Catuaí Vermelho é produto de recombinação de um cruzamento artificial entre cafeeiros selecionados pela produtividade, das cultivares Caturra Amarelo IAC 476-11 e Mundo Novo IAC-374-19. A hibridação foi realizada pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e teve como principal objetivo transferir para Mundo Novo o fator dominante de Caturra que confere porte baixo (CtCt) (CARVALHO *et al.*, 2008).

Estas cultivares apresentam elevado vigor, internódios curtos, ramificação secundária abundante e sistema radicular bastante desenvolvido. A produção média varia de 1800 a 2400 kg/ha, a qualidade da bebida é considerada boa e apresenta alta produtividade. No entanto, as plantas desta cultivar são suscetíveis a ferrugem do cafeeiro e à nematoides.

1.2.2.3. Estudos genômicos no cafeeiro

Estudos envolvendo aspectos moleculares e biotecnológicos de cafeeiro são bastante frequentes, com as principais abordagens voltadas principalmente para resistências a estresses bióticos e abióticos, transformação genética, qualidade dos frutos e marcadores moleculares. No entanto, dados sobre genoma e transcriptoma são menos comuns. Um dos primeiros bancos de sequências expressas (ESTs) de cafeeiro, foi realizado com foco no processo de desenvolvimento de frutos e conta com mais de 50.000 sequências (LIN *et al.*, 2005). Posteriormente, surgiu o projeto brasileiro Genoma Café, como uma iniciativa do Consórcio Pesquisa Café. Nesse trabalho foram sequenciados transcriptomas parciais de diversos tecidos de *Coffea arabica*, *Coffea canephora* e *Coffea racemosa*, o qual resultou em um banco de dados com mais de 150.000 sequências, com cerca de 30.000 genes (MONDEGO *et al.*, 2011).

Iniciativas com sequenciamento de nova geração (NGS – Next Generation Sequencing) ainda são escassas e pouco exploradas em profundidade. Destaca-se estudos em resposta a infecção com a ferrugem do cafeeiro (FERNANDEZ *et al.*, 2012) e diferentes regimes de temperatura (COMBES *et al.*, 2013). No entanto, a maioria dos trabalhos é focada na caracterização de genes

candidatos (por exemplo, DOS SANTOS *et al.*, 2011; COTTA *et al.*, 2014; DE CARVALHO *et al.*, 2014).

Recentemente foi publicado o genoma de *Coffea canephora* (DENOEUDE *et al.*, 2014), que por ser uma das espécies parentais de *C. arabica* trouxe uma relevante contribuição para estudos sobre aspectos moleculares e genômicos do gênero *Coffea*.

1.2.3. Nitrogênio

O N é um elemento chave para o desenvolvimento, crescimento e reprodução das plantas (BERNARD; HABASH, 2009), pois se trata de um constituinte primário de nucleotídeos e proteínas, que são compostos essenciais para a vida (XU *et al.*, 2012). A maioria das plantas não leguminosas requerem que uma quantidade aproximada entre 20g e 50g de N absorvido para produzir 1kg de biomassa seca, e o suprimento disponível no solo é usualmente limitado para a maioria das espécies cultivadas (ROBERTSON; VITOUSEK, 2009). A produção e utilização de fontes complementares de N nos últimos 50 anos possibilitou um aumento na produção mundial de alimentos (LEA; MIFLIN, 2011). Outra importante fonte de N para as culturas agrícolas, além dos fertilizantes químicos, é a conversão biológica do N₂ presente na atmosfera, em formas de amônio (NH₄⁺) disponíveis para plantas. A fixação biológica é responsável pela entrada de 50 – 70 Tg de N nos sistemas agrícolas anualmente (HERRIDGE *et al.*, 2008).

Os benefícios da adição de N à sistemas agrários são bem documentados e garantem energia suficiente para o desenvolvimento das plantas atrelado a um alto custo ambiental. Em um relatório conjunto, a Associação Internacional das Industrias de Fertilizantes e o Programa das Nações Unidas para o Ambiente estimaram que a produção de uma tonelada métrica de fertilizante nitrogenado consome cerca de 873m³ de gás natural. Em diversas culturas, a adubação se tornou o principal gasto durante a produção, e esses custos tendem a aumentar cada vez mais conforme a fonte de N para fertilizantes se torna escassa (XU *et al.*, 2012).

O uso excessivo de fertilizantes nitrogenados libera diversos compostos contaminantes para água, ar e solo. Com o aumento da lixiviação do solo e a liberação de óxido nítrico e gases reativos de N para a troposfera, a taxa de

eutrofização de cursos d'água e acidificação dos solos tem aumentado significativamente. Devido às diversas formas químicas geradas durante o processo, a contaminação por nitrogênio pode representar um desafio maior que a de carbono para o meio ambiente (SUTTON *et al*, 2011).

Frente a esses desafios, compreender e melhorar a eficiência no uso do nitrogênio (NUE – do inglês *Nitrogen Use Efficiency*) é fundamental e pode trazer significativos ganhos em termos econômicos e ambientais. A NUE é resultado de múltiplas interações, e pode ser determinada por diversos fatores, tais como: eficiência na captação de N, assimilação, taxa de recuperação de N, qualidade do fertilizante utilizado, eficiência fisiológica no uso de N, transporte e remobilização. Fundamentalmente, dois aspectos fisiológicos das plantas contribuem para a eficiência no uso de N da planta – a eficiência de captação e de assimilação. Em razão dos efeitos que a adição externa de N tem sobre a atividade de microrganismos, o complexo de interconversões e as diferentes formas de N disponíveis, bem como devido à perda de nitrogênio gasoso, é difícil mensurar quantidade de N disponível ou atualmente absorvida pelas plantas (XU *et al*, 2012).

As plantas respondem à disponibilidade de N de acordo com o genótipo e com o nível de fertilizante disponível. Em baixas concentrações a eficiência no uso e remobilização de N são maiores do que em situações de alta disponibilidade. Os fatores limitantes para o metabolismo de N são diferentes em condições de alta e baixa disponibilidade; quando a quantidade de N é alta, as principais variações na eficiência são dadas pela diferença nas taxas de captação; em baixas concentrações, a variação na NUE é determinada pela taxa de remobilização (LI *et al*, 2010).

1.2.3.1. Aquisição de nitrogênio

Em solos aerados a principal forma de N inorgânico é o nitrato; já em locais úmidos ou solos ácidos, a principal forma é o amônio. Para lidar com essa dinamicidade e heterogeneidade na concentração e disponibilidade de N em diferentes solos, as raízes das plantas possuem diferentes formas de captação. Diversas proteínas de membrana atuam nas mais diversas etapas do processo de absorção de N, e a atividade desses transportadores e proteínas é diretamente regulada pela forma e contração de N disponível, flutuações na temperatura e no fotoperíodo (MILLER *et al*, 2007). Podem assim ser divididos em sistemas de alta e baixa afinidade.

As famílias de transportadores NRT1, NRT2 e CLC foram caracterizadas como responsáveis pela captação e translocação de nitrato em plantas. A maioria dos membros da família NRT1 é caracterizada como transportadores de baixa afinidade, com exceção do transportador NRT1.1, que opera em ambas as condições. A expressão dessas famílias é regulada pelo nitrato, metabólitos de N, ausência de N, ritmo circadiano, sacarose e pH. Em arroz, foram caracterizados cinco membros pertencentes a família NRT2, cada um mostrando diferentes afinidades e padrões de regulação de acordo com a forma do suprimento de nitrogênio (XU *et al.*, 2012).

O transporte de amônio é realizado por proteínas presente na membrana plasmática da família AMT e ainda não está bem definido quais as formas químicas transportadas por essas proteínas - se são NH_3 hidrofóbicas ou amônia carregada. O excesso de amônio no interior da célula é evitado pelo mecanismo de *feedback* negativo aos transportadores, em resposta a altas concentrações de amônio, domínios conservados são fosforilados levando ao fechamento cooperativo dos mesmos (LOQUÉ *et al.*, 2007). Essa família de proteínas é dividida de acordo com sua afinidade em transportadores de alta afinidade (HATS) e transportadores de baixa afinidade (LATS). A regulação desse complexo mecanismo se dá por meio da estimulação fotossintética, onde altas taxas fotossintéticas estão correlacionadas a alta expressão de transportadores NH_4^+ HATS. O outro mecanismo regulatório pode ocorrer através da repressão exercida por assimilados endógenos de N, mediante *feedback* negativo (CAMAÑES *et al.*, 2009).

Outra importante fonte de N utilizada na agricultura é a uréia, que através da ação da enzima urease é convertida em NH_4^+ e CO_2 e absorvida pelas plantas, ou então diretamente na forma de uréia (KRAJEWSKA, 2009). Foram descritos e caracterizados dois mecanismos de transporte de uréia mediados por proteínas transmembrana: um de alta afinidade (HATS) e um de baixa afinidade (LATS). O sistema LATS é composto pelas proteínas intrínsecas de membrana, conhecidas como aquaporinas, que são facilitadoras do movimento de uréia com concentração linear (SOTO *et al.*, 2008). Já o sistema de alta afinidade é mediado pela proteína DUR3, localizada preferencialmente na membrana plasmática de células epidérmicas da raiz. Atua como transportador ativo de uréia acoplado a um fluxo de prótons, representando o principal sistema de absorção de uréia da solução do solo (KOJIMA *et al.*, 2007)

1.2.3.2. Assimilação de nitrogênio

Toda forma inorgânica de N é primeiramente reduzida à NH_4^+ antes de ser incorporada em formas orgânicas. O nitrato é a forma dominante de N disponível para a maioria das plantas, uma vez que o amônio é rapidamente nitrificado por bactérias do solo (WICKERT *et al*, 2007). Ele pode ser processado tanto por células de raízes quanto de folhas (WICKERT *et al*, 2007); no entanto, na maioria dos casos é transportado para a parte aérea onde é assimilado (XU *et al*, 2012). Em plantas superiores, essa forma de N pode ter diversos destinos após a absorção: acúmulo no vacúolo, transporte via xilema, redução e incorporação em forma orgânicas. O acúmulo de N em vacúolos aliado a tolerância das plantas à sua alta concentração, leva a crer que ele tem uma importante participação como agente osmótico. Já o amônio é rapidamente assimilado em compostos orgânicos, visto que é tóxico e não pode ser acumulado em vacúolos (WICKERT *et al.*, 2007).

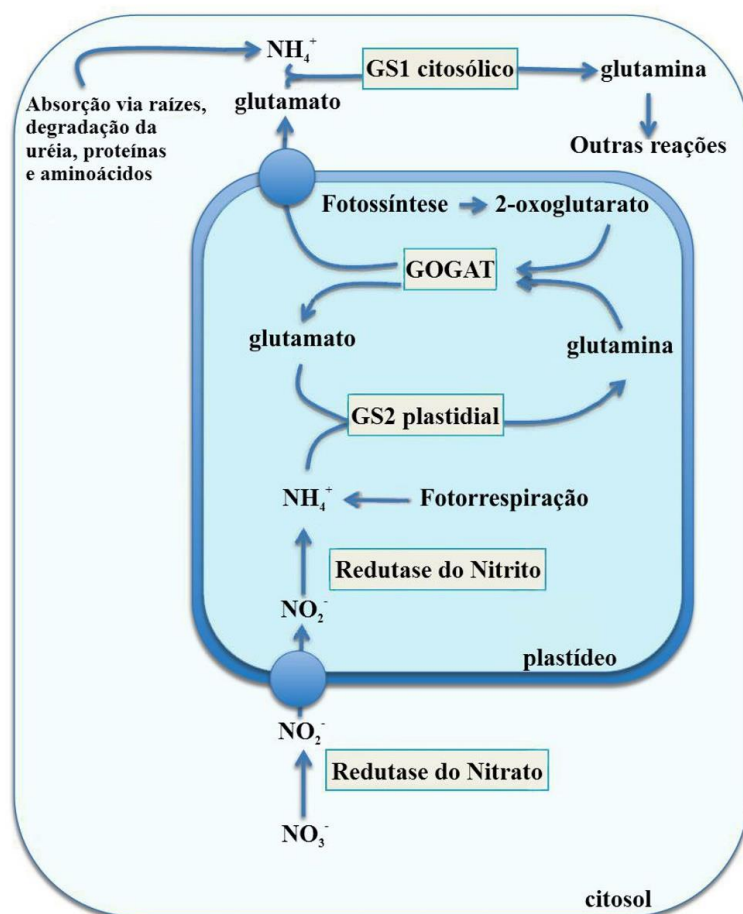
O nitrogênio inorgânico é assimilado e incorporado em glutamina, glutamato, aspartato e asparagina, que constituem importantes reservas de nitrogênio para a planta e são utilizados para a síntese de outros compostos nitrogenados (WICKERT *et al*, 2007). As principais enzimas envolvidas no processo de incorporação e remobilização de N são: nitrato redutase (NR; EC 1.6.6.1), nitrito redutase (NiR; EC 1.7.7.1) glutamina sintetase (GS; EC 6.3.1.2), glutamina-2-oxoglutarato amida transferase (Fd-GOGAT; EC 1.4.7.1; NADH-GOGAT; EC 1.4.1.14), asparagina sintetase (AS; EC 6.3.5.4), e aspartato aminotransferase (AAT; EC 2.6.1.1).

A redução do nitrato é catalisada pela ação de duas enzimas, nitrato redutase (NR) e nitrito redutase (NiR). A NR catalisa a conversão do nitrato em nitrito por meio da redução de dois elétrons; a NiR catalisa a redução de seis elétrons que promove a conversão do nitrito em amônio.

O amônio, derivado da redução do nitrato ou diretamente da absorção pelos transportadores AMT, é assimilado em aminoácidos através do ciclo glutamina sintetase (GS)/glutamato sintase (GOGAT). A glutamina juntamente com glutamato, asparagina e aspartato, são aminoácidos que atuam na doação de N para a biossíntese de todos os aminoácidos, ácidos nucleicos, e outros compostos orgânicos nitrogenados na célula vegetal (CORUZZI, 2003) (Figura 2). Essa via

metabólica de assimilação de nitrogênio, e suas enzimas – GS e GOGAT- são consideradas enzimas chave no metabolismo de nitrogênio (WICKERT *et al*, 2007).

Figura 2: Modelo simplificado da assimilação primária e reciclagem do nitrogênio em células vegetais. Essas vias metabólicas são reguladas em diferentes níveis (transcricional, traducional e pós-traducional) por diversos fatores, incluindo metabólitos nitrogenados e luz (Adaptada de CORUZZI, 2003). GS = glutamina sintetase; GOGAT = glutamato sintetase.



1.2.3.3 Glutamina sintetase

Em plantas existem diferentes isoformas de GS, que são classificadas de acordo com a sua localização celular em citosólicas (GS1) ou

plastidiais (GS2) (SEABRA *et al.*, 2010). Estudos genéticos revelaram que a isoforma GS2, na maioria das plantas, é codificada por um gene de cópia única (SEABRA *et al.*, 2010), enquanto os genes codificantes para a isoforma GS1 pertencem a uma pequena família multigênica (CASTRO-RODRÍGUEZ *et al.* 2011). Um crescente número de evidências mostram que a regulação de GS se dá tanto a nível de transcrição, quanto a nível pós-transcricional (LEA; MIFLIN, 2011). Essa enzima atua na assimilação do N inorgânico, que é a incorporação do amônio ao glutamato, resultando em glutamina. O grupamento amino da glutamina é transferido para α -cetoglutarato pela GOGAT, obtendo duas moléculas de glutamato. Então, o glutamato é utilizado como doador de grupamento amino, através de reações de transaminação, para síntese de um grande número de metabólitos essenciais, tais como, aminoácidos, ácidos nucleicos, açúcares aminados.

A GS1 está localizada principalmente em tecidos vasculares e desempenha um papel fundamental na assimilação de amônia de fontes externas, amônia derivada da fixação de N₂ ou de outras fontes de N e também durante a remobilização desse elemento durante a senescência. A expressão diferencial dessa pequena família multigênica é responsável pelos diferentes comportamentos das isoformas de GS encontradas nas plantas (BETTI *et al.*, 2012). O genoma de populus contém 4 grupos de genes de GS duplicados (CASTRO-RODRUGUEZ *et al.*, 2011), que são expressos diferencialmente em cada órgão. A distribuição desses genes foi avaliada em células de folhas, raízes e caule, por meio de hibridização *in situ* com sondas específicas para cada uma das isoformas. A isoforma plastidial é preferencialmente expressa em células parenquimáticas e paliçádicas e há uma carência dessas enzimas na epiderme inferior e superior. Já entre as isoformas citosólicas, *PtGS1.1* tem sinais elevados na lâmina foliar, *PtGS1.2* em células do cilindro vascular de raízes e *PtGS1.3*, em células do feixe vascular de caule (CASTRO-RODRIGUEZ *et al.*, 2015). Em *Brassica napus*, foram encontrados 16 genes codificantes para isoforma citosólica, que são diferencialmente expressos em condições limitante de N e de acordo com o desenvolvimento da planta (ORSEL *et al.*, 2014).

Em um primeiro momento a família gênica de GS em cevada foi caracterizada e foram encontradas quatro genes, um codificante para GS2 e os outros três para GS1 (GOODALL *et al.*, 2013). No entanto, em um estudo mais recente, dois genes de GS novos foram identificados e as análises das sequências

mostraram que esses novos genes são responsáveis por codificar uma proteína de aproximadamente 842 aminoácidos e são homólogos a GSI, presente em procariotos (AVILA-OSPINA *et al.*, 2015). Além disso, mostrou-se que a isoforma *HvGS1_3* é expresso principalmente em grana, *HvGS1_1* em caule e *HvGS1_2* em folhas e raízes.

Por outro lado, *GS2* (plastidial) é predominantemente expressa em tecidos fotossintéticos e já foi demonstrado que essa isoforma tem um papel essencial na reassimilação de amônio liberada durante a fotorrespiração, embora tenha sido relatada a sua presença em tecidos não fotossintetizantes, como é o caso de *Lotus japonicus* (OREA *et al.*, 2002) e *Medicago truncatula* (MELO *et al.*, 2003), onde recentemente foi descoberto um segundo gene codificante para *GS2* expresso durante o desenvolvimento de suas sementes (SEABRA *et al.*, 2010).

1.2.3.4. Metabolismo de nitrogênio em cafeeiro

Para haver um desempenho e produção satisfatória o cafeeiro precisa estar adequadamente nutrido; para tanto, a aplicação de fertilizantes é necessária desde a formação de mudas até a fase reprodutiva. O elevado potencial produtivo do cafeeiro e a baixa disponibilidade de nutrientes nos solos brasileiros aumentam ainda mais a necessidade de utilizar fertilizantes minerais. O Brasil é altamente dependente da importação desses produtos, já que sua produção atende somente cerca de 30% da demanda nacional (SAAB; PAULA, 2008). Nos últimos anos, o preço dos fertilizantes minerais vem sofrendo um aumento de preço muito acentuado, resultado da alta procura, aumento de gastos com transporte e matérias primas, entre outros fatores. Depois da mão-de-obra, a adubação química constitui-se no principal custo de manutenção da lavoura cafeeira (FEHR *et al.*, 2012).

O cafeeiro é particularmente exigente em N, fato que é alterado de acordo com a idade da planta e a forma de cultivo. Se não há fatores limitantes, um suprimento adequado de N promove crescimento rápido das plantas, especificamente pelo aumento do número de pares de folhas e de ramos plagiotrópicos (produtivos) por planta, número de internódios por ramo e número de flores por internódio, que, em seu todo, estão associados a maiores produtividades do cafeeiro. A deficiência de N em cafeeiro, como em outras plantas, provoca uma queda na capacidade fotossintética devido, principalmente, ao decréscimo nos componentes estruturais fotossintéticos e na enzima Rubisco, que está envolvida na

assimilação do carbono. Dessa forma, a falta de N restringe o crescimento e a produção do café, levando a sintomas de amarelecimento e queda das folhas (DAMATTA *et al.*, 2007).

O cafeeiro é uma planta naturalmente de ambientes sombreados, no entanto, principalmente no Brasil, é cultivado em condições de pleno sol, o que resulta em fotoinibição severa. Plantas de café apresentam uma grande habilidade de adaptação a ambientes expostos a luz solar, e a taxa nutricional de N desempenha um papel fundamental nesse processo (RAMALHO *et al.*, 1997). Pompelli *et al.* (2010) demonstrou que a adubação nitrogenada pode efetivamente proteger plantas de café submetidas a diferentes condições de estresse contra danos fotooxidativos, embora os mecanismos sejam aparentemente independentes dos efeitos positivos esperados pelo alto suprimento de N nos processos de carboxilação.

1.2.3.5. Glutamina sintetase em cafeeiro

A diversidade gênica de GS em cafeeiro ainda não foi estudada. No entanto, foram realizados alguns estudos relacionados a quantificação enzimática em diferentes tecidos e em diferentes situações de cultivo. Foi evidenciada a atividade dessa enzima em culturas celulares de cafeeiro (FILIPPI *et al.*, 2007), em folhas em condições de campo no período reprodutivo (REIS *et al.*, 2009), em plantas mantidas em casa de vegetação (POMPELLI *et al.*, 2010) e em frutos ao longo de diferentes fases de desenvolvimento (SOARES *et al.*, 2013).

Em condições de campo, foi observado que a atividade de GS decresce ao longo do ciclo fenológico do desenvolvimento de frutos, provavelmente devido a processos de remobilização de N e existe uma correlação direta entre produtividade e decréscimo da atividade enzimática (REIS *et al.*, 2009). A atividade de GS é modulada em função da disponibilidade de luz, e em folhas sombreadas é menor do que em folhas expostas a alta irradiação (POMPELLI *et al.*, 2010). Entretanto, mais que a radiação luminosa, a disponibilidade de N é o principal modulador da atividade de GS (POMPELLI *et al.*, 2010).

Todos estes estudos são baseados na quantificação espectrofotométrica da atividade de GS; com isso, a contribuição específica de isoformas citosólicas ou plastidiais para cada uma destas situações ainda não foi relatada para *Coffea arabica*.

2. JUSTIFICATIVA

De todos os nutrientes minerais, N é o requerido em maior quantidade para construção e manutenção das células vegetais; no cafeeiro, um dos principais custos de produção está relacionado ao uso de fertilizantes (FEHR *et al.*, 2012). Dessa forma, estudos sistemáticos de famílias gênicas envolvidas na assimilação de nutrientes minerais são de grande importância para o desenvolvimento de variedades e seleção de germoplasma mais eficiente no uso de N, e por consequência mais sustentável – uma vez que a volatilização e demais processos de perda de N no solo causam importantes consequências ambientais. No Brasil e no Paraná, a principal espécie cafeeira cultivada é *Coffea arabica*, que corresponde a aproximadamente 70% da produção mundial (ICO, 2014).

A assimilação do nitrogênio em aminoácidos, a partir de formas inorgânicas tem duas enzimas-chave: glutamina sintetase e glutamato sintetase, que constituem o ciclo regulatório GS/GOGAT, fundamental para a síntese de aminoácidos e proteínas (XU *et al.*, 2012). Diversos estudos demonstraram que a manipulação de genes da família gênica de GS resulta em maior eficiência de uso de N (XU *et al.*, 2012).

A análise detalhada da família gênica de GS tem sido alvo de estudo em diversas plantas de interesse agrônômico no mundo todo, como a cana-de-açúcar (DE MATOS NOGUEIRA *et al.*, 2005), o chá preto (RANA *et al.*, 2010), a cevada (GOODALL *et al.*, 2013; AVILA-OSPINA *et al.*, 2015) e o arroz (SINGH; GHOSH, 2013).

O entendimento do papel molecular e da regulação da GS é crucial para uma compreensão dos processos envolvidos na assimilação do N no solo e sua conversão em enchimento de grãos em cereais (GOODALL *et al.*, 2013), na eficiência do uso de nitrogênio em plantas (RANA *et al.*, 2010).

Vale ainda colocar que, no café, a maximização do processo de economia no uso de fertilizantes para diminuição de custos, aliada a bons índices de produtividade de frutos, são características de grande interesse ao melhoramento. Para tanto, o entendimento dos genes envolvidos no processo de conversão do N inorgânico em orgânico é fundamental.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral realizar a caracterização genômica e transcricional dos genes pertencentes a família gênica glutamina sintetase em *Coffea arabica*. Os objetivos específicos são:

- Avaliar o perfil transcricional e enzimático de *GS1* e *GS2* nos diferentes órgãos de cafeeiro;
- Avaliar o perfil transcricional e enzimático de *GS1* e *GS2* frente a diferentes condições de estresses abióticos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE GS EM *COFFEA ARABICA*

Sequências já caracterizadas de GS em *Arabidopsis thaliana* (ISHIYAMA *et al.*, 2004) foram utilizadas como ponto de partida para buscar seus ortólogos na montagem de ESTs de cafeeiro, provenientes do Projeto Genoma Café (<http://bioinfo04.ibi.unicamp.br/coffea/>) (MONDEGO *et al.*, 2011). A identificação das prováveis proteínas se deu pela utilização da ferramenta TBLASTN (ALSTCHUL *et al.*, 1997), considerando válidos resultados com e-value acima de e-50. Como nem todos os contigs apresentavam um quadro de leitura completo, foi realizada uma busca complementar em contigs gerados por sequenciamento de nova geração do transcriptoma de folhas e frutos de *C. arabica* (YUYAMA *et al.*, 2013), produzidos em nosso laboratório.

As sequências resultantes desse primeiro processo de seleção foram traduzidas em aminoácidos e a ocorrência dos dois domínios conservados da família de GS: domínio catalítico (PF00120) e beta-grasp (PF03951) foi confirmada por meio de comparação contra a base de dados Pfam (BATEMAN *et al.*, 2004). As sequências que não apresentaram os dois domínios característicos foram excluídas das etapas subsequentes. Também foram verificados o peso molecular (MW), o ponto isoelétrico (pI) e a localização celular de cada uma das diferentes isoformas obtidas. O MW e o pI foram determinados por meio do uso da ferramenta Compute pI/MW (http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool) e a possível localização foi verificada pela presença de peptídeos sinais em cada proteína foi avaliada com o auxílio do TargetP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>).

4.2. ANÁLISE FILOGENÉTICA

Os genes de GS identificados em *C. arabica* tiveram sua sequência codificantes (CDS) predita pelo software FGENESH (SOLOYVEY, *et al.*, 2006) e foram alinhados utilizando-se o programa MUSCLE (EDGAR, 2004) com as demais sequências de GS identificadas anteriormente em diferentes espécies vegetais (SOARES *et al.*, dados não publicados – Capítulo 1). Foi realizado um teste para

identificar o melhor modelo de substituição de nucleotídeos para cada conjunto de sequências (GS1 e GS2). A árvore filogenética foi gerada no software MEGA 6 (TAMURA *et al.*, 2013), utilizando-se a metodologia de Maximum Likelihood, bootstrap de 1000 réplicas e o modelo de substituição de acordo com o teste realizado.

4.3. MATERIAL VEGETAL

Foram utilizados duas cultivares de *C. arabica*, Catuaí Vermelho e IAPAR59, para a realização de todos experimentos. Foram realizadas coletas de folhas completamente expandidas, raízes, ramos plagiotrópicos, flores, botões florais e frutos em três estádios de desenvolvimento. Os experimentos de estresse abióticos foram realizados em casa de vegetação a 27°C e ciclo de iluminação natural, com exceção do estresse térmico, onde foram utilizadas condições especiais de temperatura e iluminação. Após a coleta, todas as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezers -80° até o momento das análises. O desenho experimental adotado na condução de todos os experimentos foi inteiramente casualizado, com três repetições biológicas.

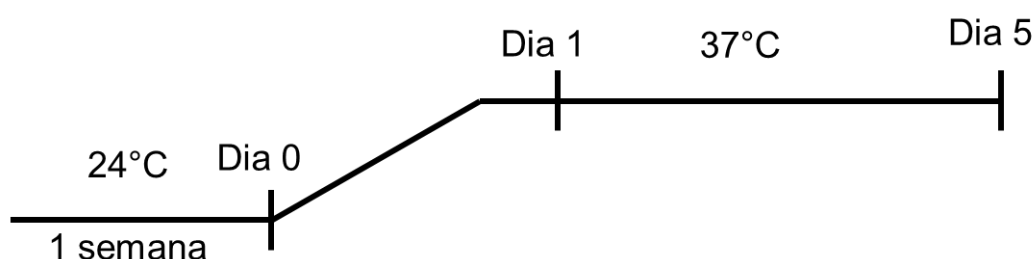
4.3.1. Experimento de Estresse Salino

Sementes de IAPAR59 e Catuaí Vermelho foram germinadas em caixas plásticas contendo areia e fertirrigadas semanalmente com solução nutritiva adaptada de Clark (1975) até atingirem 6 meses. Um total de 24 plantas, 12 de cada genótipo, foram transferidas para vasos de 15 litros preenchidos com substrato (3 solo: 1 areia: 1 matéria orgânica) e mantidas até 12 meses de idade. O estresse salino foi realizado da mesma maneira que em dos Santos *et al.* (2011). Para evitar choque osmótico, as plantas foram irrigadas no primeiro dia com uma solução de 50mM NaCl e no segundo com 100mM NaCl. A partir do terceiro dia até o final do experimento, as plantas foram irrigadas diariamente com uma solução 150mM NaCl. As coletas foram realizadas em triplicatas biológicas, onde cada replicada foi representada por um “pool” de três plantas de cada cultivar em cada um dos dias de amostragem: antes do início do experimento (controle não estressado – Dia 0), 6, 12 e 25 dias após o tratamento com 150 mM NaCl.

4.3.2. Experimento de Estresse Térmico

Plantas com aproximadamente 14 meses, mantidas em vasos plásticos de 15 litros com substrato foram utilizadas para a realização deste experimento. Essas plantas foram transferidas para câmara de crescimento onde foram submetidas a um período de aclimação de sete dias a 24°C. Após esse período a temperatura foi elevada para 37° por 5 dias nas seguintes condições: 12/12h luz/escuro e 70% de umidade. Para evitar déficit hídrico, as plantas foram irrigadas durante todo o período de experimento. Folhas completamente expandidas e raízes foram coletadas de seis plantas nos seguintes períodos de avaliação: controle não estressado (Dia 0), dia 1 e 5 após elevação da temperatura, entre 10h00 e 11h00. Esse experimento foi realizado três vezes, onde a cada vez foram utilizadas 20 plantas de cada genótipo e cada repetição do experimento representa uma das triplicatas biológicas.

Figura 3: Representação esquemática do desenvolvimento do estresse térmico em plantas de *C. arabica*.

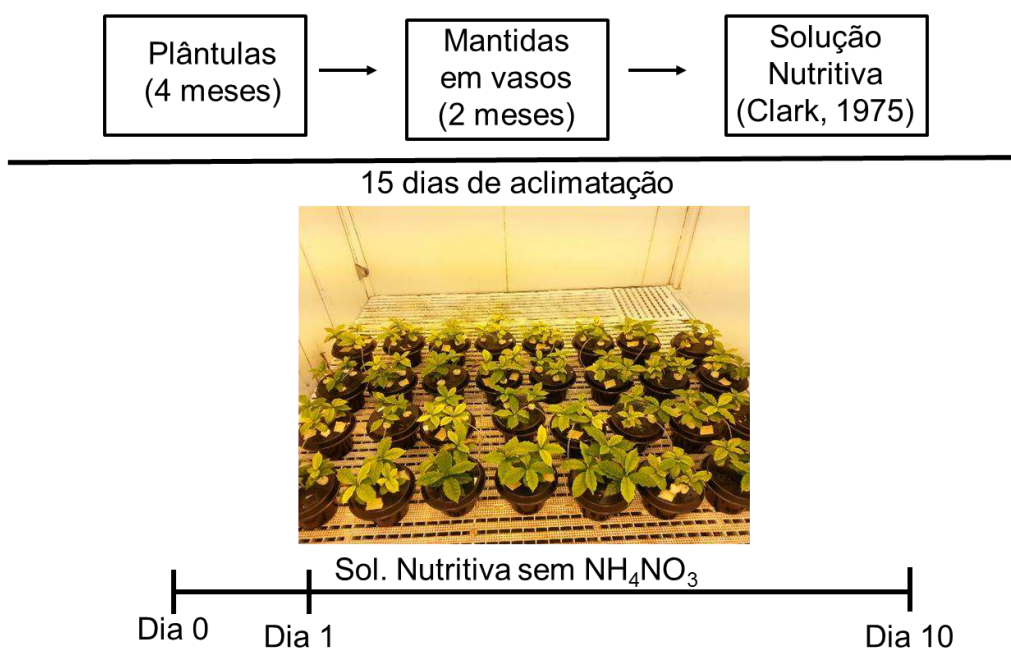


4.3.3. Supressão de Nitrogênio

Plântulas de aproximadamente quatro meses de idade foram cedidas pelo Viveiro de Mudas de Café do IAPAR. Elas foram transferidas para vasos plásticos de 5 litros preenchidos com areia e fertirrigadas semanalmente com solução nutritiva de Clark (1975) durante dois meses. O experimento foi realizado conforme relatado por de Carvalho *et al.* (2013). 96 plantas de seis meses foram selecionadas, 48 por genótipo, pela uniformidade de tamanho e transferidas para câmara de crescimento sobre as seguintes condições: 12 h/ 12h dia/noite, 23°C e

45% de umidade. As plantas foram mantidas em solução de Clark modificada aerada, com os seguintes componentes: $5330\mu\text{M NH}_4\text{NO}_3$, $260\mu\text{M KH}_2\text{PO}_4$, $330\mu\text{M MgSO}_4$, $1060\mu\text{M K}_2\text{SO}_4$, $660\mu\text{M CaCl}_2$, $200\mu\text{M Na-Fe-EDTA}$, $7\mu\text{M H}_3\text{BO}_3$, $3\mu\text{M MnSO}_4$, $2.5\mu\text{M ZnSO}_4$, $0.1\mu\text{M CuSO}_4$, and $0.7\mu\text{M NaMoO}_4$. O pH dessa solução foi corrigido para valores entre 5,5 e 6,0. O pH da solução era verificado e ajustado a cada três dias e a solução foi renovada quinzenalmente. Após 15 dias de aclimação, foram coletadas as amostras referentes aos controles não estressados (dia 0), e as plantas transferidas solução para Solução de Clark modificada livre de fontes de N. Folhas e raízes laterais foram coletadas após 24h (1 dia) e 10 dias após a transferência para solução livre de N, entre 10h00 e 11h00. A coleta foi realizada em triplicatas biológicas, onde cada replicata era composta por um “pool” de 10 plantas.

Figura 4: Representação esquemática para o desenvolvimento de supressão de nitrogênio em plantas de *C. arabica*.



4.3.4. Análise do Desenvolvimento de Frutos

Frutos dos cultivares IAPAR59 e Catuaí Vermelho foram coletados de plantas adultas mantidas em condições de campo. Os frutos de IAPAR59 foram

coletados no campo experimental do Instituto Agronômico do Paraná (Londrina, Paraná) e frutos da variedade Catuaí Vermelho foram coletados na estação experimental da cooperativa Cocari (Mandaguari, Paraná). Os frutos foram coletados mensalmente desde 90 dias após o florescimento (dezembro) até o final do processo de maturação (maio), sempre das mesmas plantas. As triplicatas biológicas são representadas por pools de frutos de três plantas. Após a coleta os frutos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezers -80°.

Os frutos foram dissecados em polpa e perisperma/endosperma e seus tecidos usados independentemente para as futuras análises. Após essa etapa, foram selecionadas três estádios de maior diferença no desenvolvimento e maturação dos frutos, baseado no trabalho de GEROMEL *et al.* (2006): 90DAF (dias após o florescimento), 180DAF e 240DAF.

4.4. EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

A extração de RNA total foi realizada segundo o protocolo de Korimbocus *et al.* (2002), no qual as amostras foram homogeneizadas em tampão CTAB e precipitadas com cloreto de lítio. Em seguida, foram tratadas com DNase (Ambion, Life Technologies) para eliminação de DNA genômico e realizou-se uma PCR utilizando primers previamente selecionados do gene *GAPDH* para confirmar a completa remoção de fragmentos de DNA. A concentração e a pureza do RNA foram determinadas por espectrofotometria, utilizando-se o NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Foram utilizadas amostras que apresentaram razões $A_{260/280 \text{ nm}}$ entre 1.8 e 2.2. A integridade foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1%.

A síntese de cDNA se deu a partir de 3 µg de RNA total utilizando o kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen), de acordo com instruções do fabricante em um volume final de 13 µl.

4.5. SELEÇÃO DE PRIMERS

Para caracterização molecular dos genes identificados, foram selecionados *primers* com 2 finalidades específicas:

1) Avaliação da dinâmica transcricional de GS em cafeeiro em diferentes situações de estresse, órgãos vegetais e ao longo do desenvolvimento de frutos (Tabela 1).

2) Amplificação dos genes completos codificantes para GS, visando a determinação de sua estrutura (Tabela 2).

A eficiência dos *primers* utilizados para caracterização transcricional foi verificada por meio do software LinReg (RAMAKERS *et al.*, 2003), utilizando-se os que apresentaram eficiência de amplificação maior ou igual 90% (Tabela 1).

Tabela 1: Primers selecionados para caracterização transcricional e eficiência de amplificação.

Gene	Nomenclatura	Contig C. arabica	Ortólogo Arabidopsis	Acesso NCBI	Amplicon (pb)	Sequência	Eficiência Média (%)
Glutamina Sintetase Plastidial	CaGS2	9035	AT5G35630.1	GR998899	143	F: ACTTCAAAGATGGGAGCTCCC R: GTTACGTCCAGTTTAGCAGCTGT	93,15
Glutamina Sintetase Citosólica	CaGS1	9226	AT5G37600.1	GR992548	147	F: GAGGATCACTGAGATTGCTGGG R: TCAATGCCTTCTTGATGACTCC	94,6
Glutamina Sintetase Citosólica	CaGS1	10376	AT5G16570.1	GT004200	133	F: GGAATGGTGTGGTGTCTCAC R: CACAAGGATCATATTGCTGCTTATG	94,85
Gliceraldeído-3-Fosfato-Desidrogenase	CaGAPDH	*	AT1G13440	GW488886	100	F: AGGCTGTTGGAAAAGTTCTTC R: ACTGTGGAACCTCGGAATGC	94,9

Tabela 2: Primers selecionados para amplificação de genes completos de GS.

Gene	Nomenclatura	Contig C. arabica	Sequência
Glutamina Sintetase Plastidial	CaGS2_comp	9035	F: ATGGCACAAATCCTGGCC R: TTAACCTTTAATGCAAT
Glutamina Sintetase Citosólica	CaGS1_comp	9226	F: ATGGCTTTGCTCTCAGATCTT R: TCAAGATTTCCAGAGGATGGTA
Glutamina Sintetase Citosólica	CaGS11_comp	10376	F: ATGTCTCTCTTTCGGATC R: TCATGGCTTCCACACAAT

4.6. PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

O padrão transcricional dos genes de GS foi realizado por meio de RT-qPCR, utilizando o termociclador ViiA 7 (Applied Biosystems). O intercalante utilizado foi GoTaq® SYBR qPCR Master Mix (Promega) segundo o protocolo recomendado pelo fabricante. As reações de qPCR foram conduzidas em triplicatas biológicas, cada uma contendo três triplicatas técnicas e como controle foram preparadas reações sem cDNA. As triplicatas biológicas representam pools de materiais coletados em cada experimento e de cada um foram realizadas diferentes extrações de RNA total. Foi utilizado 1 µl de cDNA

previamente diluído a 50 ng para cada reação, com um volume total de 15 µl. O programa de amplificação compreende os seguintes passos: 1 ciclo (95° por 10 minutos), 40 ciclos de amplificação, (95°C 15 segundos; 60°C, 60 segundos), posteriormente, foram realizadas curvas de dissociação para verificar a especificidade de amplificação de cada reação individualmente.

Os níveis de expressão foram calculados utilizando *GAPDH* como gene de referência, tal como recomendado por Cruz *et al.* (2009) e de CARVALHO *et al.*, (2013) e o software ExpressionSuite Software v1.0.3 (Life Technologies), onde o método utilizado para quantificação relativa é baseado em Livak e Schmittgen (2001) e os valores são dados em função do Ct do alvo subtraído o Ct do normalizador, comparados ao calibrador. Para todos os experimentos, utilizou-se como calibrador (expressão=1) as amostras referentes ao Dia 0 (controle não-estressado) e para as análises ao longo do desenvolvimento de frutos foram consideradas as amostras de 90DAF.

Para checar a especificidade dos primers utilizados, uma amostra de cada um dos genes de GS identificados foi escolhido aleatoriamente para sequenciamento. O material selecionado foi sequenciado pela empresa Macrogen (Coréia do Sul).

4.7. RT-PCR SEMI-QUANTITATIVO

O perfil transcricional dos genes de GS em botões florais, flores e ramos de cafeeiro foi avaliado por RT-PCR semi-quantitativo. Foram utilizadas plantas dos genótipos Catuaí Vermelho e IAPAR 59 com aproximadamente dois anos de idade e mantidas em casa de vegetação. A extração de RNA total e a síntese de cDNA desses materiais se deu por meio da mesma metodologia descrita anteriormente. As reações de PCR foram conduzidas de acordo com as recomendações do fabricante e com os primers descritos na tabela 1. As reações foram conduzidas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, 30 ciclos de amplificação constituintes de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos seguido de 72 °C por 35 segundos. Após essa etapa um período final de extensão a 72°C por 5 minutos. As reações foram realizadas em volume final de 25µl e continham aproximadamente 250ng de cDNA. A observação dos fragmentos se por meio de gel de agarose 2% (p/v). Como normalizador foi utilizado o gene *GAPDH*, seguindo as mesmas condições de ciclagem.

4.8. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.8.1 Atividade Enzimática de Glutamina Sintetase

A atividade enzimática de GS foi determinada em folhas, raízes e frutos *in vitro*, de acordo com a metodologia utilizada por Cruz *et al.* (2004) em mandioca e já aplicada com sucesso em cafeeiro (POMPELLI *et al.*, 2010). As quantificações foram realizadas em três repetições biológicas (compostas por 3 plantas cada) e cada uma com três triplicatas técnicas. Um grama de material macerado foi homogeneizado em tampão HEPES 50 mM (pH 7,5), NaCl 115 mM, CaCl₂ 1,2 mM, MgCl₂ 1,2 mM, K₂HPO₄ 2,4 mM, 10 mM 2-mercaptoethanol, 2% polyvinilpolypyrrolidone, 1% polyvinilpolypyrrolidone e 1 mM EDTA. As amostras foram então centrifugadas a 12.200 rpm durante 30 min a 4° C.

A atividade de GS foi determinada pelo método biossintético de formação de hidroximato, cada 1 ml de meio de reação continha 100 mM tampão Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM 2-mercaptoethanol, 40 mM MgSO₄, 50 mM glutamato, 10 mM hidroxilamina, 10 mM ATP e 320 µl do extrato obtido anteriormente. A mistura foi incubada por 30 minutos em banho a 30°C, após esse período a reação foi interrompida adicionando FeCl₃ (0.67 M FeCl₃, 0.37 M HCl e 20 % ácido tricloroacético. A quantidade de γ -glutamil-hidroxamato produzido foi determinada através da leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A curva padrão foi construída com concentrações conhecidas de γ -glutamil-hidroxamato.

4.8.2. Proteínas Totais

A quantificação de proteínas totais foi realizada segundo o método de Bradford *et al.* (1976). Aproximadamente 70 mg de material vegetal macerado foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,3), PVP 1% e EDTA 0,1 mM, previamente resfriado a 4°C. Após centrifugação por 10 minutos a 4°C a 7500 RPM, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e mantido no gelo até o momento das análises. As quantificações foram realizadas em três repetições biológicas, com três triplicatas técnicas. Para a construção da curva padrão foi utilizado albumina de soro bovino (BSA).

4.8.3. Vazamento de Eletrólitos

Para as plantas submetidas ao estresse salino, foram realizadas medições de vazamento de eletrólitos para avaliar se essa variaç' ao longo do período de estresse. Essas medições foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por Campos *et al.* (2003) para diversos cultivares de *C. arabica*. As medições foram realizadas em três repetições biológicas e para cada uma foram coletados três discos foliares. Esses discos foram imersos em tubos contendo 10 ml de água Milli-Q e a condutividade elétrica parcial foi aferida 22 horas depois por meio de um condutímetro. A condutividade parcial total foi obtida após deixar os tubos na estufa por 2 horas a 90°C. Os resultados foram expressos como porcentagem da condutividade total.

4.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de qPCR e os resultados das análises bioquímicas foram submetidos a análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo Teste Student-Newman-Keuls (SNK), com nível de significância $p < 0,05$. As análises foram realizadas no programa estatístico Assistat 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2009).

4.10. WESTERN BLOT

A síntese de anticorpo anti-GS e a realização dos ensaios foi realizado pela empresa Rheabiotech (Campinas, São Paulo). O anticorpo foi desenvolvido para se conjugar a uma região comum as duas isoformas de GS, citosólica e plastidial.

Para extração proteica de folhas, raízes e frutos um grama de material vegetal foi homogeneizado em tampão de extração contendo 100mM de Tris-HCl, 50mM de EDTA 1mM PMSF e 1% de PVP40. As amostras foram então incubadas por dez minutos a temperatura ambiente e posteriormente centrifugadas por 10 minutos a 4°C. As proteínas foram separada em SDS-PAGE 12% e transferidos para membrana. A membrana foi incubada com o anticorpo policlonal anti-GS overnight. A visualização se deu com um anticorpo secundário anti-coelho conjugado com fosfatase-alcalina, por meio do método colorimétrico NBT/BCIP.

5. RESULTADOS

5.1. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GS

Uma busca utilizando as GS de *A. thaliana* foi realizada no banco de dados de ESTs Projeto Genoma Café (MONDEGO *et al.*, 2011). Foram encontradas três sequências consenso de GS (Tabela 3), que apresentaram e-value abaixo e-50 e os domínios conservados característicos.

A família gênica da glutamina sintetase possui ponto isoelétrico e massa molecular característicos e auxiliam na identificação e na distinção entre as isoformas citosólicas e plastidiais. Entre as sequências identificadas, uma é plastidial, *CaGS9035*, com ponto isoelétrico igual a 7,05 e massa molecular 47,69 kDa. As demais são citosólicas – *CaGS9226* e *CaGS10376*, com ponto isoelétrico 5,73 e 5,68 e massa molecular 39,228 e 39,102, respectivamente

Os genes *CaGS9035* e *CaGS10376* apresentaram suas sequências codificantes completas, códon iniciador ao códon de termino no projeto brasileiro Genoma Café. O contig *CaGS9226* do projeto brasileiro Genoma Café apresentava quadro de leitura incompleto; no entanto o contig comp_28823, proveniente de RNA-seq, apresentava ORF completa e por isso foi incluída em análises subsequentes.

Análises preliminares do recém-sequenciado genoma de *C. canephora* (DENOEUDE *et al.*, 2014) indicam a presença de 2 genes de GS citosólica e 1 gene de GS plastidial, concordantes com o número de contigs de EST identificados.

Tabela 3: Sequências de GS identificadas em *C. arabica*. pI (ponto isoelétrico), MW (peso molecular).

Contig <i>C. arabica</i>	PI	MW (kDa)	Domínios Conservados	Localização Celular	Contig (bp)	ORF (bp)	Aminoácidos	Ortológo <i>C. canephora</i>
9035	7.05	47.693	Beta Grasp / Domínio Catalítico	Plastidial	1654	1299	432	Cc03_g02940
9226/comp28823	5.73	39.228	Beta Grasp / Domínio Catalítico	Citosólica	1080/1862	1071	356	Cc07_g13290
10376	5.68	39.102	Beta Grasp / Domínio Catalítico	Citosólica	1513	1071	356	Cc04_g05960

5.2. ÁRVORE FILOGENÉTICA

A relação filogenética entre os genes de GS de diferentes espécies foi verificada por meio da construção de árvores filogenéticas. Foi construída uma árvore com as sequências codificantes de GS citosólica (Fig.5) e outra para GS plastidial (Fig. 6). A reconstrução filogenética mostrou que para ambas as isoformas ocorreu a separação em clados distintos entre monocotiledôneas e eudicotiledôneas e que os genes identificados estão muito próximos aos de *C. canephora*, que é uma espécie que provavelmente esteve envolvida na formação do tetraplóide *C. arabica*.

Figura 5: Árvore filogenética de GS citosólica. São mostrados valores de bootstrap acima de 50%.

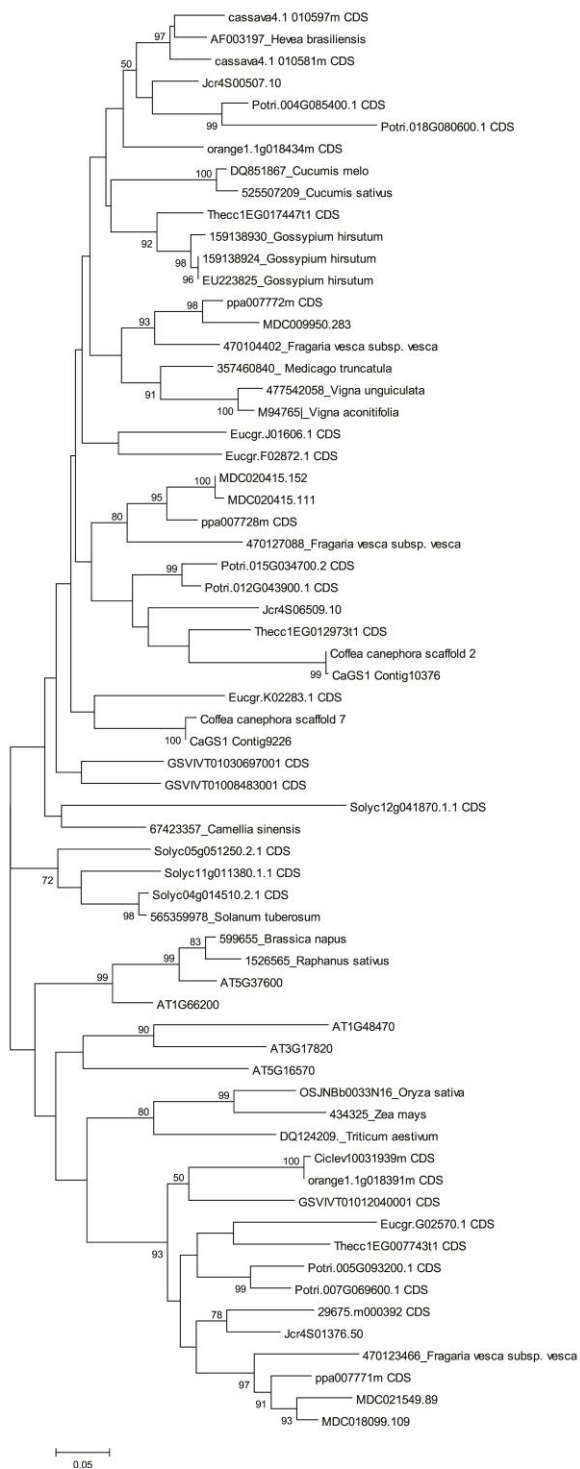
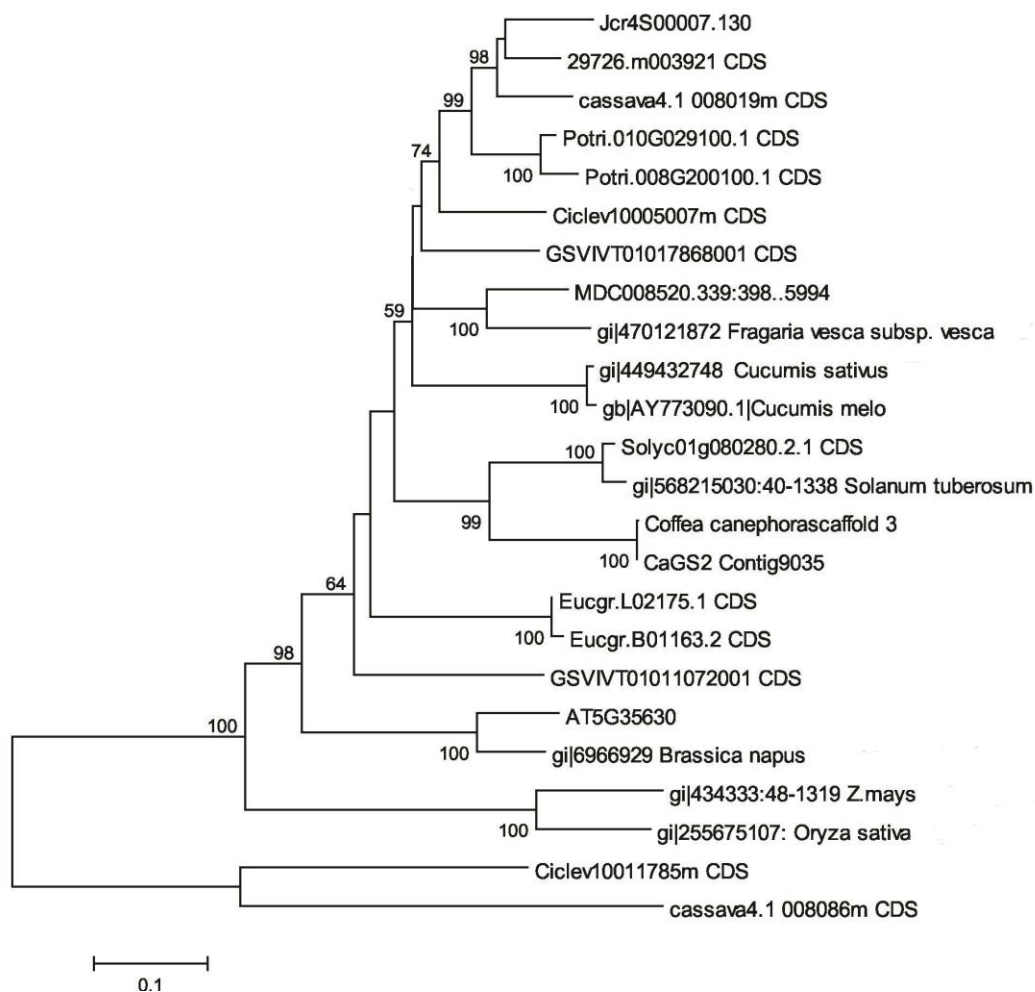


Figura 6: Árvore filogenética de GS plastidial. São mostrados valores de bootstrap acima de 50%.



5.3. ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE GLUTAMINA SINTETASE

A especificidade dos primers utilizados na caracterização transcricional foi verificada por meio da curva de dissociação gerada durante a quantificação. Além disso, amostras aleatórias de cada primer foram enviadas para sequenciamento e os resultados encontram-se na tabela abaixo.

Tabela 4: Sequenciamento dos fragmentos gerados durante caracterização transcricional de genes de GS em duas cultivares de *C. arabica*.

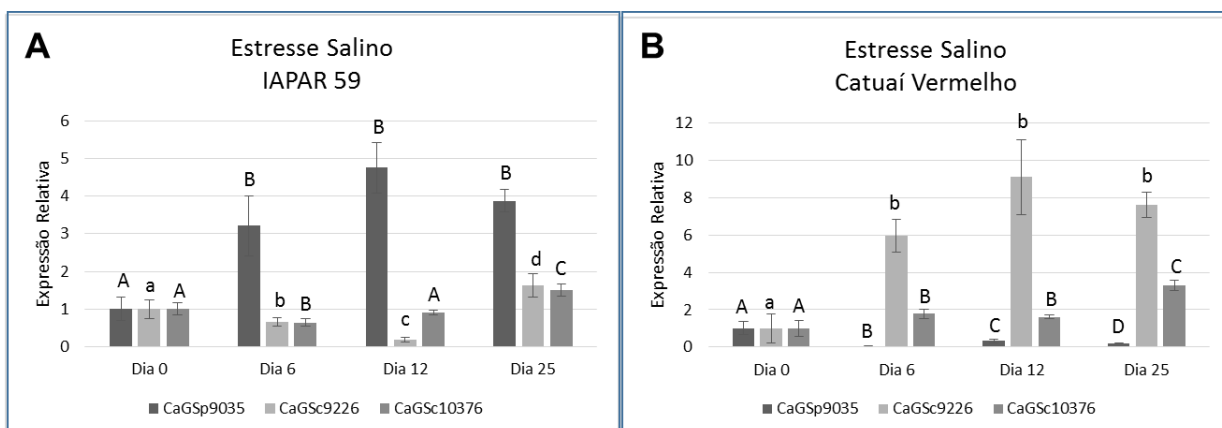
	Contig <i>Coffea arabica</i>	Primer	Amplicon (bp)	Gene <i>Coffea canephora</i>	Ortólogo <i>Arabidopsis thaliana</i>
IAPAR 59	9035	GS2.F/GS2.R	143	Cc03_g02940	AT5G35630
	9226	GS1.F/GS1.R	145	Cc07_g13290	AT1G66200
	10376	GS1.1.F/GS1.1.R	126	Cc04_g05960	AT5G16570
Catuaí Vermelho	9035	GS2.F/GS2.R	143	Cc03_g02940	AT5G35630
	9226	GS1.F/GS1.R	145	Cc07_g13290	AT1G66200
	10376	GS1.1.F/GS1.1.R	126	Cc04_g05960	AT5G16570

Os índices de similaridades obtidos entre os fragmentos sequenciados e os genes de *C. canephora* foram superiores a 96%, garantindo assim a especificidade dos primers com o seu gene alvo.

5.3.1 Estresse Salino

O estresse salino induziu diferentes respostas transcricionais entre os membros da família gênica GS nas cultivares analisadas. Para a cultivar IAPAR 59, observou-se um aumento significativo da isoforma plastidial (CaGS9035) ao longo do estresse, enquanto a isoforma citosólica foi reprimida ou manteve seus índices constante. Para a cultivar Catuaí Vermelho, nota-se uma elevação nos índices da isoforma citosólica 9226 (Fig 7).

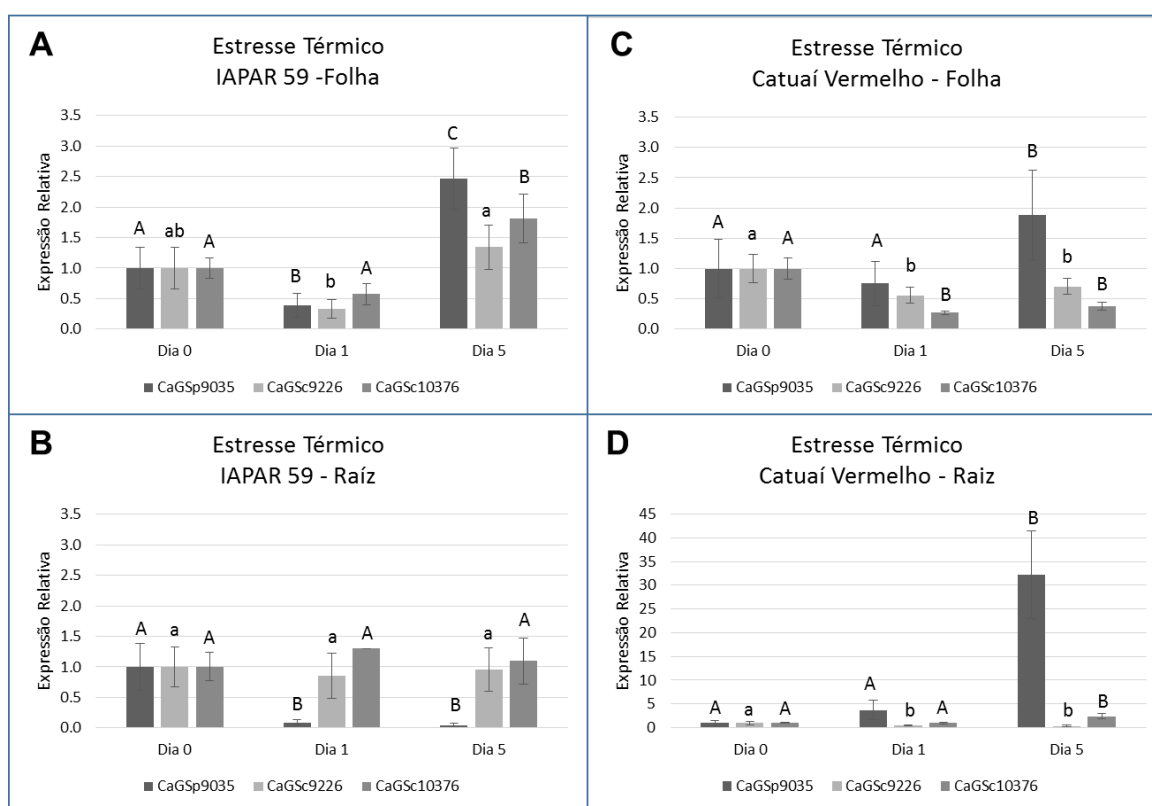
Figura 7: Padrão transcricional dos genes de GS em folhas de duas cultivares de *Coffea arabica* submetidas a altas concentrações de NaCl. **A** – IAPAR 59. **B** – Catuaí Vermelho. Análises estatísticas foram realizadas pelo teste SNK ($p < 0,05$) e comparam a média ao longo dos diferentes dias de estresse. As letras maiúsculas e minúsculas são utilizadas apenas para facilitar a visualização e indicam a comparação entre os genes ao longo do período de estresse.



5.3.2. Estresse Térmico

Nos primeiros dias de estresse, observou-se que em folhas há uma diminuição significativa nos índices transcricionais de todas as isoformas, seguido por um aumento da isoforma plastidial em ambas as cultivares. Já em raízes, há uma intensa diminuição na quantidade de transcritos da isoforma plastidial raízes de IAPAR 59, que não é observado em Catuaí Vermelho, onde ocorre uma grande elevação dessa isoforma no quinto dia de estresse (Fig. 8).

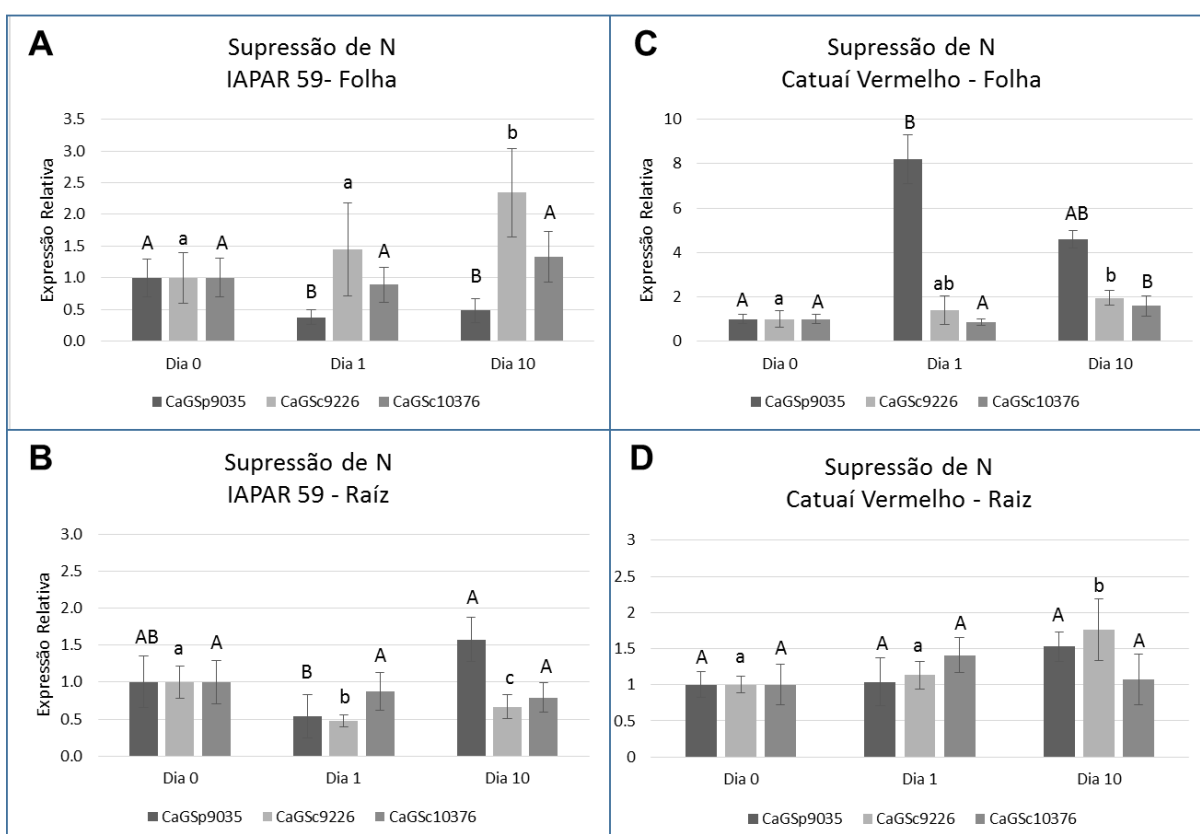
Figura 8: Padrão transcricional de GS em folhas e raízes de duas cultivares de *Coffea arabica* submetidas a altas temperaturas. **A** – Folha IAPAR 59. **B** - Raiz IAPAR 59. **C** – Folha Catuaí Vermelho. **D** – Raiz Catuaí Vermelho. Análises estatísticas foram realizadas pelo teste SNK ($p < 0,05$) e comparam a média de cada gene ao longo dos diferentes dias de estresse. As letras maiúsculas e minúsculas são utilizadas apenas para facilitar a visualização e indicam a comparação entre os genes ao longo do período de estresse.



5.3.3. Supressão de Nitrogênio

Em folhas de IAPAR 59 submetidas a ausência de fontes nitrogenadas houve uma diminuição na expressão relativa da isoforma plastidial, associado a uma elevação nos índices de GS9226 no décimo dia. Já em Catuaí Vermelho, houve uma modulação da isoforma plastidial durante o período de estresse em folhas. Para raízes, a isoforma citosólica (GS9226) sofreu alterações de acordo com o decorrer do experimento (Fig. 9).

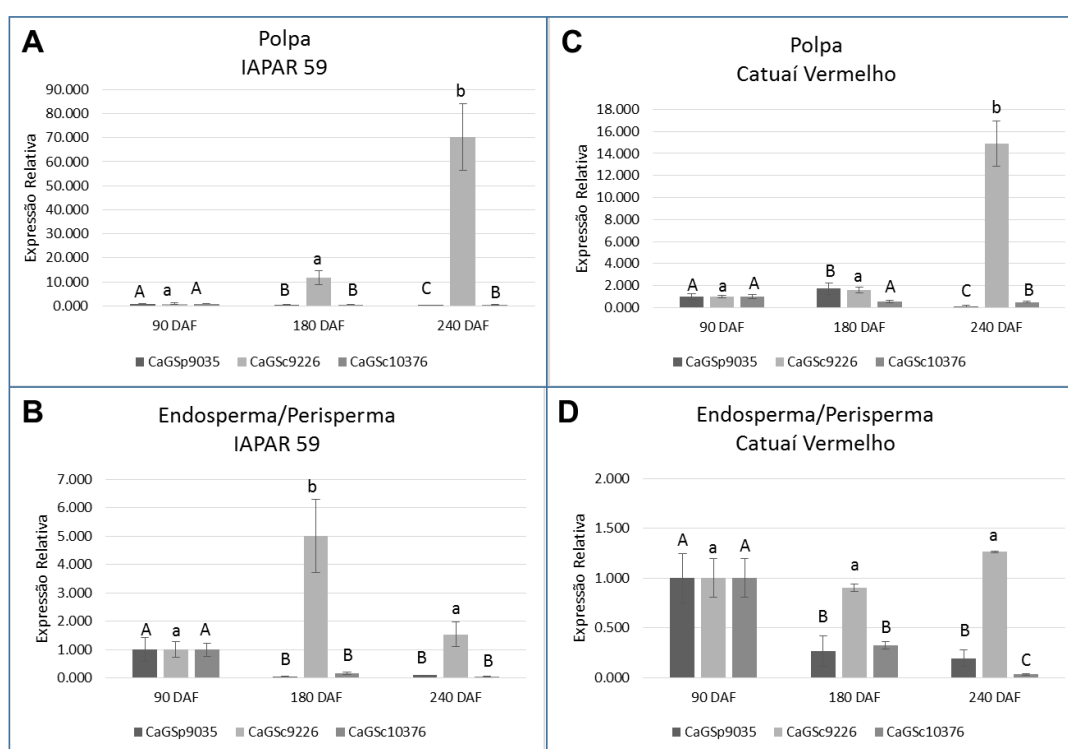
Figura 9: Padrão transcricional de GS em folhas e raízes de duas cultivares de *Coffea arabica* sob supressão de nitrogênio. **A** – Folha IAPAR 59. **B** - Raiz IAPAR 59. **C** – Folha Catuaí Vermelho. **D** – Raiz Catuaí Vermelho. Análises estatísticas foram realizadas pelo teste SNK ($p < 0,05$) e comparam a média de cada gene ao longo dos diferentes dias de estresse. As letras maiúsculas e minúsculas são utilizadas apenas para facilitar a visualização e indicam a comparação entre os genes ao longo do período de estresse.



5.3.4. Frutos

Frutos de *C. arabica* apresentaram elevados índices transcricionais da isoforma citosólica (GS9226) nos tecidos analisados e em ambas as cultivares. Sendo a principal isoforma modulada durante o processo de desenvolvimento dos frutos, o que sugere que essa enzima pode apresentar um importante papel nessa etapa (Fig. 10).

Figura 10: Padrão transcricional dos genes de GS em diferentes tecidos de frutos de *Coffea arabica* em diferentes fases de desenvolvimento. **A** – Polpa IAPAR 59. **B** – Endosperma/perisperma IAPAR 59. **C** – Polpa Catuaí Vermelho. **D** – Endosperma/perisperma Catuaí Vermelho. Análises estatísticas foram realizadas pelo teste SNK ($p < 0,05$) e comparam a média de cada gene ao longo dos diferentes dias de estresse. As letras maiúsculas e minúsculas são utilizadas apenas para facilitar a visualização e indicam a comparação entre os genes ao longo do período de estresse.



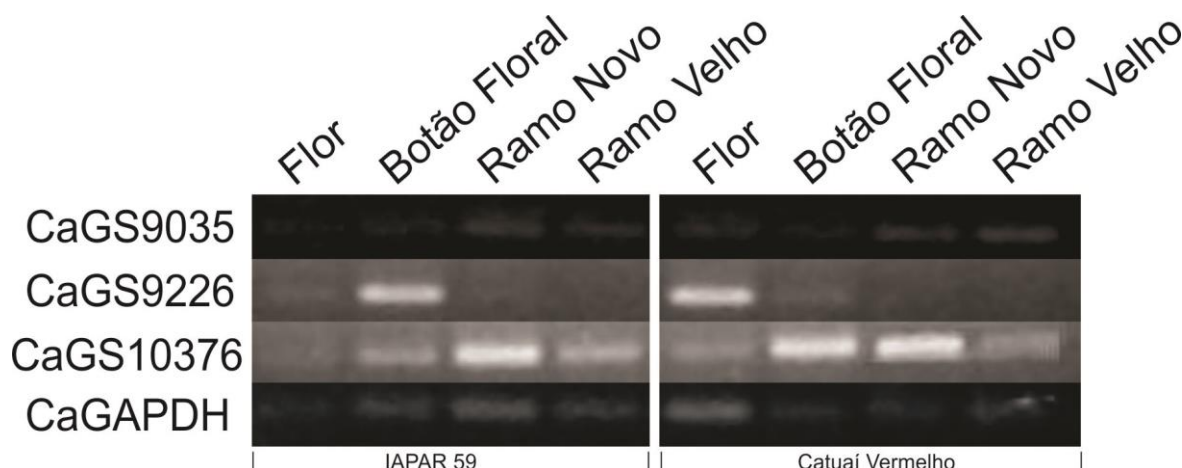
Durante a análise dos dados, foi observado um pico inespecífico na curva de dissociação de endosperma/perisperma em 240 DAF para o gene CaGS9035. Esse fato pode estar relacionado com a presença de um segundo gene codificante para isoforma plastidial no genoma de *C. arabica* e serão realizadas novas análises para identificação e caracterização desse possível gene.

5.3.5. Padrão Transcricional em Botão Floral, Flor e Ramos

Para avaliar o padrão transcricional dos genes de GS em botões florais, flores e ramos em diferentes estágios de desenvolvimento, foi realizado um RT-PCR semi-

quantitativo de plantas das cultivares Catuaí Vermelho e IAPAR 59 cultivadas em casa de vegetação.

Figura 11: RT-PCR semi-quantitativo dos genes de GS nos diferentes tecidos do cafeeiro: flor, botão flora, ramo novo e ramo velho. Foi utilizado o gene de referência *GAPDH* (DE CARVALHO *et al.*, 2013) como normalizador.



A isoforma plastidial (*CaGS9035*) é transcricionalmente ativa em todos os diferentes órgãos analisado e nas duas cultivares. De maneira semelhante, a isoforma citosólica (*CaGS10376*) também é ativa em todos os tecidos, apresentando índice de expressão um pouco mais elevado em ramos. Já a isoforma *CaGS9226* apresenta expressão preferencial somente em flores e botões florais, em ambas cultivares.

5.4. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

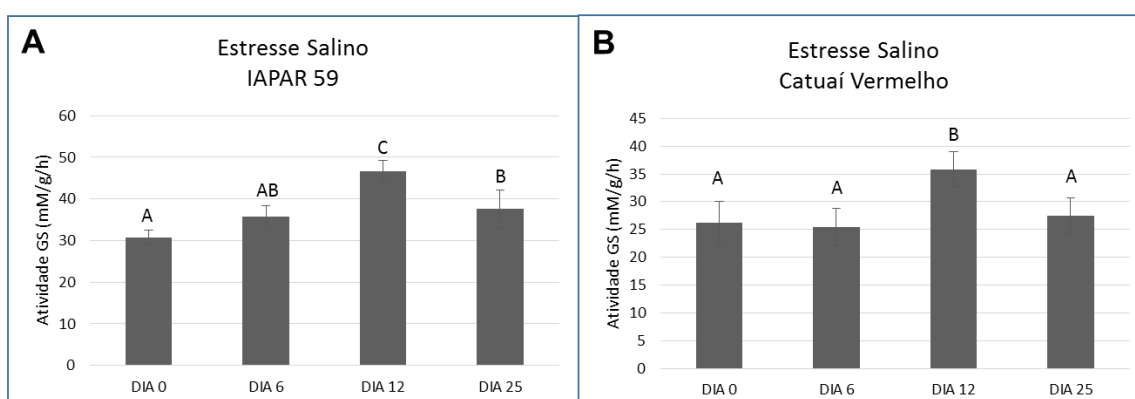
5.4.1. Atividade *in vitro* da Glutamina Sintetase

5.4.1.1. Estresse salino

A atividade enzimática de GS mostrou-se semelhante para ambos genótipos analisados. Notou-se um aumento de atividade no décimo segundo dia após o início do estresse, que está de acordo com o observado no perfil transcricional. Nesse ponto, IAPAR59 apresentou aumento no nível de GS2, enquanto Catuaí Vermelho apresentou aumento de uma das isoformas citosólicas,

mas em ambos os casos o pico no perfil transcricional refletiu-se em um aumento da atividade enzimática. Os demais pontos não apresentaram significância estatística, mas ao comparar os resultados com o nível de transcrição, observa-se que há uma variação entre as isoformas, o que contribui para a manutenção dos valores de atividade (Fig. 12).

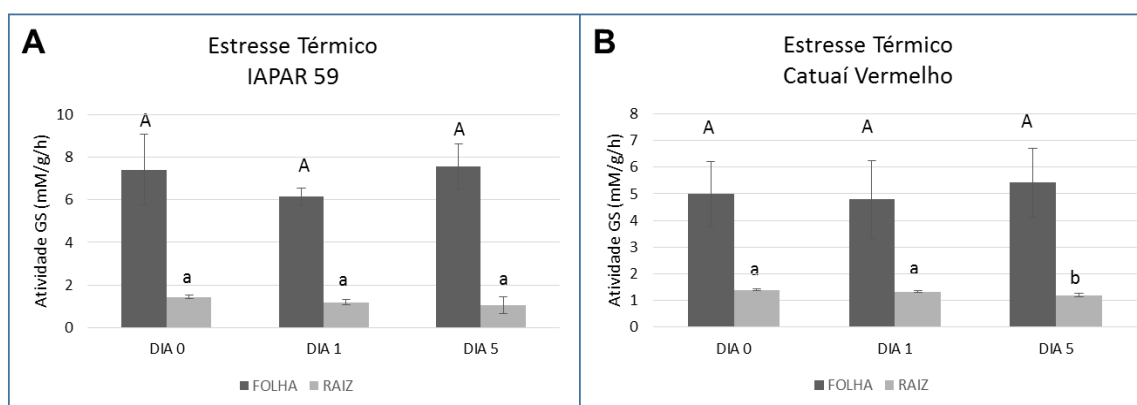
Figura 12: Atividade *in vitro* de Glutamina Sintetase em folhas de dois genótipos de *C. arabica* expostos altas concentrações de NaCl. **A** – IAPAR 59. **B** – Catuaí Vermelho. Análises estatísticas foram realizadas pelo teste SNK ($p < 0,05$) e comparam a média da atividade enzimática ao longo dos diferentes dias de estresse. As letras maiúsculas e minúsculas são utilizadas apenas para facilitar a visualização e indicam a comparação da atividade enzimática ao longo do período de estresse.



5.4.1.2. Estresse térmico

Apesar de causar grandes modificações no padrão transcricional dos genes de GS, o estresse por altas temperaturas parece não influenciar na atividade da enzima. Para IAPAR 59 e Catuaí Vermelho, em tecidos foliares e raízes, o único ponto que apresentou diferença significativa foi raiz de Catuaí Vermelho após cinco dias de estresse (Fig. 13). Os maiores índices de atividade foram encontrados em folhas.

Figura 13: Atividade *in vitro* de Glutamina Sintetase em folhas e raízes de dois genótipos de *C. arabica* expostos altas temperaturas. **A** – IAPAR 59. **B** – Catuaí Vermelho. Análises estatísticas foram realizadas pelo teste SNK ($p < 0,05$) e comparam a média da atividade enzimática ao longo dos diferentes dias de estresse. As letras maiúsculas e minúsculas são utilizadas apenas para facilitar a visualização e indicam a comparação da atividade enzimática ao longo do período de estresse.

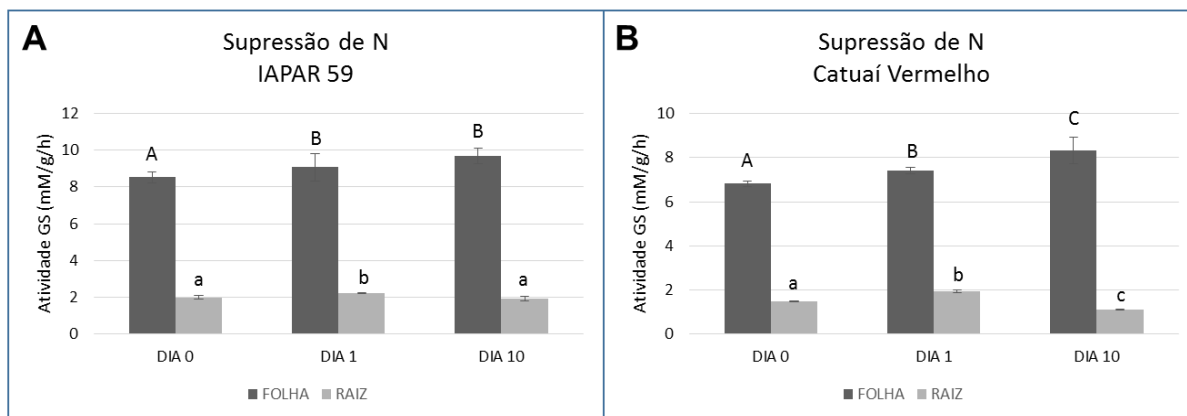


5.4.1.3. Supressão de nitrogênio

A ausência de fontes nitrogenadas afetou a atividade enzimática de GS, visto que essa é uma enzima considerada chave na assimilação de N. Em folhas de IAPAR 59 foi observado um aumento no nível de atividade nos dias 1 e 10 em comparação ao controle e em raízes um pequeno aumento no dia 1 (Fig. 14A). Já em Catuaí Vermelho, a atividade de GS aumentou em folhas conforme aumentou o período de ausência de N; em raízes também houve um aumento no dia 1, no entanto, este foi seguido por uma redução significativa no dia 10 (Fig. 14B). Ao comparar esses resultados com o obtido no perfil transcricional, nota-se que o aumento de atividade em folhas no dia 1 é provocado pela isoforma CaGS9226 em IAPAR 59, e pela isoforma CaGS9035 em Catuaí Vermelho. A diminuição da atividade em raiz de Catuaí Vermelho no dia 5, deve-se ao fato da isoforma plastidial, que no padrão transcricional apresenta valores próximos a zero nesse ponto.

Figura 14: Atividade *in vitro* de Glutamina Sintetase em folhas e raízes de dois genótipos de *C. arabica* sob supressão de N. **A** – IAPAR 59. **B** – Catuaí Vermelho.

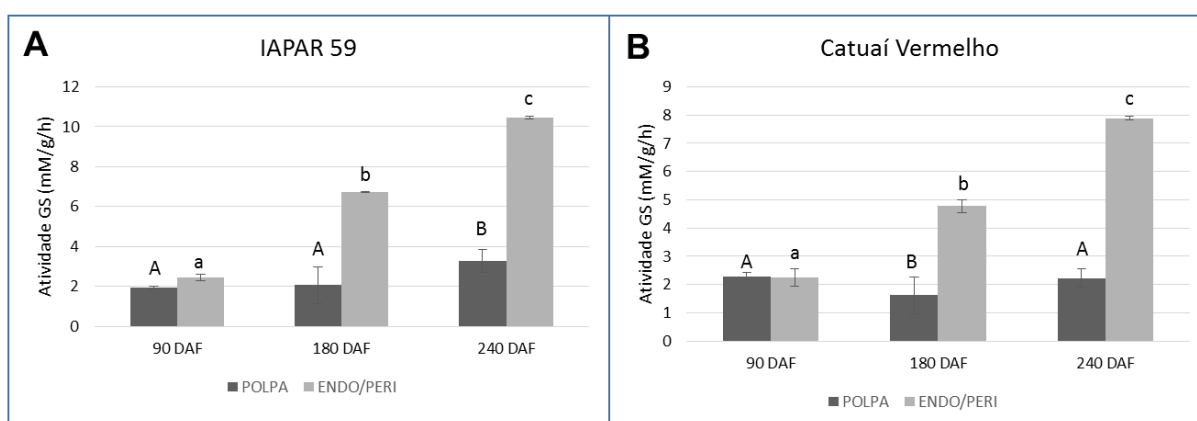
Análises estatísticas foram realizadas pelo teste SNK ($p < 0,05$) e comparam a média da atividade enzimática ao longo dos diferentes dias de estresse. As letras maiúsculas e minúsculas são utilizadas apenas para facilitar a visualização e indicam a comparação entre os genes ao longo do período de estresse.



5.4.1.4. Frutos

O processo de desenvolvimento de frutos é característico por ser um processo de alta mobilização de nutrientes e fotoassimilados, por esse motivo espera-se uma grande participação de GS atuando na assimilação e remobilização de N. No início do desenvolvimento (90 DAF), a atividade observada foi próxima para os dois tecidos analisados. No entanto, ao longo do processo observou-se um aumento em endosperma/perisperma nos dois genótipos, enquanto em polpa os valores praticamente não se alteraram (Fig. 15). Desse modo, mostra-se claramente o processo de regulação pós transcricional de GS, uma vez que, em polpa foram observados picos de expressão durante as fases de desenvolvimento, que não se refletiram em alterações da atividade enzimática.

Figura 15: Atividade *in vitro* de Glutamina Sintetase em diferentes tecidos de frutos de *Coffea arabica* em diferentes fases de desenvolvimento. **A** – IAPAR 59. **B** – Catuaí Vermelho. Análises estatísticas foram realizadas pelo teste SNK ($p < 0,05$) e comparam a média da atividade enzimática ao longo dos diferentes dias de estresse. As letras maiúsculas e minúsculas são utilizadas apenas para facilitar a visualização e indicam a comparação entre os genes ao longo do período de desenvolvimento.

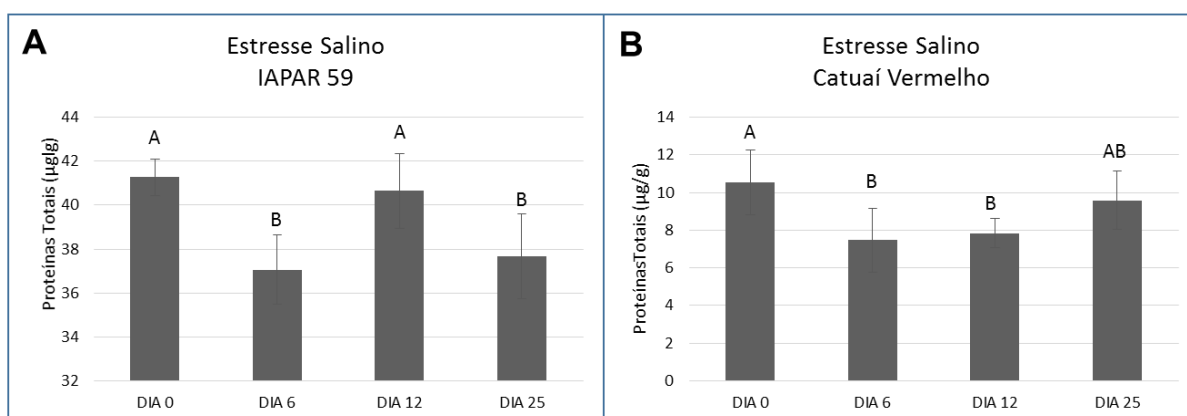


5.4.2. Concentração de Proteínas Totais

5.4.2.1. Estresse salino

A concentração de proteínas totais em plantas submetidas a salinidade mostrou padrão bem diferentes em relação aos dois genótipos. As plantas controle de IAPAR 59 apresentaram um total de proteínas aproximadamente quatro vezes superior às plantas controle de Catuaí Vermelho (Fig. 16A e B). Essa discrepância está relacionada a diferença de desenvolvimento apresentada entre os genótipos, onde IAPAR 59 além de apresentar um maior tamanho, apresentou maior produção de ramos secundários.

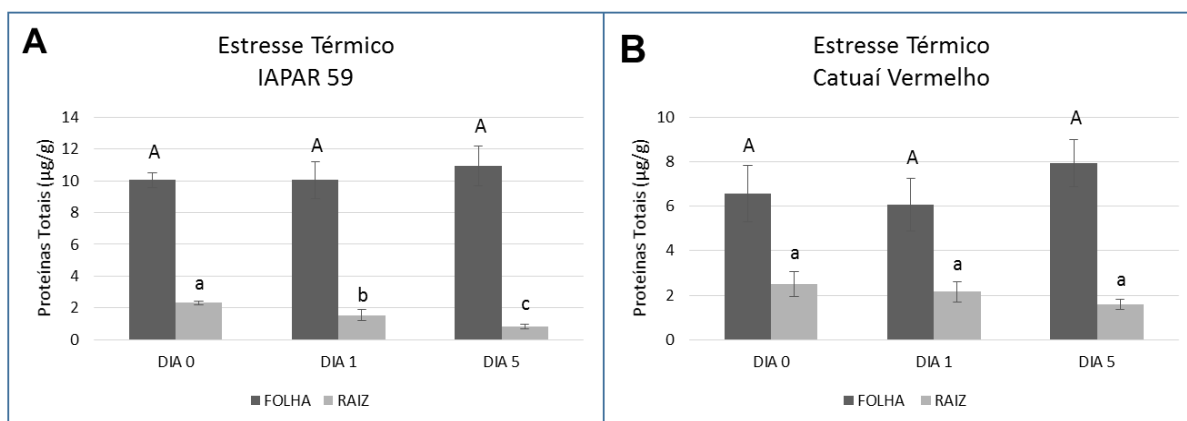
Figura 16: Quantificação de proteínas totais em folhas de dois genótipos de *C. arabica* submetidos a altas concentrações de NaCl. **A** – IAPAR 59. **B** – Catuaí Vermelho. Análises estatísticas foram realizadas pelo teste SNK ($p < 0,05$) e comparam a média da concentração de proteínas ao longo dos diferentes dias de estresse. As letras maiúsculas e minúsculas são utilizadas apenas para facilitar a visualização e indicam a comparação entre a concentração de proteínas ao longo do período de estresse.



5.4.2.2. Estresse térmico

Os tecidos foliares de IAPAR 59 e Catuaí Vermelho não apresentaram diferenças significativas nos índices de proteínas totais em função dos dias de estresse. As maiores quantidades de proteínas foram encontradas em folhas. Raízes de ambos os genótipos apresentaram uma diminuição de seu conteúdo de proteínas em função do tempo de estresse, apesar dessa diferença não ser estatisticamente significativa em Catuaí Vermelho (Fig. 17).

Figura 17: Quantificação de proteínas totais em folhas e raízes de dois genótipos de *C. arabica* expostos a altas temperaturas. **A** – IAPAR 59. **B** – Catuaí Vermelho. Análises estatísticas foram realizadas pelo teste SNK ($p < 0,05$) e comparam a média da concentração de proteínas ao longo dos diferentes dias de estresse. As letras maiúsculas e minúsculas são utilizadas apenas para facilitar a visualização e indicam a comparação entre a concentração de proteínas ao longo do período de estresse.

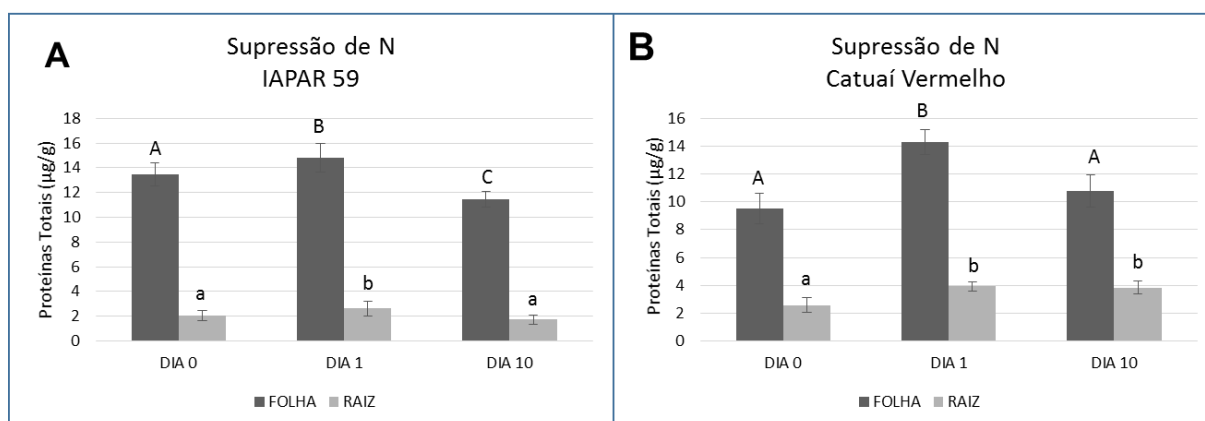


5.4.2.3. Supressão de nitrogênio

A retirada de fontes nitrogenadas induziu alterações no conteúdo de proteínas totais nos diferentes tecidos e genótipos analisados. Para tecidos foliares do genótipo IAPAR 59, foi observado um aumento de proteínas no Dia 1, seguido por uma redução no Dia 10. Para raízes foi encontrado um padrão semelhante ao de folhas, um aumento no Dia 1, seguido por uma redução no Dia 10 (Fig. 18A).

No genótipo Catuaí Vermelho, também houve um aumento no conteúdo de proteínas de folhas no Dia 1, seguido por uma diminuição no Dia 10. Raízes demonstraram um aumento em relação ao Dia 0, que se manteve estável entre os dias 1 e 10 (Fig. 18B).

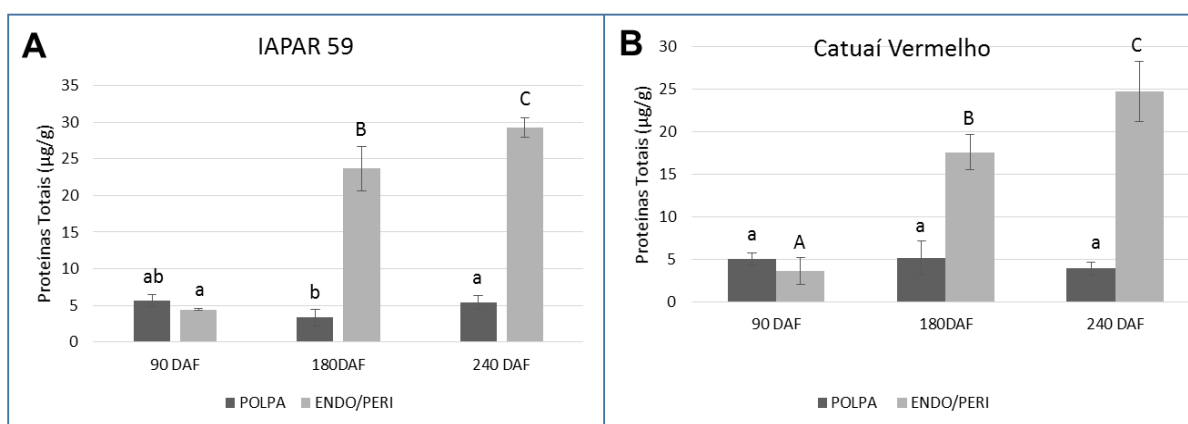
Figura 18: Quantificação de proteínas totais em folhas e raízes de dois genótipos de *C. arabica* sob supressão de nitrogênio. **A** – IAPAR 59. **B** – Catuaí Vermelho. Análises estatísticas foram realizadas pelo teste SNK ($p < 0,05$) e comparam a média da concentração de proteínas ao longo dos diferentes dias de estresse. As letras maiúsculas e minúsculas são utilizadas apenas para facilitar a visualização e indicam a comparação entre a concentração de proteínas ao longo do período de estresse.



5.4.2.4. Frutos

Por serem tecidos de reserva, a concentração de proteínas em frutos aumenta significativamente ao longo do processo de desenvolvimento, tanto em IAPAR 59, quanto em Catuaí Vermelho. Esse aumento se deve principalmente pelo acúmulo de proteínas no endosperma/perisperma, que será responsável posteriormente por fornecer suprimentos para a germinação das sementes. Enquanto em polpa, os valores são praticamente os mesmo em todas as fases analisadas (Fig. 19).

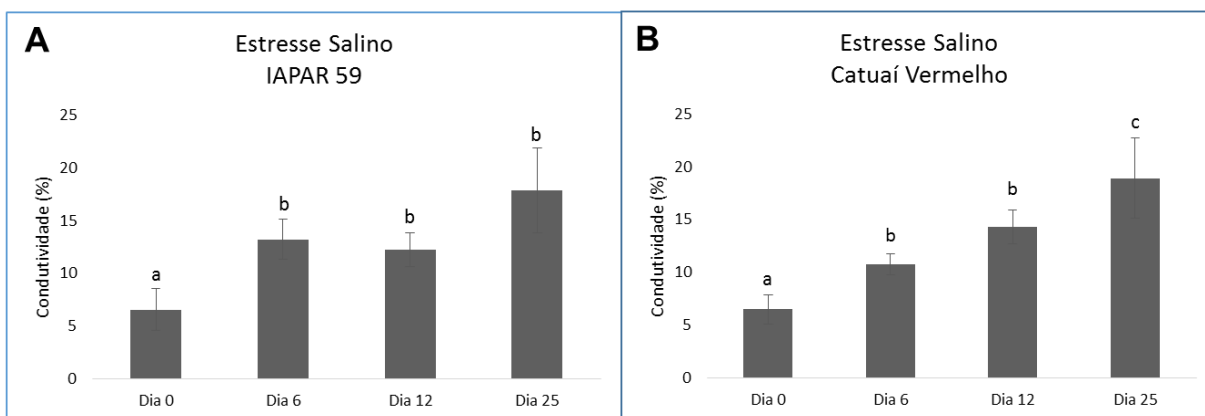
Figura 19: Quantificação de proteínas totais em diferentes tecidos de frutos de *Coffea arabica* em diferentes fases de desenvolvimento. **A** – IAPAR 59. **B** – Catuaí Vermelho. Análises estatísticas foram realizadas pelo teste SNK ($p < 0,05$) e comparam a média da concentração de proteínas ao longo dos diferentes dias de estresse. As letras maiúsculas e minúsculas são utilizadas apenas para facilitar a visualização e indicam a comparação entre a concentração de proteínas ao longo do período de desenvolvimento.



5.4.4. Vazamento de Eletrólitos

Para as plantas submetidas ao estresse salino, foi avaliado o vazamento de eletrólitos em cada um dos diferentes tempos de coleta. Para as duas cultivares, verificou-se um aumento na porcentagem de condutividade conforme aumentava o período de estresse da planta, com exceção do Dia 12 em IAPAR 59, onde a condutividade apresentou valores inferiores ao ponto anterior (Fig. 20). A porcentagem de condutividade nessa cultivar apresentou diferença estatística significativa quando comparados os dias 6, 12 e 25 com o Dia 0. Para Catuaí Vermelho, houve diferença significativa entre os dias 6 e 12 em comparação ao dia 0 e entre o Dia 25 e os demais pontos.

Figura 20: Condutividade elétrica (%) em discos foliares de duas cultivares de *C. arabica* submetidas a estresse salino. **A** – IAPAR 59. **B** – Catuaí Vermelho. Análises estatísticas foram realizadas pelo teste SNK ($p < 0,05$) e comparam a média de condutividade total ao longo dos diferentes dias de estresse. As letras maiúsculas e minúsculas são utilizadas apenas para facilitar a visualização

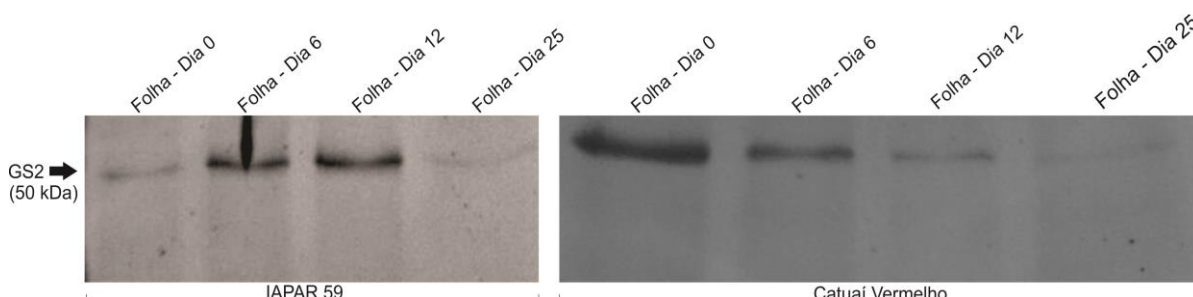


5.5. QUANTIFICAÇÃO PROTEICA DE GS

5.5.1. Estresse Salino

As plantas de *C. arabica* submetidas a altas concentrações de salinidade apresentaram predominantemente a isoforma plastidial de GS em folhas. Nas duas cultivares analisadas, percebe-se diferentes padrões de resposta. Em IAPAR 59, a quantidade de GS2 é elevada ao decorrer do estresse. Já em Catuaí Vermelho, conforme avança o tempo em que as plantas estão submetidas ao estresse, a concentração de GS2 sofre uma diminuição constante (Fig. 21).

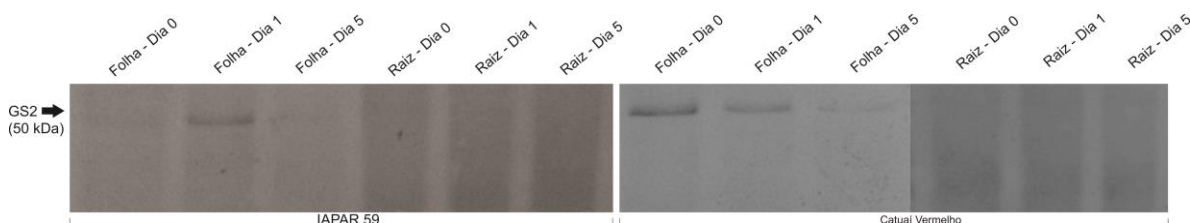
Figura 21: Análise de Western blot para polipeptídios de GS1 e GS2 em folhas de *C. arabica* submetidas a altas concentrações de salinidade.



5.5.2. Estresse Térmico

A temperatura influenciou na concentração de GS em folhas, uma vez que em raízes não foi observada a presença de nenhuma das isoformas em nenhuma das condições analisadas. Em folhas de IAPAR 59, nota-se uma maior presença de GS2 um dia após a elevação da temperatura. Já em Catuaí Vermelho, observa-se que conforme os dias de estresse evoluem, a taxa de GS2 sofre uma contínua diminuição (Fig. 22).

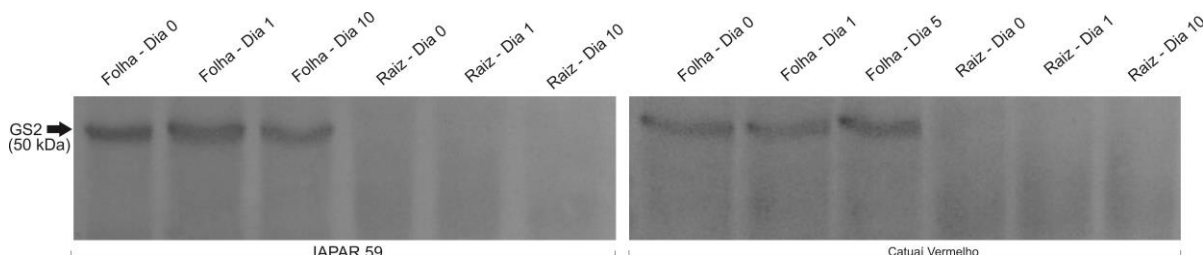
Figura 22: Análise de Western blot para polipeptídios de GS1 e GS2 em folhas e raízes de *C. arabica* submetidas a altas temperaturas.



5.5.3. Supressão de Nitrogênio

A ausência de fontes nitrogenada provocou uma quantidade de GS2 relativamente constante em folhas nas duas cultivares, tanto em IAPAR 59, quanto em Catuaí Vermelho, percebe-se que durante todo o período de estresse, o nível de GS2 não sofre grandes alterações (Fig. 23). Já em raízes, a presença de nenhuma das duas isoformas é observada.

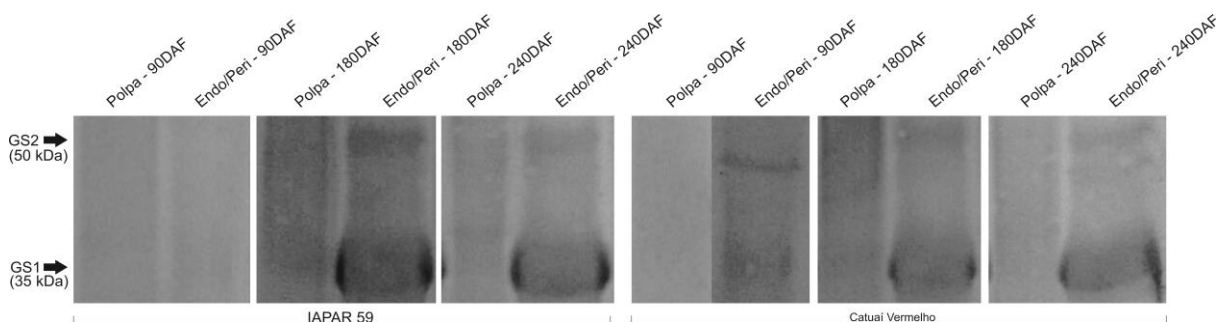
Figura 23: Análise de Western blot para polipeptídios de GS1 e GS2 em folhas e raízes de *C. arabica* com ausência de fontes nitrogenadas.



5.5.4. Frutos

Durante o processo de desenvolvimento dos frutos a participação de ambas isoformas de GS, citosólica e plastidial, foram observadas. Em frutos da cultivar IAPAR 59, há a presença de GS1 e GS2 em endosperma/perisperma a partir dos 180 DAF e aos 240DAF. Já em Catuaí Vermelho, nota-se a presença das duas enzimas já aos 90DAF em endosperma/perisperma e continua crescendo ao longo do desenvolvimento dos frutos. Em nenhuma cultivar observou-se a presença de isoformas de GS em polpa (Fig.24).

Figura 24: Análise de Western blot para polipeptídios de GS1 e GS2 ao longo do desenvolvimento de frutos de *C. arabica* com ausência de fontes nitrogenadas.



6. DISCUSSÃO

Inicialmente, foram identificadas três genes de GS em um conjunto de sequências expressas de cafeeiro. Entre as isoformas identificadas, uma é plastidial e as duas outras citosólicas. No entanto, na maioria das espécies em que essa família gênica foi descrita, o número de genes para a isoforma citosólica varia entre três e cinco, e para a isoforma plastidial apenas um em grande parte das espécies (SINGH & GHOSH, 2013). Diversas características foram determinadas *in silico* para reforçar a correta identificação dos genes obtidos e estão de acordo com o descrito para GS em diferentes espécies. Em *Populus trichocarpa*, os valores encontrados para massa molecular das isoformas plastidiais é aproximadamente 47 kDa, e o ponto isoelétrico 6,48. Já para as enzimas citosólicas, esse valor é em torno de 39 kDa, e o ponto isoelétrico entre 5,1 e 5,9 (CASTRO-RODRIGUEZ et al., 2011). Esses valores estão próximos dos encontrados para os genes identificados em *Coffea arabica* e reforçam a correta identificação desses genes.

Estresses abióticos causados por altas temperaturas, salinidade e déficit nutricional afetam diretamente o desenvolvimento e produtividade das plantas (CHINNUSAMY et al., 2015). Devido a esse fato, foram avaliados o padrão transcricional de GS e alguns aspectos bioquímicos em plantas de *C. arabica*, submetidas a diferentes condições de estresses abióticos. Nas plantas expostas a altas concentrações de salinidade, as principais modulações provocadas no perfil transcricional foram em função do aumento na expressão relativa da isoforma plastidial em IAPAR 59, e da isoforma citosólica em Catuaí Vermelho. Notou-se um aumento significativo na atividade enzimática de GS no décimo segundo dia de estresse e é compatível com o pico observado no perfil transcricional. A influência da salinidade no metabolismo de nitrogênio já foi relatada em tomate, onde plantas mantidas em altas concentrações de NaCl tiveram seus índices de atividades de GS reduzidos, devido à baixa disponibilidade de glutamato, provocada pelo estresse (DEBOUBA et al., 2006a). Em um outro estudo, realizado com plântulas de tomate, foi encontrada apenas a isoforma plastidial em folhas cultivadas com NaCl, similar ao padrão encontrado para *C. arabica*. Neste estudo também observou-se uma redução da atividade enzimática e as principais modulações foram provocadas pala

isoforma plastidial (DEBOUBA *et al.*, 2006b). Em situações de estresse, a GS plastidial está associada a manutenção da fotorrespiração, e já foi relatada sua relação com a maior tolerância a estresse salino em diversas espécies (HOSHIDA *et al.*, 2000; HOSSAIN *et al.*, 2012).

O estresse térmico teve maior influência na expressão relativa da isoforma plastidial em folhas, onde após sofrer uma redução nos primeiros dias de estresse aumentos novamente seus índices. Em raízes, observa-se uma diferença no perfil de expressão entre os genótipos analisados em relação a GS, uma vez que, IAPAR 59 apresenta uma redução em todos os pontos analisados, enquanto Catuaí Vermelho mostra um aumento significativo no quinto dia. Apesar dessas variações, não foram encontradas diferenças significativas na concentração de proteínas totais e na atividade enzimática de GS. Apesar de o número de trabalhos analisando a ação de altas temperaturas na expressão gênica de GS e em sua atividade ser bastante limitado, a relação dessas enzimas com a tolerância ao frio já foi documentada. Em um estudo com arroz, plantas transgênicas que com superexpressão de GS2 mostraram-se mais tolerantes a baixas temperaturas (HOSHIDA *et al.*, 2000. Devido ao fato dessa enzima estar relacionada com o mecanismo de fotorrespiração, as plantas podem apresentar uma melhor eficiência fotossintética em períodos de estresse e conseqüentemente mais tolerantes a estresses abióticos.

A ausência de fontes nitrogenadas foi mais notada novamente entre as cultivares pela resposta da isoforma plastidial e da citosólica (9226). A taxa de atividade enzimática, a quantidade de clorofila e a concentração de proteínas totais não sofreram grandes variações ao longo do período de estresse. Nota-se um aumento nos índices de proteínas totais em raízes, que está relacionada com a elevação da atividade transcricionais das enzimas ao longo do estresse. Esse aumento pode estar relacionado ao processo de remobilização de nutrientes (Xu *et al.*, 2012), que é um processo com alta participação de isoformas de GS, e pode ser evidenciado tanto pelo aumento transcricional, pela concentração de proteínas e pelo aumento da atividade enzimática observado no primeiro dia sem compostos nitrogenados.

Durante o processo de desenvolvimento de frutos, há uma grande remobilização de metabólitos, nutrientes e fotoassimilados para estes órgãos em formação e por isso são considerados como dreno. Quando o crescimento cessa,

tem-se início a fase de maturação, e durante essa etapa grandes quantidades de nitrogênio orgânico é liberado e re-assimilado diversas vezes (SCARPECI et al., 2007).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram a participação efetiva dos genes de GS durante o enchimento dos grãos. Em todas as fases analisadas, 90, 180 e 240 DAF, foram observadas atividade enzimática de GS principalmente em endoperma/perisperma que é o tecido de reserva para germinação. Por se tratar de um local de armazenamento de metabólitos, a quantidade de proteínas totais nesse tecido aumentou consideravelmente durante esse período e os valores máximos foram observados aos 240 DAF, final do processo de amadurecimento.

Em um estudo realizado com frutos de tomate, Scarpecci et al (2007) demonstraram que as isoformas de GS são expressos em frutos verdes e maduros e que o estado nutricional das plantas influencia nesse padrão de expressão. Em frutos cultivados em condições normais de N, houve expressão de GS somente em frutos verdes, já em plantas com altas concentrações de N, houve expressão em frutos verdes e maduros. Esses resultados mostram que essa enzima está envolvida no processo de assimilação e remobilização de N durante o crescimento e desenvolvimento de frutos.

7. CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho referente aos membros parciais da família gênica de GS em *C. arabica* sugerem a presença de um mecanismo de regulação transcricional. Além disso, podemos concluir que respondem diferentemente a diferentes estímulos, sendo que tais modificações se dão em função do estresse abióticos e do genótipo analisado. Já a atividade enzimática e proteínas totais sofreram apenas alterações pontuais em decorrência do estresse aplicado.

A isoforma citosólica (CaGS9226) parece ser a isoforma expressa durante o desenvolvimento de frutos, visto que em ambas as cultivares esse foi o gene que sofreu as maiores as maiores modificações transcricionais em todos os tecidos de fruto analisados e o aumento nos seus índices de expressão revelam uma elevação no conteúdo de proteínas totais e na atividade enzimática de GS durante essa fase.

Com isso, esse trabalho fornece novas perspectivas acerca da assimilação de nitrogênio em cafeeiro e a importância dessas enzimas para o crescimento, desenvolvimento e reprodução da planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, Stephen F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ANTHONY, François et al. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, n. 5, p. 894-900, 2002.
- ARNON, Daniel I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant physiology**, v. 24, n. 1, p. 1, 1949.
- AVILA-OSPINA, Liliana et al. The identification of new cytosolic glutamine synthetase and asparagine synthetase genes in barley (*Hordeum vulgare* L.), and their expression during leaf senescence. **Journal of experimental botany**, p. erv003, 2015.
- BATEMAN, Alex et al. The Pfam protein families database. **Nucleic acids research**, v. 32, n. suppl 1, p. D138-D141, 2004.
- BERNARD, Stéphanie M.; HABASH, Dimah Z. The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. **New Phytologist**, v. 182, n. 3, p. 608-620, 2009.
- BETTI, Marco et al. Glutamine synthetase in legumes: recent advances in enzyme structure and functional genomics. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 7, p. 7994-8024, 2012.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.
- CAMAÑES, Gemma et al. Ammonium transport and CitAMT1 expression are regulated by N in Citrus plants. **Planta**, v. 229, n. 2, p. 331-342, 2009.
- CAMPOS, Paula Scotti et al. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. **Journal of plant physiology**, v. 160, n. 3, p. 283-292, 2003.
- CARVALHO, CHS de. Cultivares de café: origem, características e recomendações. **Brasília: Embrapa Café**, 2008.
- CASTRO-RODRÍGUEZ, Vanessa et al. The glutamine synthetase gene family in *Populus*. **BMC plant biology**, v. 11, n. 1, p. 119, 2011.
- CASTRO-RODRÍGUEZ, Vanessa et al. Redundancy and metabolic function of the glutamine synthetase gene family in poplar. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 20, 2015.

CLARK, Ralph B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 23, n. 3, p. 458-460, 1975.

CHINNUSAMY, Viswanathan; DALAL, Monika; ZHU, Jian - Kang. Epigenetic regulation of abiotic stress responses in plants. *Plant Abiotic Stress*, Second Edition, p. 203-229, 2014.

COMBES, Marie - Christine et al. Contribution of subgenomes to the transcriptome and their intertwined regulation in the allopolyploid *Coffea arabica* grown at contrasted temperatures. *New Phytologist*, v. 200, n. 1, p. 251-260, 2013.

CONAB – **Companhia Nacional de Abastecimento**. Café, Safra 2014. Segundo Levantamento, Maio de 2014. Disponível em: <<http://www.conab.org.br>>.

CORUZZI, Gloria M. Primary N-assimilation into amino acids in *Arabidopsis*. **The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists**, v. 2, 2003.

COTTA, Michelle G. et al. Lipid transfer proteins in coffee: isolation of *Coffea* orthologs, *Coffea arabica* homeologs, expression during coffee fruit development and promoter analysis in transgenic tobacco plants. **Plant molecular biology**, v. 85, n. 1-2, p. 11-31, 2014.

CRUZ, Fernanda et al. Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. **Molecular Breeding**, v. 23, n. 4, p. 607-616, 2009.

CRUZ, J. L. et al. Effects of nitrate nutrition on nitrogen metabolism in cassava. **Biologia plantarum**, v. 48, n. 1, p. 67-72, 2004.

DAMATTA, Fábio M. et al. Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 4, p. 485-510, 2007.

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

DE CARVALHO, Kenia et al. Nitrogen starvation, salt and heat stress in coffee (*Coffea arabica* L.): identification and validation of new genes for qPCR normalization. **Molecular biotechnology**, v. 53, n. 3, p. 315-325, 2013.

DE CARVALHO, Kenia et al. Homeologous genes involved in mannitol synthesis reveal unequal contributions in response to abiotic stress in *Coffea arabica*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 289, n. 5, p. 951-963, 2014.

DE MATOS NOGUEIRA, Eduardo et al. Characterization of glutamine synthetase genes in sugarcane genotypes with different rates of biological nitrogen fixation. **Plant Science**, v. 169, n. 5, p. 819-832, 2005.

DEBOUBA, Mohamed et al. NaCl stress effects on enzymes involved in nitrogen assimilation pathway in tomato "*Lycopersicon esculentum*" seedlings. **Journal of plant physiology**, v. 163, n. 12, p. 1247-1258, 2006a.

DEBOUBA, M. et al. Salinity-induced tissue-specific diurnal changes in nitrogen assimilatory enzymes in tomato seedlings grown under high or low nitrate medium. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 5, p. 409-419, 2006b.

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

DOS SANTOS, Tiago B. et al. Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses. **Plant physiology and biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 441-448, 2011.

EDGAR, Robert C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

FEHR, L. C. F.; DE A; DUARTE, S. L.; TAVARES, M.; REIS, E. A. Análise temporal das variáveis de custos da cultura do café arábica nas principais regiões produtoras do Brasil. Custos e @gronegocio on line - v. 8, n. 1 – Jan/Mar – 2012.

FERNANDEZ, Diana et al. 454 - pyrosequencing of *Coffea arabica* leaves infected by the rust fungus *Hemileia vastatrix* reveals in planta - expressed pathogen - secreted proteins and plant functions in a late compatible plant–rust interaction. **Molecular plant pathology**, v. 13, n. 1, p. 17-37, 2012.

FILIPPI, Sílvia B. et al. Allantoin has a limited role as nitrogen source in cultured coffee cells. **Journal of plant physiology**, v. 164, n. 5, p. 544-552, 2007.

FORDE, B. G.; CULLIMORE, J. V. molecular biology of glutamine synthetase in higher plants. **Oxford surveys of plant molecular and cell biology**, 1989.

GEROMEL, Clara et al. Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 12, p. 3243-3258, 2006.

GOODALL, Andrew J.; KUMAR, Pankaj; TOBIN, Alyson K. Identification and expression analyses of cytosolic glutamine synthetase genes in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant and Cell Physiology**, v. 54, n. 4, p. 492-505, 2013.

HERRIDGE, David F.; PEOPLES, Mark B.; BODDEY, Robert M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, v. 311, n. 1-2, p. 1-18, 2008.

HOSHIDA, Hisashi et al. Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. **Plant molecular biology**, v. 43, n. 1, p. 103-111, 2000.

HOSSAIN, M. A. et al. Responses of glutamine synthetase-glutamate synthase cycle enzymes in tomato leaves under salinity stress. **Int. J. Agric. Biol**, v. 14, p. 509-515, 2012.

ICO - **International Coffee Organization**. ICO trade statistics, Total production of exporting countries, Julho de 2014. Disponível em: <http://www.ico.org/trade_statistics.asp>.

LIN, Chenwei et al. Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. **Theoretical and applied genetics**, v. 112, n. 1, p. 114-130, 2005

ISHIYAMA, Keiki et al. Kinetic properties and ammonium-dependent regulation of cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase in Arabidopsis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 16, p. 16598-16605, 2004.

KOJIMA, Soichi et al. AtDUR3 represents the major transporter for high - affinity urea transport across the plasma membrane of nitrogen - deficient Arabidopsis roots. *The Plant Journal*, v. 52, n. 1, p. 30-40, 2007.

KORIMBOCUS, J. et al. Improved detection of *Sugarcane yellow leaf virus* using a real-time fluorescent (TaqMan) RT-PCR assay. **Journal of Virological Methods**, v. 103, n. 2, p. 109-120, 2002.

KRAJEWSKA, Barbara. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, n. 1, p. 9-21, 2009.

LASHERMES, Philippe et al. Genome rearrangements derived from homoeologous recombination following allopolyploidy speciation in coffee. **The Plant Journal**, v. 78, n. 4, p. 674-685, 2014.

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

LEA, Peter J.; MIFLIN, Ben J. Nitrogen assimilation and its relevance to crop improvement. **Nitrogen metabolism in plants in the post-genomic era**. Chichester, UK: Wiley-Blackwell, p. 1-40, 2011.

LI, Qing et al. Root growth inhibition by NH₄⁺ in Arabidopsis is mediated by the root tip and is linked to NH₄⁺ efflux and GMPase activity. **Plant, cell & environment**, v. 33, n. 9, p. 1529-1542, 2010.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOQUÉ, D. et al. A cytosolic trans-activation domain essential for ammonium uptake. **Nature**, v. 446, n. 7132, p. 195-198, 2007.

MELO, Paula M. et al. Expression of the Plastid-Located Glutamine Synthetase of *Medicago truncatula*. Accumulation of the Precursor in Root Nodules Reveals an in Vivo Control at the Level of Protein Import into Plastids. **Plant physiology**, v. 132, n. 1, p. 390-399, 2003.

MILLER, Anthony J. et al. Nitrate transport and signalling. **Journal of experimental Botany**, v. 58, n. 9, p. 2297-2306, 2007.

MONDEGO, Jorge MC et al. An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. **BMC plant biology**, v. 11, n. 1, p. 30, 2011.

MOREY, Kevin J.; ORTEGA, Jose Luis; SENGUPTA-GOPALAN, Champa. Cytosolic glutamine synthetase in soybean is encoded by a multigene family, and the members are regulated in an organ-specific and developmental manner. **Plant physiology**, v. 128, n. 1, p. 182-193, 2002.

OREA, Alicia et al. Isolation of photorespiratory mutants from *Lotus japonicus* deficient in glutamine synthetase. **Physiologia Plantarum**, v. 115, n. 3, p. 352-361, 2002.

ORSEL, Mathilde et al. Sixteen cytosolic glutamine synthetase genes identified in the *Brassica napus* L. genome are differentially regulated depending on nitrogen regimes and leaf senescence. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 14, p. 3927-3947, 2014.

POMPELLI, Marcelo F. et al. Photosynthesis and photoprotection in coffee leaves is affected by nitrogen and light availabilities in winter conditions. **Journal of plant physiology**, v. 167, n. 13, p. 1052-1060, 2010.

RAMAKERS, Christian et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience letters**, v. 339, n. 1, p. 62-66, 2003.

RAMALHO, José C. et al. Photosynthetic responses of *Coffea arabica* leaves to a short - term high light exposure in relation to N availability. *Physiologia Plantarum*, v. 101, n. 1, p. 229-239, 1997.

RANA, Nisha K. et al. A CsGS is regulated at transcriptional level during developmental stages and nitrogen utilization in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. **Molecular biology reports**, v. 37, n. 2, p. 703-710, 2010.

REIS, André Rodrigues et al. Atividade da redutase do nitrato e glutamina sintetase em folhas de cafeeiro durante o desenvolvimento dos frutos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 2, p. 315-324, 2009.

ROBERTSON, G. Philip; VITOUSEK, Peter M. Nitrogen in agriculture: Balancing the cost of an essential resource. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 34, p. 97-125, 2009.

SAAB, Ali Aldersi; PAULA, R. de A. O mercado de fertilizantes no Brasil: diagnósticos e propostas de políticas. **Revista de Política Agrícola**, v. 17, n. 2, 2008.

SCARPECI, Telma E. et al. Plant nutritional status modulates glutamine synthetase levels in ripe tomatoes (< i> *Solanum lycopersicum*</i> cv. Micro-Tom). **Journal of plant physiology**, v. 164, n. 2, p. 137-145, 2007.

SEABRA, Ana R. et al. Medicago truncatula contains a second gene encoding a plastid located glutamine synthetase exclusively expressed in developing seeds. **BMC plant biology**, v. 10, n. 1, p. 183, 2010.

SILVA, F. de AS; AZEVEDO, CAV de. Principal components analysis in the software assistat-statistical attendance. In: **World congress on computers in agriculture**. 2009. p. 294-298.

SINGH, Kamal Krishna; GHOSH, Shilpi. Regulation of glutamine synthetase isoforms in two differentially drought-tolerant rice (*Oryza sativa* L.) cultivars under water deficit conditions. **Plant cell reports**, v. 32, n. 2, p. 183-193, 2013.

Soares, J. D. M.; Pereira, L. F. P.; Vieira, L. G. E.; Domingues, D. S. Glutamine synthetase in developing coffee immature fruits: enzymatic and transcriptional Analysis, **IV Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas**, 2013.

SOLOVYEV, Victor et al. Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters. **Genome Biol**, v. 7, n. Suppl 1, p. S10, 2006.

SOTO, Gabriela et al. *AtTIP1; 3* and *AtTIP5; 1*, the only highly expressed Arabidopsis pollen-specific aquaporins, transport water and urea. **FEBS letters**, v. 582, n. 29, p. 4077-4082, 2008.

SUTTON, Mark A. et al. Too much of a good thing. **Nature**, v. 472, n. 7342, p. 159-161, 2011.

TAMURA, Koichiro et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

VIDAL, Ramon Oliveira et al. A high-throughput data mining of single nucleotide polymorphisms in *Coffea* species expressed sequence tags suggests differential homeologous gene expression in the allotetraploid *Coffea arabica*. **Plant physiology**, v. 154, n. 3, p. 1053-1066, 2010.

WICKERT, Ester et al. Nitrogen assimilation in Citrus based on CitEST data mining. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 3, p. 810-818, 2007.

XU, Guohua; FAN, Xiaorong; MILLER, Anthony J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. **Annual review of plant biology**, v. 63, p. 153-182, 2012.

YUYAMA, Priscila Mary et al. RNA-Seq Analysis and De Novo Transcriptome Assembly Of *Coffea arabica* and *Coffea eugenioides*. In: **Plant and Animal Genome XXI Conference**. Plant and Animal Genome, 2013.