



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

TIAGO BENEDITO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO TRANSCRICIONAL DE GENES ENVOLVIDOS  
NO TRANSPORTE E ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO EM  
*Coffea arabica* L.**

---

Londrina  
2013

TIAGO BENEDITO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO TRANSCRICIONAL DE GENES ENVOLVIDOS  
NO TRANSPORTE E ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO EM  
*Coffea arabica* L.**

Tese apresentada ao Programa de Pós graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Valéria Carpentieri-Pípolo  
Co-Orientador: Dr. Luiz Filipe Protassio Pereira  
Co-Orientador: Dr. Douglas Silva Domingues

Londrina  
2013

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

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

S237a Santos, Tiago Benedito dos.  
Avaliação transcricional de genes envolvidos no transporte e assimilação de nitrogênio em *Coffea arabica* L. / Tiago Benedito dos Santos. – Londrina, 2013.  
110 f.: il.

Orientador: Valéria Carpentieri-Pípolo  
Co-orientador: Luiz Filipe Protasio Pereira.  
Co-orientador: Douglas Silva Domingues.  
Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2013.  
Inclui bibliografia.

1. Café – Biotecnologia – Teses. 2. Cafeeiro – Nutrição mineral – Teses. 3. Nitrogênio na agricultura – Teses. 4. Genética vegetal – Teses. I. Carpentieri-Pípolo, Valéria. II. Pereira, Luiz Filipe Protasio. III. Domingues, Douglas Silva. IV. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. V. Título.

CDU 633.73

TIAGO BENEDITO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO TRANSCRICIONAL DE GENES ENVOLVIDOS NO  
TRANSPORTE E ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO EM *Coffea arabica*  
L.**

Tese apresentada ao Programa de Pós graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Valéria Carpentieri-  
Pípolo  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Luiz Filipe Protassio Pereira  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
– Embrapa Café

---

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

---

Prof. Dr. Edison Miglioranza  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Dra. Andrea Akemi Hoshino  
Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR

---

Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira  
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE

Londrina, 28 de março de 2013

A minha família, por todo amor incondicional, e pelos verdadeiros amigos pelo constante incentivo, dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por toda graça alcançada até o presente momento.

A orientadora Prof<sup>a</sup> Valéria Carpentieri-Pípolo pela oportunidade de orientação e amizade.

Ao co-orientador Dr. Luiz Filipe P. Pereira, pelo incentivo, amizade e pela confiança durante os valiosos onze anos de convivência e trabalho, muito obrigado.

Ao co-orientador Dr. Douglas Silva Domingues, pela disponibilidade de orientação, todo apoio no andamento deste trabalho, pela confiança e amizade.

Ao Dr. Anderson Rotter Meda, idealizador desse projeto, e pelo auxílio durante o período em que esteve presente no LBI.

Ao Dr. Luiz Gonzaga E. Vieira, primeiramente muito obrigado pelos ensinamentos transmitidos, por ajuda na realização dos trabalhos e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina em especial a Weda por toda ajuda.

Ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) pela oportunidade de estágio durante a graduação e até os dias de hoje no Laboratório de Biotecnologia Vegetal– LBI.

À CAPES, pela concessão de bolsa.

Ao Consórcio de Pesquisa Café, CNPq e Fundação Araucária e pelo apoio financeiro neste projeto.

A Dra. Andrea pelas sugestões dadas para esse trabalho e pela amizade.

A querida amiga Sandra M. Bellodi Cação, por toda ajuda, dúvidas, risadas, e pela amizade nesses anos de LBI.

A Alessandra Ribas, por todas considerações e amizade.

A Ilara Gabriela Frasson Budzinski, minha eterna amiga que mesmo distante, nunca deixou de me apoiar.

A Suzana Tiemi, por toda ajuda amizade e carinho.

Aos queridos amigos ex-estagiários Renata Sitta e Eduardo Brandalize Vespero, por toda assistência e ajuda prestada para o andamento dos trabalhos, e claro pela amizade.

Ao João Danilo e Viviane Yumi Baba (Equipe Café), por toda ajuda e amizade.

A Suely Ario e Lucinéia M. da Silva, Cicera, Arlindo e João pela ajuda e grande amizade aos longos desses anos todos.

As amigas Simone Castro, Gislaine Vasquez de Souza, Márcia Moraes, pela amizade de ontem, hoje e sempre.

Ao amigo Rogério Barbieri, pela amizade, obrigado.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (LBI): Kenia, Eduardo Firmino, Juarez, Julia, Carol, Gustavo, Rafael, Rafaely, Silvia, Priscila, Bruna, Giselly, Juliana e a tantos outros que já passaram pelo nosso laboratório, obrigado pelas descontrações e amizade.

Em especial a minha família por todo apoio e a quem devo tudo o que sou.

A todos que de alguma maneira contribuíram direta ou indiretamente na minha vida e na minha formação.....obrigado.

Dos SANTOS, Tiago Benedito. **Avaliação transcricional de genes envolvidos no transporte e assimilação de nitrogênio em *Coffea arabica* L.** 2013. 110 f. Doutorado em Agronomia: Fitotecnia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

## RESUMO

O nitrogênio (N) é o principal nutriente exigido pelo cafeeiro, pois trata-se do componente inorgânico mais importante para o desenvolvimento das plantas, necessário para a síntese de aminoácidos e proteínas, bases nitrogenadas, dentre outras funções. Como não existem informações sobre os mecanismos moleculares de absorção e assimilação do nitrogênio no cafeeiro, uma possibilidade para obtenção de plantas de café mais eficientes em absorver e utilizar esse nutriente, é estudar os genes que codificam os possíveis transportadores de N. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo, estudar genes envolvidos na absorção e assimilação de nitrogênio em condições de supressão de N. Foram caracterizados genes codificando para transportadores de diferentes formas de N absorvidas pelas plantas – transportadores de nitrato (NRT- *CaNRTa*), amônio (AMT - *CaAMTd*), uréia (DUR3 - *CaDUR3*), e genes envolvidos na assimilação de N – glutamina sintetase citosólica - *CaGSc*) e a nitrato redutase – *CaNR*. No cafeeiro, o gene *CaDUR3* é transcricionalmente ativo em diferentes estresses abióticos e sob supressão de N. *CaDUR3* é um gene de cópia única no genoma tetraplóide de *C. arabica*. A atividade de nitrato redutase em folhas e raízes não apresentou variação significativa em resposta à supressão de N. O cafeeiro apresentou diferenças na atividade da GS entre folha e raiz, observando uma maior expressão relativa da isoforma denominada *CaGSc*. Os genes estudados apresentaram padrões de modulação transcricional diferentes com relação à absorção e assimilação de N. As informações geradas neste trabalho fornecerão subsídios para selecionar genes-candidatos para futuras análises funcionais, possibilitando a compreensão sobre os determinantes genéticos relacionados principalmente à supressão de N em uma planta perene de grande interesse no agronegócio nacional, o cafeeiro.

**Palavras-chave:** Café. Supressão de N. Absorção de N. Assimilação de N.

Dos SANTOS, Tiago Benedito. **Evaluation transcription of genes involved in nitrogen assimilation and transport in *Coffea arabica* L.** 2013. 110 p. Doutorado em Agronomia: Fitotecnia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

## ABSTRACT

Coffee is the most important agricultural commodity in the world, representing a significant source of income for the tropical developing countries. Some factors may adversely impact its production, such as nutritional imbalance. Nitrogen (N) is the main nutrient required by coffee, and its inorganic form is important for plant growth, synthesis of proteins and amino acids, nitrogenous bases, among other functions. There is no information about the molecular mechanisms of N absorption and assimilation in coffee. Studying genes encoding nutrients transporters opens a new possibility for obtaining coffee plants more efficient to absorb and utilize this nutrient. In this way, this work aimed to study the genes involved in nitrogen assimilation and absorption under conditions of N suppression. We characterized transporters of different forms of N absorbed by plants such as nitrate transporter - *CaNRTa*, ammonium - *CaAMTd*, urea - *CaDUR3*, and genes involved in N assimilation (glutamine synthetase - *CaGSc* and nitrate reductase - *CaNR*. In coffee *CaDUR3* gene is transcriptionally active under various abiotic stresses and under N starvation. *CaDUR3* is a single copy gene in the genome of the allelotetraploid *C. arabica*. The activity of nitrate reductase in leaf and root did not change significantly in response to N starvation. In relation the GS, coffee plants showed differences between GS activity in leaf and root). It was observed a greater relative expression of isoform called *CaGSc*. The genes studied exhibited different patterns of transcriptional modulation in relation to nitrogen absorption and assimilation. The information generated in this study provides the opportunity to select candidate genes for functional analysis in the next future. Also this, study contributed to the understanding of the genetic determinants related to the suppression of N in a perennial plant of great economic interest the coffee.

**Key words:** Coffee. Starvation N. Absorption N. Assimilation N.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1** – Espécies de café no continente Africano e da região de Madagascar (ANTHONY et al., 2002) .....22
- Figura 2** – História evolutiva do alotetraplóide *C. arabica*. **A** – Origem de *C. arabica*, onde os genomas dos progenitores são representados pelos diplóides *C. eugenoides* e *C. canephora*. **B** – Origem do *C. arabica* cultivado (retirado de VIDAL et al., 2010 e baseado em ANTHONY et al., 2002) .....23
- Figura 3** – Representação da Lei de Liebig, onde estão representados todos os nutrientes essenciais, nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), zinco (Zn), cobre (Cu), manganês (Mn), ferro (Fe), boro (B), cloro (Cl), molibdênio (Mo), cobalto (Co). Fonte: disponível em: [www.portalsaofrancisco.com.br](http://www.portalsaofrancisco.com.br) (Nutrição das plantas).....25
- Figura 4** – Principais diagnoses visuais das deficiências nutricionais em folhas de cafeeiro. ....30
- Figura 5** – Modelo proposto para as funções dos respectivos transportadores de  $\text{NO}_3^-$  em *Arabidopsis* (KROUK et al., 2010). Ilustração detalhada da absorção de nitrato realizado pelas raízes. NRT1.1 (CHL1), NRT1.2, NRT2.1, NRT2.2, e NRT2.4 estão envolvidos na absorção de nitrato presentes no solo. Transportador efluxo 1 (NAXT1), é um transportador da família NRT1, que intercede o efluxo de  $\text{NO}_3^-$  sob carga ácida. NRT1.5, NRT1.8 e NRT1.9 desempenham a função reguladora do transporte de  $\text{NO}_3^-$  via xilema através das raízes e caule .....33
- Figura 6** – Representação da família de transportadores de  $\text{NH}_4^+$  (AMT – Transportador de amônio), de alta (AMT1) e baixa afinidade (AMT2), com base em dados disponíveis para *A. thaliana* (FERNANDES; SOUZA, 2006).....35
- Figura 7** – Representação da ação da Nitrato Redutase.....38

<b>Figura 8</b> – Rota da assimilação primária e reciclagem do N em células vegetais (CORUZZI, 2003). Essas vias metabólicas são reguladas em diferentes níveis (transcricional, traducional e pós-traducional) por diversos fatores, incluindo metabólitos nitrogenados e luz .....	39
--	----

## ARTIGO A

<b>Figura 1</b> – Representação do experimento com supressão de N .....	58
<b>Figura 2</b> – Árvore filogenética de transportadores de uréia utilizando o programa Evolutionary Genetics Analysis 5 MEGA5 (TAMURA et al., 2011). São indicados valores de <i>bootstrap</i> acima de 50% .....	67
<b>Figura 3</b> – RT-PCR semi-quantitativo do gene <i>CaDUR3</i> nos diferentes tecidos do cafeeiro: folha, botão floral, flor, raiz, ramo, endosperma e polpa. Foi utilizado o gene de referência <i>CaEF1<math>\alpha</math></i> (CARVALHO et al., 2013) como controle do experimento .....	67
<b>Figura 4</b> – RT-PCR semi-quantitativo do gene <i>CaDUR3</i> em estresses abióticos. <b>A</b> – Estresse hídrico: Sem estresse (SE), estresse moderado (EM), estresse severo (ES) e recuperado (REC). <b>B</b> – Estresse térmico: Sem estresse (SE), estresse moderado (3 D), estresse severo (5 D). <b>C</b> – Estresse salino: Sem estresse (SE), 6 D, 12 D e 25 D após o início do estresse salino (150 mM NaCl). Foi utilizado o gene de referência <i>CaEF1<math>\alpha</math></i> como controle do experimento (CARVALHO et al., 2013) .....	68
<b>Figura 5</b> – Expressão relativa do gene <i>CaDUR3</i> nos tecidos de folha e raiz crescidas sob supressão de nitrogênio. Após o Dia 0 a fonte de N (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ) foi retirada até o término do experimento (Dia 10) das plantas cultivadas em solução nutritiva. A normalização feita com o gene de referência <i>CaEF1<math>\alpha</math></i> (CARVALHO et al., 2013) .....	69
<b>Figura 6</b> – Análise do número de cópias de <i>CaDUR3</i> em café. O DNA genômico de <i>C. arabica</i> cv. Híbrido de Timor CIFC 832/2 (HT), <i>C. canephora</i> (CC), <i>C. eugenioides</i> (CE) e <i>C. arabica</i> cv. IAPAR-59 (IPR59) foram digeridos com as enzimas de restrição <i>DraI</i> . O	

inserto do clone CA00-XX-IA2-016-H07-EC.F, que corresponde ao gene <i>CaDUR3</i> , foi usado como sonda .....	70
<b>Figura 7</b> – Hibridização de clones BAC em membranas. Nas placas 9K23 (A) – 90K11 e P90L11 (B), foram encontrados possíveis clones para o gene <i>CaDUR3</i> .....	71
<b>Figura 8</b> – A – Perfil de restrição, utilizando a enzima <i>HindIII</i> , dos clones BAC em gel de agarose 1%. 1 – Peso Molecular 1Kb; 2 – DNA $\lambda$ <i>HindIII</i> ; 3 – Placa09K23; 4 – Placa90K11; 5 – Placa90L11. B – Hibridização com a sonda <i>CaDUR3</i> .....	72
<b>Figura 9</b> – Teor de uréia detectado em folha e raiz sob supressão de N. Valores apresentados por média $\pm$ erro padrão (n=3) .....	73

## ARTIGO B

<b>Figura 1</b> – Representação do experimento com supressão de N .....	82
<b>Figura 2</b> – Perfil transcricional dos genes envolvidos na assimilação de N (A - <i>CaNRTa</i> – transportador de nitrato; B - <i>CaAMTd</i> – transportador de amônio; C - <i>CaNR</i> – nitrato redutase; D - <i>CaGSc</i> – glutamina sintetase citosólica) em folha e raiz do cafeeiro, em condição de supressão de N. Após o Dia 0 a fonte de N ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) foi retirada até o término do experimento (Dia 10). Foi utilizado o gene <i>CaEF1<math>\alpha</math></i> como normalizador (CARVALHO et al., 2013). Os dados de expressão foram normalizados utilizando como calibrador o Dia 0 (plantas cultivadas sob suficiência de N). Os valores são representados pela média $\pm$ desvio-padrão (n = 3) .....	89
<b>Figura 3</b> – Concentração de aminoácidos ( $\mu\text{mol}$ de aminoácidos totais/mg matéria fresca) em folha e raiz de cafeeiro, em condição de supressão de N. Após o Dia 0 a fonte de N ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) foi retirada até o término do experimento (Dia 10) .....	94
<b>Figura 4</b> – Teor de prolina livre ( $\mu\text{mol}$ Prolina/g MF) em folha e raiz do cafeeiro, em condição de supressão de N. Após o Dia 0 a fonte de N ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) foi retirada até o término do experimento (Dia 10) .....	95
<b>Figura 5</b> – Conteúdo de proteínas solúveis totais ( $\mu\text{mol/g}$ MF) em folha e raiz do cafeeiro, em condição de supressão de N. Após o Dia 0 a	

fonte de N ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) foi retirada até o término do experimento (Dia 10) das plantas cultivadas em solução nutritiva .....	96
<b>Figura 6</b> – Atividade de Glutamina Sintetase em folha e raiz do cafeeiro, em condição de supressão de N. Após o Dia 0 a fonte de N ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) foi retirada até o término do experimento (Dia 10) das plantas cultivadas em solução nutritiva .....	97
<b>Figura 7</b> – Atividade da Nitrato Redutase (ANR) em folha e raiz do cafeeiro, em condição de supressão de N. Após o Dia 0 a fonte de N ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) foi retirada até o término do experimento (Dia 10) das plantas cultivadas em solução nutritiva .....	99

## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO GERAL

<b>Tabela 1</b> – Descrição dos principais sintomas de deficiência nutricional (-) e toxidez (+) no cafeeiro .....	29
--	----

### ARTIGO A

<b>Tabela 1</b> – Descrição dos genes e sequências para análise de qPCR .....	63
---	----

### ARTIGO B

<b>Tabela 1</b> – Descrição dos genes de café e sequências dos respectivos pares de <i>primers</i> utilizados na análise por qRT-PCR de plantas submetidas a supressão de N .....	88
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMT	Ammonium transporter
ANR	Atividade Nitrato Redutase
AS	Asparagina Sintetase
AspAT	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina tri-fosfato
AAP	Permeases de Aminoácidos
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BSA	Albumina de soro bovino
CAT	Transportadores ácidos aminados catiônicos
CHATS	Sistema constitutivo de alta afinidade
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EST	Express Sequence Tags
ES	Estresse severo
EM	Estresse moderado
GOGAT	Glutamina-2-oxoglutarato amida transferase
GS	Glutamina Sintetase
GS1	Glutamina Sintetase Citosólica
GS2	Glutamina Sintetase Plastídica
HATS	High Affinity Transport System
iHATS	Sistema indutível de alta afinidade
LATS	Low Affinity Transport System
LHT	Transportador de lisina / histidina
MIPs	Major Intrinsic Protein
MIQE	Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments
NAE	Eficiência na assimilação de N
NAR	Nitrate Assimilation Related
NAXT1	Transportador efluxo 1
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Amônio
NiR	Nitrito redutase
NIPs	NOD-26-like proteins

NaOH	Hidróxido de sódio
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase
NpUE	Eficiência do uso fisiológico de N
NR	Nitrato Redutase
NRT	Transportador de Nitrato
NRT1	Família de genes para os transportadores de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> de baixa afinidade
NRT2	Família de genes para os transportadores de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> de alta afinidade
NUE	Eficiência do uso de nitrogênio
NUpE	Eficiência na absorção de N
NUtE	Eficiência da utilização do N
OPT	Transportadores de oligopeptídeos
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIP	Plasma Membrane Intrinsic Protein
Prot	Transportadores de prolina
PVP	Polivinilpirrolidona
P5C	Δ <sup>1</sup> -pirrolina-5-carboxilato
P5CS	Δ <sup>1</sup> -pirrolina-5-carboxilato sintetase
P5CDH	prolina-desidrogenase
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
QTL	Quantitative Trait Locus
REC	Recuperado
RNA	Ácido ribonucleico
ROX	Espécies reativas de oxigênio
RT-PCR	Transcrição Reversa acoplada a Reação em Cadeia da Polimerase
RUBISCO	Ribulose-1,5-Bifosfato-carboxilase-Oxigenase
SE	Sem estresse
SSS	Sodium Solute Symporter
SOD	Superóxido dismutase
TIPs	Tonoplast Membrane Intrinsic Protein

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>21</b>
2.1	CAFÉ.....	21
2.1.1	Aspectos Econômicos do Café.....	21
2.1.2	Aspectos Botânicos e Genéticos.....	21
2.1.3	Nutrição Mineral em Plantas.....	24
2.1.4	Nutrição Mineral no Cafeeiro.....	27
2.1.5	Nitrogênio e seu Uso em Plantas de Interesse Agronômico.....	30
2.1.6	Absorção de Nitrogênio.....	31
2.1.7	Absorção de Nitrato.....	32
2.1.8	Absorção de Amônio.....	35
2.1.9	Transporte de Uréia.....	36
2.1.10	Assimilação de Nitrogênio.....	37
2.1.11	Remobilização do Nitrogênio.....	40
2.1.12	A Biotecnologia e Estudos Transcricionais no Cafeeiro.....	42
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>ARTIGO A: CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E TRANSCRICIONAL DE CADUR3, UM TRANSPORTADOR DE URÉIA NO CAFEIRO EM DIFERENTES ESTRESSES ABIÓTICOS</b> .....	<b>54</b>
4.1	RESUMO.....	54
4.2	INTRODUÇÃO.....	55
4.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	57
4.3.1	Identificação In Silico de Sequências Expressas Relacionadas ao Gene DUR3.....	57
4.3.2	Análise Filogenética.....	57
4.3.3	Material Vegetal.....	57
4.3.4	Plantas Crescidas Sob Supressão de N.....	58
4.3.5	Experimento de Estresse Hídrico.....	59

4.3.6	Experimento de Estresse Térmico .....	60
4.3.7	Experimento de Estresse Salino .....	60
4.3.8	Extração de RNA Total, Purificação e Síntese de cDNA .....	61
4.3.9	Análise RT-PCR Semi-Quantitativo de CaDUR3 .....	61
4.3.10	Análise qRT-PCR de CaDUR3 .....	62
4.3.11	Teor de Uréia em Folhas e Raiz Sob Supressão de N .....	64
4.3.12	Extração de DNA Genômico .....	64
4.3.13	Southern Blot de CaDUR3 .....	65
4.3.14	Seleção de Clones BAC para o Gene CaDUR3 por PCR e Membranas de Hibridizações.....	65
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	66
4.4.1	Análise In Silico de CaDUR3 .....	66
4.4.2	Análise Transcricional em Diferentes Tecidos .....	67
4.4.3	Análise Transcricional em Estresse Hídrico, Salino e Térmico .....	68
4.4.4	Análise Transcricional Sob Supressão de N .....	69
4.4.5	Número de Cópias de CaDUR3.....	70
4.4.6	Identificação de Clones BAC Contendo o Gene CaDUR3.....	71
4.4.7	Teor de Uréia .....	73
4.5	CONCLUSÃO .....	73
4.6	REFERÊNCIAS .....	74
<b>5</b>	<b>ARTIGO B. A SUPRESSÃO DE NITROGÊNIO (N) MODULA TRANSCRICIONALMENTE GENES RELACIONADOS A ABSORÇÃO E ASSIMILAÇÃO DE N EM RAÍZES E FOLHAS EM CAFEEIRO .....</b>	<b>78</b>
5.1	RESUMO .....	78
5.2	INTRODUÇÃO.....	78
5.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	81
5.3.1	Identificação In Silico de Sequências Expressas Relacionadas aos Genes Envolvidos na Absorção e Assimilação de N .....	81
5.3.2	Plantas Crescidas sob Supressão de N.....	81
5.3.3	Extração de RNA Total, Purificação e Síntese de cDNA .....	82
5.3.4	Análise qRT-PCR.....	83
5.4	ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	84

5.4.1	Conteúdo de Proteínas Totais .....	84
5.4.2	Determinação da Quantidade de Prolina .....	84
5.4.3	Conteúdo de Aminoácidos Totais .....	85
5.5	ENSAIOS ENZIMÁTICOS. ....	85
5.5.1	Atividade da Glutamina Sintetase (GS) .....	85
5.5.2	Atividade do Nitrato Redutase (NR) In Vitro.....	85
5.6	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	86
5.6.1	Análise In Silico.....	86
5.6.2	Análise qPCR.....	89
5.7	AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS NO CAFEIEIRO EM CONDIÇÕES DE SUPRESSÃO DE N.....	93
5.7.1	Aminoácidos Totais.....	93
5.7.2	Prolina.....	94
5.7.3	Proteínas Solúveis Totais .....	96
5.7.4	Atividade Enzimática da Glutamina Sintetase (GS).....	97
5.7.5	Atividade da Nitrato Redutase (ANR) .....	98
5.8	CONCLUSÃO .....	100
5.9	REFERÊNCIAS .....	101

## 1 INTRODUÇÃO

O café é um dos principais produtos agrícolas mundiais, com cultivo em mais de 80 países (MARRACCINI et al., 2012). O Brasil ocupa posição de destaque no agronegócio do café, como maior produtor e exportador mundial, e segundo maior mercado consumidor.

Um importante entrave para a produção cafeeira atingir seu máximo potencial é o equilíbrio nutricional da cultura. Depois da mão-de-obra, o principal custo de produção cafeeira está no emprego de fertilizantes (FEHR et al., 2012). Em razão dos custos, bem como devido ao impacto ambiental gerado pelo uso excessivo de adubos químicos, é cada vez mais prioritário o desenvolvimento de cultivares que sejam mais eficientes no uso de nutrientes. Atualmente, a demanda brasileira por fertilizantes é bastante elevada e só cresce a cada ano. Estima-se que pelo menos até 2017, o ritmo de demanda por fertilizantes será superior à oferta (<http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=86864>).

O nitrogênio (N) é o nutriente essencial de maior demanda metabólica e mais limitante na produtividade de diversas culturas (LEA; AZEVEDO, 2006). No cafeeiro, ele é exigido desde o início de seu desenvolvimento até a sua plena produção (SILVA et al., 2003). A busca pela eficiência de absorção e uso de N se faz importante tanto em lavouras tradicionais, como no cultivo orgânico do cafeeiro (RICCI et al., 2005). Aliado ao manejo agrônômico, a utilização de plantas que apresentem maior tolerância à baixa disponibilidade de nutrientes do solo, pode otimizar a produção agrícola e minimizar custos com aplicação de fertilizantes e corretivos.

A exploração da variabilidade genética vegetal e a busca de genes relacionados à absorção e à eficiência no uso de nutrientes mostraram-se viáveis para diversas espécies de plantas. No caso da cultura do café, a diversidade genética para eficiência nutricional tem sido pouco explorada. Com isso, uma possibilidade para obtenção de plantas de café mais eficientes em absorver e utilizar os nutrientes é estudar funcionalmente os genes que codificam transportadores de nutrientes minerais. Como o nitrogênio (N) é quantitativamente o principal nutriente exigido pelo cafeeiro e o mais exportado para grãos de café (VALARINI, 2005), é importante a caracterização dos genes envolvidos no processo de aquisição e assimilação de N. Mais ainda, sabendo-se que a maioria das lavouras é mantida em

condições sub-ótimas de adubação nitrogenada, é importante o conhecimento das respostas do cafeeiro a este tipo de situação.

Diante do colocado, este trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar de genes envolvidos no transporte e assimilação de diferentes formas de nitrogênio no cafeeiro.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CAFÉ

#### 2.1.1 Aspectos Econômicos do Café

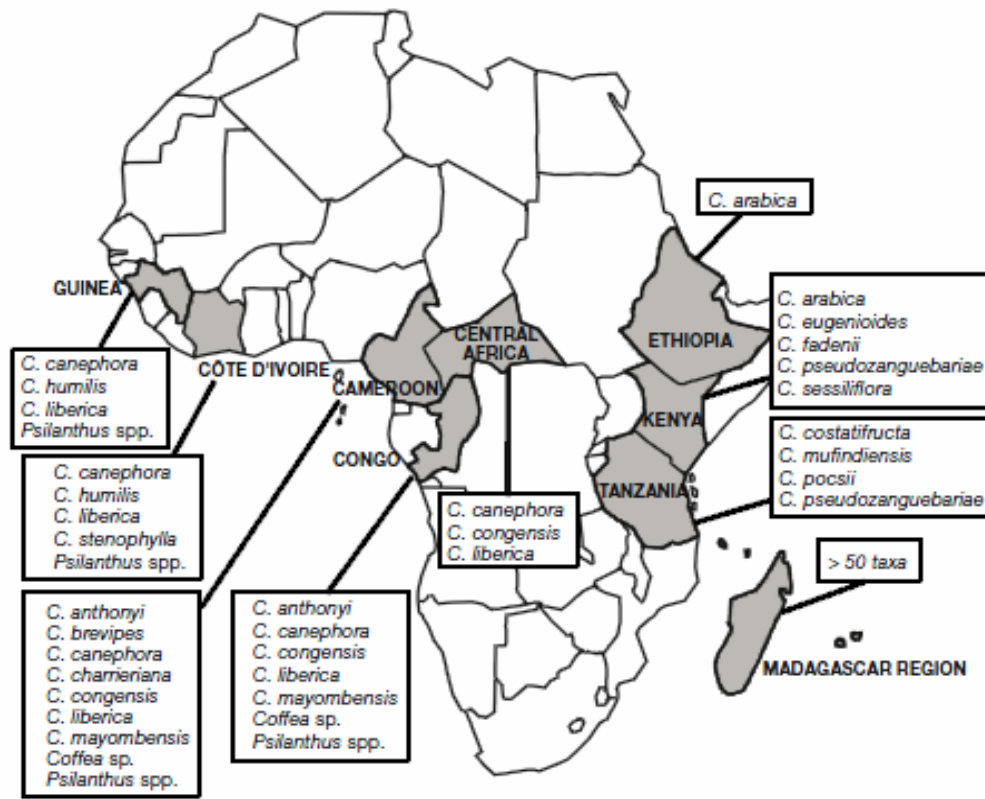
O agronegócio café representa um dos mais importantes setores do sistema agroindustrial brasileiro e mundial. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, e o segundo maior consumidor da bebida.

A safra de 2011/12 produziu cerca de 43,5 milhões de sacas de 60 kg de café. O Brasil exportou em torno de 33,5 milhões de sacas, obtendo uma receita líquida de US\$ 8,7 bilhões de dólares (CONAB, 2012). Para a safra 2012/2013, a produção brasileira pode chegar a 50,6 milhões de sacas. Cerca de 75% da produção nacional corresponde ao café arábica (*Coffea arabica* L.) e o restante corresponde ao café robusta/conilon (*Coffea canephora* Pierre) (CONAB, 2012). No Brasil, os maiores produtores de café arábica são Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Bahia e o Paraná.

#### 2.1.2 Aspectos Botânicos e Genéticos

O gênero *Coffea* pertence à família Rubiaceae (KEMSLEY et al., 1995; EIRA et al., 2006), e é composto por 124 espécies (DAVIS et al., 2011). As espécies deste gênero estão distribuídas geograficamente em uma ampla região do continente Africano, em Madagascar (BERTTHAURD; CHARRIER, 1988; ANTHONY et al., 2002), (Figura 1).

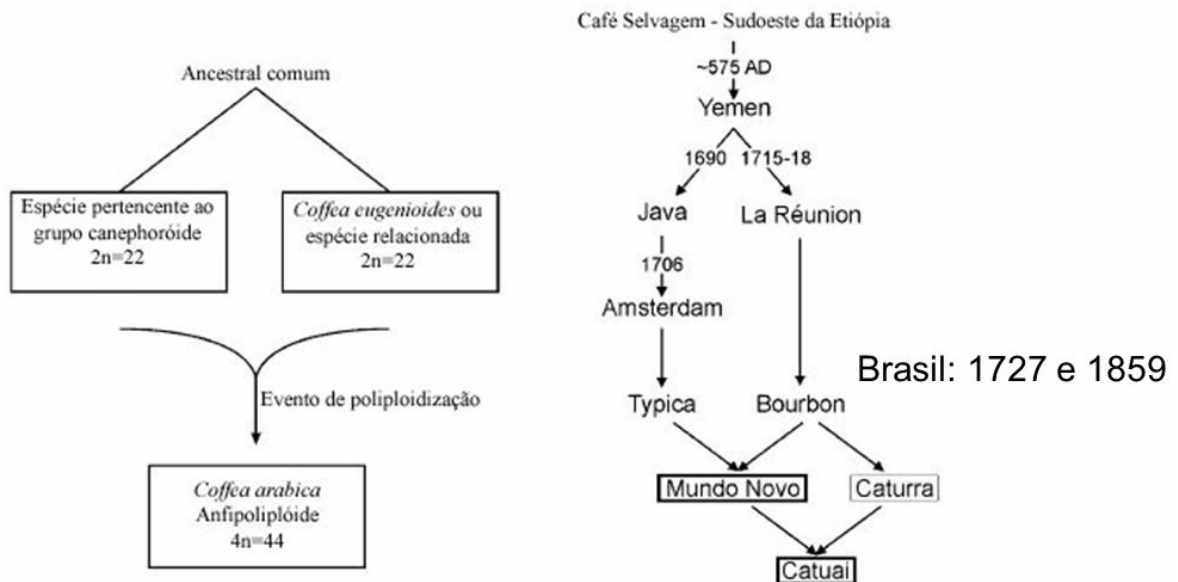
**Figura 1** – Espécies do gênero *Coffea* no continente Africano e da região de Madagascar (ANTHONY et al., 2007).



*C. arabica* é uma planta de porte arbustivo ou arbóreo que pode atingir 4m de altura, com caule lenhoso, folhas persistentes, flores hermafroditas e sistema radicular pivotante (MATIELLO et al., 2005). Apresenta altos níveis de autofecundação, sendo a única espécie alotetraplóide ( $2n = 4x = 44$  cromossomos) do gênero. Seu principal centro de diversidade é no sudoeste da Etiópia, onde ainda crescem indivíduos selvagens (LASHERMES et al., 1999; ANTHONY et al., 2002; CLARINDO & CARVALHO, 2008). Estudos filogenéticos indicam que *C. arabica* é originário da hibridização natural entre duas espécies ancestrais diplóides, *C. eugenioides* ( $2n = 2x = 22$  cromossomos) e *C. canephora* ( $2n = 2x = 22$  cromossomos), (Figura 2A) (LASHERMES et al., 1997; VIDAL et al., 2010).

**Figura 2** – História evolutiva do alotetraplóide *C. arabica*. **A** – Origem de *C. arabica*, onde os genomas dos progenitores são representados pelos diplóides *C. canephora* e *C. eugenioides*. **B** – Origem do *C. arabica* cultivado. (retirado de VIDAL et al., 2010 e baseado em ANTHONY et al., 2002).

**A Origem de *Coffea arabica* L. B Origem do *C. arabica* cultivado**



*C. canephora* é uma planta originária do centro-oeste da África (Figura 1), considerada uma espécie rústica e menos exigente no seu tratamento nutricional e na temperatura (MENDES et al., 2002). Essa espécie se multiplica por fecundação cruzada, principalmente pela ação do vento e insetos polinizadores e possui uma grande variabilidade genética (PURSEGLOVE, 1968; CRANE & WALKER, 1983; FREE, 1993). *C. canephora* apresenta teores de cafeína e de ácidos clorogênicos maiores que o de *C. arabica* (KY et al., 2001), porém a qualidade da bebida é considerada inferior ao *C. arabica* (LEROY et al., 2006). Nos últimos anos, a produção de *C. canephora* tem se expandido no mundo todo, especialmente no Vietnã (ICO, 2012).

*C. eugenioides* é uma espécie que não possui interesse comercial, pois produz poucos frutos, com grãos muito pequenos. Desperta interesse do melhoramento genético por apresentar resistência a nematóides e ao minador de folhas *Leucoptera coffeella* (bicho-mineiro) (GUERREIRO FILHO, 1992). *C. eugenioides* cresce em altitudes mais elevadas e próximas a bordas florestais (MAURIN et al., 2007).

É observada uma baixa diversidade genética em *C. arabica*, que é atribuída à sua origem, biologia reprodutiva (autogamia) e pelo processo de evolução desta espécie (ANTHONY et al., 2002). Adicionalmente, muitos dos cultivares de *C. arabica*, como Caturra, Mundo Novo e Catuaí, e cultivares derivados destes, foram selecionados de duas populações-base: Bourbon e Typica (ANTHONY et al., 2002; VIDAL et al., 2010).

### 2.1.3 Nutrição Mineral em Plantas

Estão classificados 17 elementos como essenciais para as plantas: carbono (C), oxigênio (O), hidrogênio (H), nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), cloro (Cl), manganês (Mn), boro (B), zinco (Zn), ferro (Fe), cobre (Cu), níquel (Ni) e molibdênio (Mo) (SALISBURY & ROSS, 1991). Desses, o C, O e H são retirados do ar e da água, sendo chamados de elementos não minerais e constituem mais de 95% da matéria seca das plantas (FERREIRA, 2012).

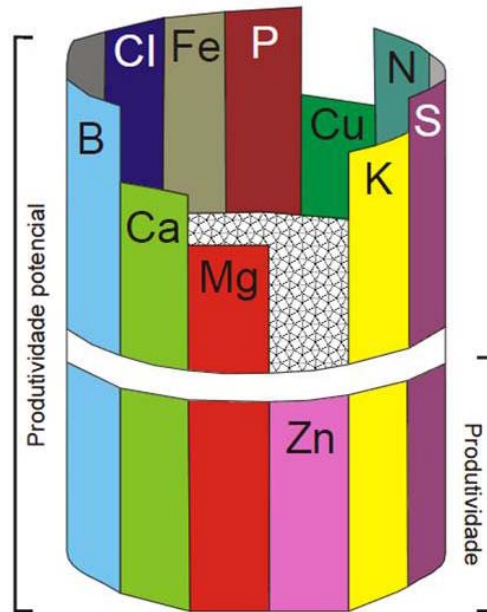
Apesar de constituírem menos de 5% da matéria seca das plantas, os elementos minerais são considerados essenciais ao desenvolvimento vegetal (FERNANDES, 2006; BARBOSA et al., 2009). Os nutrientes minerais são classificados em macro e micronutrientes, de acordo com a concentração encontrada nos tecidos.

Os elementos minerais encontrados em maiores concentrações nos vegetais, que individualmente podem compor mais de 0,1% de massa seca, segundo Maathuis (2009), são denominados de macronutrientes, são eles: nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S). Já os encontrados em menores concentrações são chamados de micronutrientes. Entre eles estão o cloro (Cl), manganês (Mn), boro (B), zinco (Zn), ferro (Fe), cobre (Cu), níquel (Ni) e molibdênio (Mo) (MALAVOLTA, 2006; WARAICH et al., 2011).

A divisão entre macro e micronutrientes não tem relação direta com maior ou menor essencialidade. Todos estes elementos são igualmente importantes e essenciais para o desenvolvimento das plantas, mas em quantidades diferentes. Uma consequência da essencialidade por igualdade dos nutrientes é a chamada "Lei do mínimo" de Sprengel-Liebig (Figura 3) (PLOEG et al., 1999). Essa lei estabelece

que todos os elementos nutricionais tem que estar disponíveis para planta na quantidade e proporção ideal.

**Figura 3** – Representação da Lei de Sprengel- Liebig, onde estão representados todos os nutrientes essenciais, nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), zinco (Zn), cobre (Cu), manganês (Mn), ferro (Fe), boro (B), cloro (Cl), molibdênio (Mo), cobalto (Co).



Fonte: [www.portalsaofrancisco.com.br](http://www.portalsaofrancisco.com.br) (Nutrição das plantas).

Os nutrientes minerais exercem inúmeras funções nas plantas, sendo partes integrais de compostos de carbono (N, S), essenciais para o armazenamento e uso de energia (P), estão associados com a parede celular (Ca, B, Si), partes constituintes de enzimas ou outros compostos essenciais do metabolismo (Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, Mo), ativadores ou controladores na atividade de enzimas (K, Na, Cl, Mg, Ca, Mn, Fe, Zn, Cu), e servem como contra-íons para cargas positivas ou negativas (K, Na,  $\text{NO}_3$ , Cl) (MALAVOLTA, 2005).

O nitrogênio (N) é um dos elementos essenciais para o desenvolvimento e produção das plantas e o elemento mineral requerido em maior quantidade pelos vegetais (TAIZ & ZEIGER, 2009). Sua disponibilidade estimula o crescimento e a atividade do sistema radicular, com reflexos positivos na absorção de outros nutrientes e na quantidade de massa seca produzida (SANTI et al., 2003). O elemento N é absorvido pelas plantas nas formas iônicas de nitrato ( $\text{NO}_3$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), podendo ser adquirido também na forma de  $\text{H}_2$  em plantas que

realizam a fixação biológica do nitrogênio (PRADO, 2008). O N faz parte da estrutura da planta, sendo componentes de aminoácidos, proteínas, enzimas, DNA (ácido desoxirribonucleico), RNA (ácido ribonucleico), ATP, clorofila, dentre outras moléculas importantes (MALAVOLTA et al., 1997).

Outro nutriente de grande importância para desenvolvimento das plantas é o fósforo (P). Ele é absorvido pelas plantas na sua forma inorgânica ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) que é originário da solubilização de minerais fosfatados e da mineralização da matéria orgânica (SCHUMACHER et al., 2003). O fósforo tem relevante papel na formação molecular de DNA e do RNA, bem como do ATP - adenosina tri-fosfato (SANDIM et al., 2008).

O potássio (K) é o elemento que apresenta maior mobilidade na planta e passa de uma célula para outra através do xilema para o floema, por esta razão é o componente mineral de maior expressão durante os processos osmóticos que envolvem absorção e armazenamento de água pelas plantas (TORRES & PEREIRA, 2008). O íon  $\text{K}^+$ , não faz parte de nenhuma estrutura ou molécula orgânica, sendo encontrado como cátion livre ou adsorvido, o que o torna facilmente trocável nas células ou nos tecidos e com alta mobilidade intracelular (CHAGAS et al., 2007).

O cálcio (Ca) é absorvido pelas raízes como  $\text{Ca}_2^+$ , sendo suprido principalmente por fluxo de massa (MIOTTO et al., 2008). O Ca está envolvido em várias reações químicas, incluindo troca iônica, precipitação e fixação (MELO et al., 2000).

A função do magnésio (Mg) na planta está relacionada com a sua capacidade para interagir com ligantes nucleofílicos (ex. grupos fosforil) através de ligações iônicas, e atuar como um elemento de ligação e ou formar complexos de diferentes estabilidades. As plantas absorvem Mg na forma de  $\text{Mg}_2^+$  (NAIFF, 2007). Este nutriente é transportado pelo fluxo transpiratório, mas, também podendo ser redistribuído através do floema, quando ocorre alguma deficiência (PRADO, 2008). Na planta apenas 15 a 20% da concentração de Mg é utilizado como elemento central da molécula de clorofila, seu papel mais conhecido (MENGEL & KIRKBY, 2001; PRADO, 2008).

O enxofre (S) é importante na formação de todas as proteínas vegetais, na síntese de tiamina, co-enzima A e sulfolipídios, também atua como ativador enzimático, na fotossíntese participa da síntese da clorofila, absorção do

CO<sub>2</sub>, reações de fosforilação e é essencial ainda no processo de fixação do N<sub>2</sub> pelas leguminosas noduladas (PRADO, 2008).

O zinco (Zn) em plantas é absorvido na forma de Zn<sup>2+</sup>, suas funções estão relacionadas às propriedades de cátion bivalente, com forte tendência a formar complexos tetraédricos. O Zn atua como componente metálico de enzimas ou como co-fator de inúmeras delas. Alguns exemplos das enzimas que contém Zn são: a desidrogenase alcoólica, superóxido dismutase (SOD), anidrase carbônica e RNA-polimerase. Zn também pode agir como ativador enzimático por participar do metabolismo de carboidratos, proteínas, triptofano e AIA (ácido indol acético) (MARSCHNER, 1995; MARTINEZ et al., 2005).

O cloro (Cl) é um nutriente móvel na planta, ocorre na solução do solo na forma do íon Cl<sup>-</sup> e tem comportamento similar ao NO<sub>3</sub><sup>-</sup> quanto à adsorção em cargas positivas. É o micronutriente com menor poder de adsorção nos solos, sendo facilmente lixiviado (FURTINI NETO et al., 2001). O Cl é necessário para a decomposição fotoquímica da água liberando o oxigênio (CASTRO, 2007).

O boro (B) é praticamente imóvel na planta e importante no metabolismo do DNA, RNA e AIA. É essencial para a formação e germinação das sementes. O B forma complexos açúcar/borato relacionados com a translocação de açúcares e é importante na formação de proteínas (SENGIK, 2005).

O molibdênio (Mo) é importante para fixação biológica do nitrogênio no solo e nas transformações do mesmo nas plantas. O Mo ocorre no solo na forma aniônica e sua atividade aumenta com o aumento de pH. Em solos ácidos e com alto teor de óxidos hidratados de Fe e Al, a forte adsorção do molibdato reduz em muito a disponibilidade deste micronutriente. As necessidades quantitativas de Mo pelas plantas estão entre os menores dentre os elementos conhecidos (PRADO, 2008).

#### 2.1.4 Nutrição Mineral no Cafeeiro

Devido ao seu impacto na produção agrícola, a maior parte dos gastos relacionados a fertilização em plantas recaem sobre a adubação nitrogenada (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010). O Brasil é, altamente, dependente da importação de fertilizantes para uso na agricultura. Estima-se que a flutuação cambial de um único mês (setembro/2011) pode provocar impactos da ordem de 100 milhões de reais no gasto com adubos no estado do Paraná (RIBEIRO, 2011). Em

consequência, o desenvolvimento sustentável tem sido muito debatido, procurando reduzir o uso de fertilizantes minerais e incrementar o uso de fertilizantes orgânicos (van RAIJ, 2007).

Na cultura do cafeeiro o suprimento de nutrientes é feito principalmente por adubos minerais, suprimindo os três macronutrientes primários, N, P e K (van RAIJ, 2007).

O desenvolvimento do cafeeiro, assim como qualquer outra cultura, é influenciado por diversos fatores, dos quais podemos ressaltar o estado nutricional da planta.

Segundo Matiello (1991), além da exigência nutricional, outras características podem afetar a disponibilidade e o suprimento dos nutrientes: 1) Tipo de solo com suas características físicas e químicas; 2) Condições climáticas, principalmente a distribuição de chuvas; 3) Características do cafezal, como idade das plantas, espaçamento, variedade, condução anterior, potencial de produção, estado vegetativo; 4) Qualidade e o tipo dos adubos ou corretivos utilizados (tratos culturais); 5) Períodos de maior consumo dos nutrientes pelo cafeeiro; 6) Diagnose de carências (visual ou através de análise foliar); 7) Forma e utilização dos adubos (modo, época, etc).

Os sintomas de deficiência e toxidez nutricional são típicos para um determinado elemento e a folha, de modo geral, é o órgão que reflete melhor o estado nutricional da planta/diagnose (FAQUIN, 2002) (Tabela 1).

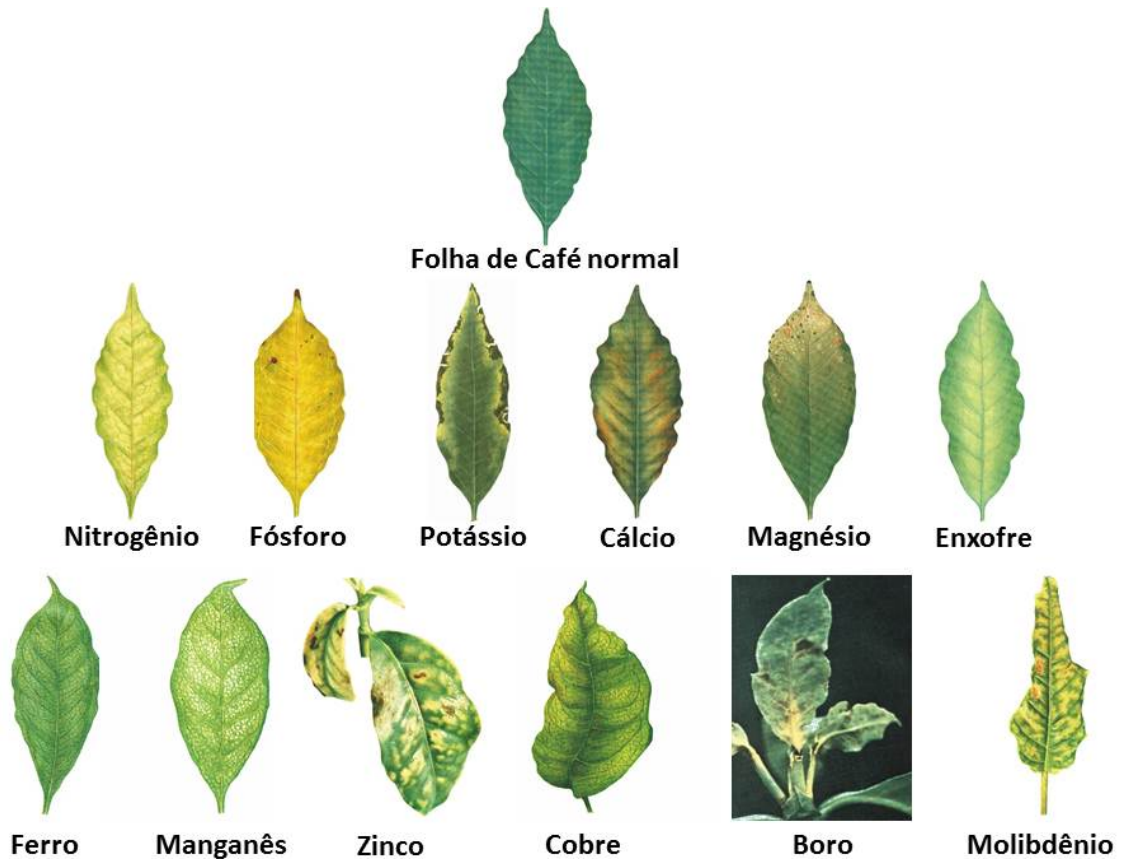
**Tabela 1** – Descrição dos principais sintomas de deficiência (-) e toxidez (+) nutricional no cafeeiro.

Sintoma	Elementos
Folhas velhas e amareladas; pouca brotação e vegetação; morte descendente de ramos.	- N
Muita folha e pouco fruto.	+ N
Folhas verdes sem brilho e depois com manchas necróticas.	- P
Clorose e necrose das pontas e margens das folhas mais velhas; morte descendente de ramos; frutos chochos.	- K
Clorose internerval das folhas mais velhas; muita folha caída.	- Mg
Clorose das folhas mais novas; internódios mais curtos.	- S
Internódios curtos; folhas menores, deformadas ou não; morte das gemas terminais e superbrotamento.	- B
Folhas velhas com clorose mosqueada e depois manchas necróticas nas margens.	+ B
Folhas novas com nervuras salientes; mudas – folhas voltada para baixo e com manchas necróticas.	- Cu
Folhas velhas com manchas aquosas e depois pardas ou negras; queda de folhas; morte das raízes.	+ Cu
Folhas novas amareladas até brancas; com nervuras verdes e depois pálidas.	- Fe
Folhas novas verde-pálidas com nervuras verdes e tecidos ao longo das mesmas também verdes; pontuações brancas entre as nervuras.	- Mn
Folhas pequenas, verde-claras, com bordos amarelados.	+ Mn
Internódios curtos; morte descendente de ramos; folhas pequenas, cloróticas e lanceoladas; “rosetas” na ponta dos ramos.	- Zn
Folhas novas com clorose nas margens.	- Ca

Fonte: Faquin (2002).

A Figura 4 demonstra os vários sintomas de deficiência e de toxidez que as plantas de cafeeiro, podem manifestar em suas folhas. Cabe ressaltar que os sintomas podem apresentar pequenas variações:

**Figura 4** – Principais diagnoses visuais das deficiências nutricionais em folhas de caféiro.



**Fonte:** disponível em: <http://fertiagrolab.com.br>.

#### 2.1.5 Nitrogênio e seu Uso em Plantas de Interesse Agrônômico

Todos os vegetais requerem N para seu desenvolvimento. É estimado que este elemento representa cerca de 2% da matéria seca total em plantas, onde ele é componente de proteínas, ácidos nucleicos, coenzimas e produtos secundários do metabolismo vegetal (MILLER & CRAMMER, 2004).

O N é disponível no solo nas mais diversas formas, das quais as três mais abundantes são o nitrato, a amônia e aminoácidos (MILLER & CRAMMER, 2004). Dentre os fatores que afetam o aproveitamento do N disponível no solo pelas plantas podem ser citados a disponibilidade de água, pH, fertilidade, tipo e microbiota do solo (FREITAS et al., 2007). Existem ainda diferentes mecanismos moleculares específicos de absorção nas raízes para cada forma de N. Além da absorção de nitrogênio do solo, a eficiência no uso de nitrogênio (em inglês *NUE* –

*Nitrogen Use Efficiency*) depende também da assimilação de nitrato e amônio, e de como a cultura recicla o N orgânico (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010).

Nos últimos 50 anos, o aumento da produção agrícola pode ser atribuído ao uso cada vez mais intenso de fertilizantes nitrogenados (TILMAN et al., 2001). Entretanto, o volume de N de fato incorporado pela planta proveniente dos fertilizantes é relativamente baixo (PEOPLES et al., 1995; SYLVESTER-BRADLEY & KINDRED, 2009). A maior parte do N utilizado na adubação é volatilizado, ou acaba impactando sistemas aquáticos em torno dos cultivos agrícolas, causando poluição e eutrofização (JOHNSON et al., 2007). Dessa forma, é fundamental o desenvolvimento de estratégias de vanguarda que garantam a produtividade agrícola com sustentabilidade ambiental baseada no menor uso de fertilizantes nitrogenados.

Nos últimos anos, diversos estudos visaram mitigar a base genética, assim como os mecanismos bioquímicos e enzimáticos envolvidos na absorção, assimilação e remobilização de nitrogênio, tanto em plantas-modelo como, num segundo momento, em plantas de interesse agrônomo (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010). O maior intento desses trabalhos é determinar quais fatores limitantes podem ser manipulados para o aumento da eficiência no uso de nitrogênio.

#### 2.1.6 Absorção de Nitrogênio

A absorção de nutrientes é variável de acordo com a morfologia e fisiologia das raízes. Ela pode acontecer por meio de interceptação radicular, fluxo em massa ou difusão, além de haver diferentes taxas de absorção de acordo com a necessidade de cada planta (HORN et al., 2006).

No caso do nitrogênio, a adaptação vegetal a diferentes ambientes está diretamente relacionada a forma de N preferencialmente absorvida pelas plantas. De maneira geral, plantas adaptadas a condições de baixo pH e solos redutores tendem a absorver preferencialmente o amônio. Já nos casos de pH mais alto e solos mais aerados, o nitrato é a forma predominantemente absorvida (conforme revisado em MAATHUIS, 2009). Não é conhecida de maneira exata a forma de N preferencialmente absorvida pelo cafeeiro, entretanto sabe-se que a demanda aumenta principalmente durante a fase de expansão dos frutos (PEZZOPANE et al., 2003).

### 2.1.7 Absorção de Nitrato

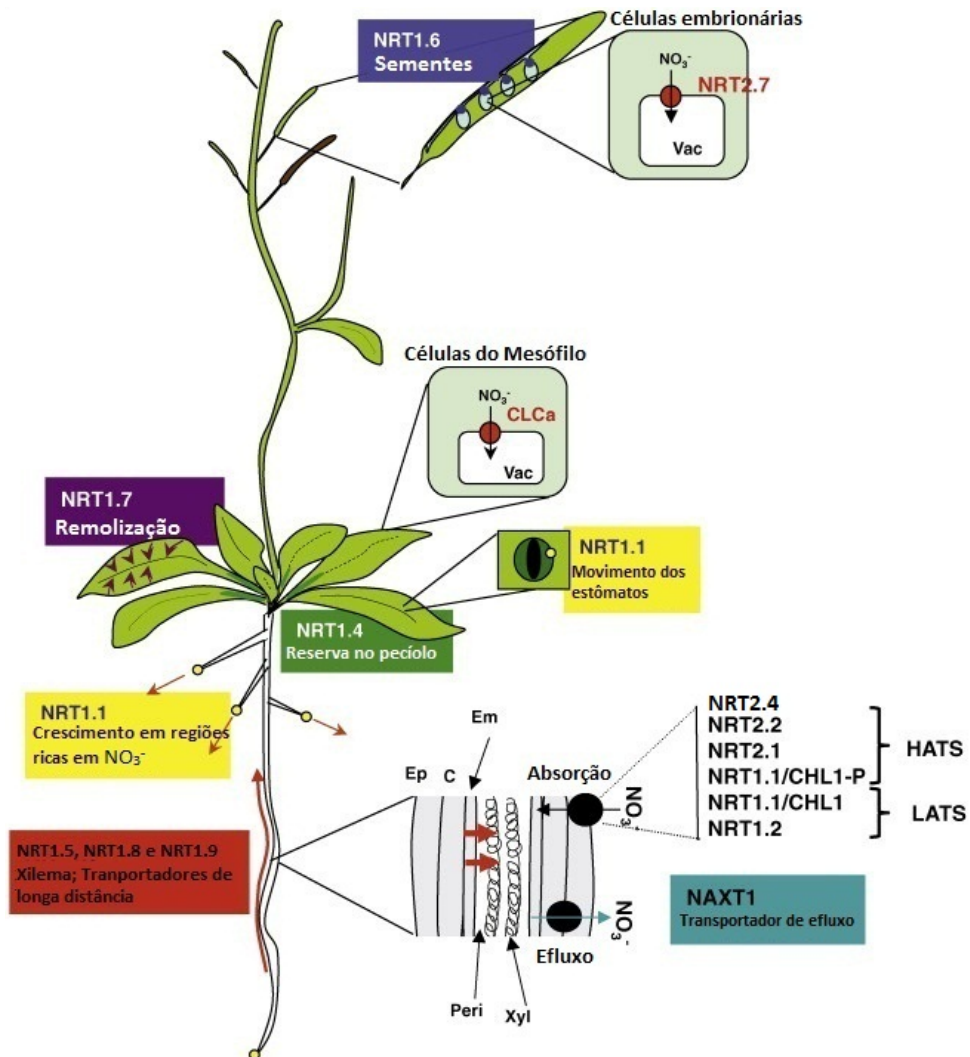
O nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) é a forma de N que mais tem-se informações sobre os mecanismos moleculares de absorção, sobretudo por estudos na planta-modelo *Arabidopsis thaliana*. Fisiologicamente, ele pode desempenhar diversas funções como molécula sinalizadora que controla o metabolismo e desenvolvimento da planta (KROUK et al., 2010), transcrição de genes (WANG et al., 2004), acúmulo de proteínas (PRINSI et al., 2009), eventos de fosforilação (LIU & TSAY, 2003; HO et al., 2009), germinação (ALBORESI et al., 2005), movimentos estomáticos (GUO et al., 2003) e desenvolvimento da parte aérea e da raiz (VIDAL & GUTIERREZ, 2008).

Foram identificados três sistemas fisiológicos de absorção de  $\text{NO}_3^-$ : o sistema constitutivo de alta afinidade (*cHATS* – *constitutive High Affinity Transport System*, ou simplesmente *HATS*), o sistema indutível de alta afinidade (*iHATS*) e o sistema de baixa afinidade (*LATS* – *Low Affinity Transport System*) (GLASS, 2003; PLETT et al., 2010). Os *K<sub>m</sub>* podem variar de 1  $\mu\text{M}$  (*HATS*) a 1 mM (*LATS*) e o padrão transcricional desses transportadores pode ser constitutivo (*cHATS*) ou induzido (*iHATS*) por deficiência de N (LI et al., 2007; MILLER et al., 2007).

Diferentemente do sistema *HATS*, que apresenta um componente constitutivo e um passível de indução, o sistema de transportadores *LATS* é constitutivo. É importante ressaltar que cada um dos três sistemas proposto para absorção de  $\text{NO}_3^-$  (*cHATS*, *iHATS*, *LATS*) são constituídos por uma série de genes codificantes para transportadores da família *NRT*. Em *A. thaliana* existem 60 genes da família *NRT/PTR*, dos quais 53 pertencem a família *NRT1/PTR* e 7 pertencem a família *NRT2* (TSAY et al., 2007).

Destes genes, o transporte de baixa afinidade está diretamente relacionado com os transportadores da família *NRT1/PRT* (MILLER et al., 2007 e Figura 5), com exceção do *NRT1.1* que comporta-se como transportador de dupla afinidade (LIU et al., 1999).

**Figura 5** – Modelo proposto para as funções dos transportadores de  $\text{NO}_3^-$  em *Arabidopsis* (KROUK et al., 2010). Detalhe da absorção de nitrato do solo por: NRT1.1 (CHL1), NRT1.2, NRT2.1, NRT2.2 e NRT2. Transportador efluxo 1 (NAXT1), é um transportador da família NRT1, que intercede o efluxo de  $\text{NO}_3^-$  sob carga ácida. NRT1.5, NRT1.8 e NRT1.9 desempenham a função reguladora do transporte de  $\text{NO}_3^-$  via xilema através das raízes e caule.



Estudando a proteína *NRT1.1*, foi proposto que essa proteína pode atuar como um sensor de  $\text{NO}_3^-$ , necessário para a adaptação morfológica de raízes e conseqüentemente, na exploração do solo, visando uma maior eficiência para aquisição de N (REMANS et al., 2006). Outros estudos sugerem que a função regulatória realizada pela proteína *NRT1.1* está direcionada na modulação do crescimento de raízes primárias e laterais (GUO et al., 2001), na repressão do gene *NRT2.1* (MUÑOS et al., 2004) e na estimulação de  $\text{NO}_3^-$  durante a germinação (ALBORESI et al., 2005).

*NRT1.5* é mediador da saída de nitrato a partir de células da raiz, sendo responsável por carregar o nitrato do xilema da raiz para as folhas através do transportador de nitrato (LIN et al., 2008). *AtNRT1.8* é responsável pela recuperação de nitrato pelo xilema (LI et al., 2010). *AtNRT1.7* está envolvida na remobilização de nitrato, mediada pelo floema das folhas mais velhas para as mais jovens (FAN et al., 2009). *AtNRT1.6* está envolvida no transporte de  $\text{NO}_3^-$  nos tecidos de embriões em desenvolvimento (ALMAGRO et al., 2008).

Em *A. thaliana* dois membros da família *NRT2*, *AtNRT2.1* e *AtNRT2.2*, são caracterizados por corresponderem ao sistema *iHATS*, enquanto que *AtNRT2.3*, *AtNRT2.4*, *AtNRT2.5*, *AtNRT2.6* e *AtNRT2.7* correspondem ao sistema *cHATS* (Figura 5). A expressão dos genes *NRT2* é estimulada pela presença externa de  $\text{NO}_3^-$  e reprimida pela presença interna de glutamina. Porém, o gene *AtNRT2.5*, ao contrário de outros, é inibido pela adição de  $\text{NO}_3^-$  (OKAMOTO; OKADA, 2004).

Em arroz foram encontrados quatro genes da família *NRT2* (*OsNRT2.1~2.4*) envolvidos no transporte de nitrato no sistema *HATS* (ARAKI; KASEGAWA, 2006). Neste estudo, foi observado que o pré-tratamento com amônio afetou a expressão dos *OsNRT2s* nas raízes. Em plântulas pré-tratadas com amônio, a indução dos genes *OsNRT2.2* e *OsNRT2.4* foi observada duas horas após o tratamento com nitrato, entretanto, no início do tratamento os genes *OsNRT2.2* e *OsNRT2.3* já eram expressos (ARAKI; KASEGAWA, 2006).

A absorção de nitrato via raiz resulta do equilíbrio entre o nitrato absorvido e o efluxo do mesmo. O papel fisiológico do efluxo de nitrato ainda não é muito bem esclarecido (DANIEL-VEDELE; CHAILLOU, 2005; SEGONZAC, et al., 2007), mas sabe-se que ela é mediada pelo transportador *NAXT1* (SEGONZAC, et al., 2007). *NAXT1* também pertence à família *NRT1/PTR* e é expresso principalmente no córtex das raízes maduras.

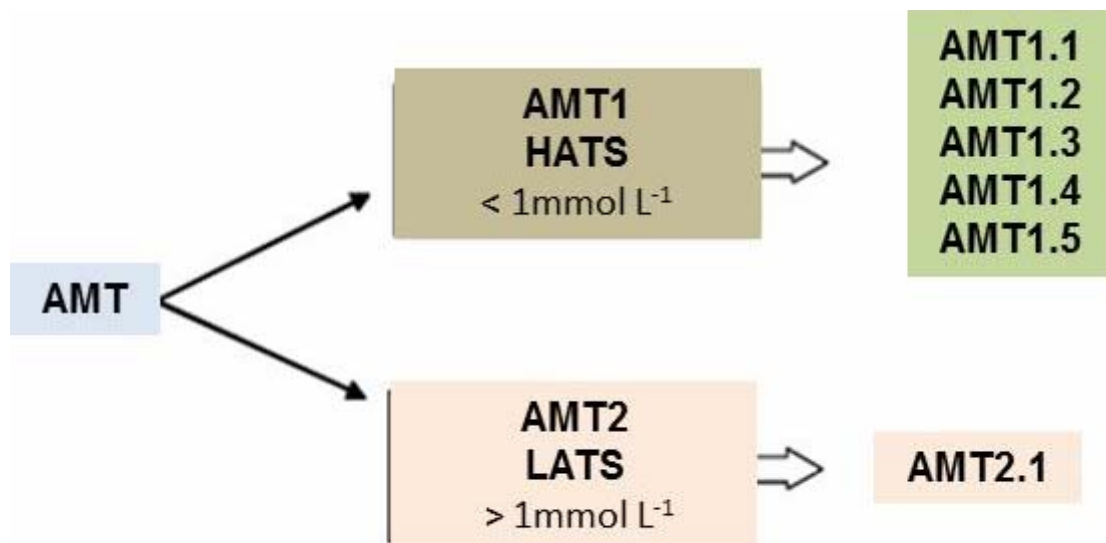
A compreensão sobre a regulação dos transportadores de nitrato em diversos níveis permite adequar o processo de absorção desta fonte de N de acordo com sua disponibilidade no solo.

### 2.1.8 Absorção de Amônio

Os aspectos bioquímicos e moleculares relacionados ao transporte de amônio em plantas já foram estudados exaustivamente em sistemas modelo, conforme revisado por Loqué e von Wirén (2004). Os genes responsáveis pelo transporte de amônio pertencem a família *AMT* (Figura 6). O grande número de transportadores de uma mesma família permite às plantas se adequar às várias condições de concentração de  $\text{NH}_4^+$  no meio externo. Já foi demonstrado em sistemas modelo que estes transportadores podem atuar de uma maneira aditiva (YUAN et al., 2007).

A superfamília de genes *AMT* pode ser dividida pela afinidade de transporte em *AMT1* e *AMT2*, que codificam os transportadores dos sistemas de alta e baixa afinidade, respectivamente (Figura 6).

**Figura 6** – Representação da família de transportadores de  $\text{NH}_4^+$  (*AMT* – Transportador de amônio), de alta (*AMT1*) e baixa afinidade (*AMT2*), com base em dados disponíveis para *A. thaliana* (SOUZA; FERNANDES, 2006).



Os genes da família *AMT1* já foram identificados em muitas espécies vegetais (LOQUÉ et al., 2004; TSAY et al., 2007). O primeiro gene *AMT1* de plantas caracterizado funcionalmente foi *AtAMT1.1*, de *A. thaliana*, por testes de complementação em levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) em mutantes com deficiência no transporte de amônio (NINNEMANN et al., 1994). Recentemente, foi clonado o gene *CitAMT1*, primeiro membro desta família em *Citrus* (CAMAÑES et

al., 2007). Já em *Oryza sativa* L. existem quatro famílias de *AMT*: *OsAMT1*, *OsAMT2*, *OsAMT3* e *OsAMT4* (SUENAGA et al., 2003).

Todas as proteínas *AMT* relatadas em plantas foram localizadas na membrana plasmática, confirmando o seu papel na aquisição de amônio através das células (LUDEWIG et al., 2002; SOHLENKAMP et al., 2002; SIMON-ROSIN et al., 2003; LUDEWIG et al., 2003; LOQUÉ et al., 2006; YUAN et al., 2007b).

*AtAMT1.1*, *AtAMT1.3* e *AtAMT1.5* são altamente expressos em condições de supressão de N nas células rizodérmicas, incluindo os pelos radiculares, onde sua contribuição é de forma ativa com aproximadamente 70-80% do total da capacidade de absorção de HATs de amônio em *Arabidopsis* (LOQUÉ et al., 2006, YUAN et al., 2007a). Em contrapartida, *AtAMT1,2*, apresentou uma afinidade mais baixa para amônio e está localizado em células endodérmicas e corticais, e parece ser responsável pela absorção de amônio por via apoplástica (YUAN et al., 2007).

Embora a expressão dos genes *AMT1* esteja descrita nas raízes, os genes que codificam para os transportadores *AMT1.1* e *AMT1.2* são também relatados como transcricionalmente ativos na parte aérea, demonstrando assim, a importância desses transportadores no processo de reassimilação de  $\text{NH}_4^+$  produzido na parte aérea das plantas, principalmente como consequência da fotorrespiração (SOUZA & FERNANDES, 2006).

#### 2.1.9 Transporte de Uréia

A uréia está difundida na natureza, caracterizando-se como fonte de N disponível para o crescimento e desenvolvimento de diversos organismos, incluindo bactérias, fungos e plantas (WANG et al., 2008). A uréia nas plantas é derivada a partir da arginina, que é a forma mais importante de transporte e armazenamento de N nos vegetais (POLACCO; HOLLAND, 1993; WITTE, 2011), podendo também ser gerada a partir do catabolismo de ureídos como alantoína e alantoatos (TODD; POLACCO, 2004; CAO et al., 2010).

O sistema de transporte de uréia mediado por proteínas transportadoras em plantas foi identificado mais recentemente em comparação a outros sistemas transportadores. Durante um longo tempo, devido ao seu baixo peso molecular, caráter neutro e alta solubilidade em água, acreditava-se que a uréia

permeava a membrana celular por difusão. Porém a primeira evidência de transporte ativo *in planta* foi apresentada por Liu et al. (2003). Foi demonstrado que a absorção de uréia por células em suspensão de *Arabidopsis* era sensível a adição de um protonóforo (CCCP), eliminando, portanto, o co-transporte de uréia com prótons e indicando transporte ativo.

Foram descritos e caracterizados dois mecanismos de transporte de uréia em plantas: um de baixa (LATS) e um de alta afinidade (HATS). Os LATS de uréia são relacionados à aquaporinas (proteínas intrínsecas de membrana) pertencentes à subfamília PIP (*Plasma Membrane Intrinsic Protein*), TIP (*Tonoplast Membrane Intrinsic Protein*) e NIP (NOD26-like MIP), e são descritas como facilitadores no movimento de uréia com concentração linear. Porém, essa atividade no transporte de uréia só foi descrita em sistemas heterólogos (como leveduras e oócitos de sapo) (KLEBL et al., 2003; LIU et al., 2003; SOTO et al., 2008).

Já o transporte de alta afinidade é desempenhado pelo homólogo do gene *DUR3* de levedura (EIBERRY et al., 1993). O gene *AtDUR3* codifica o principal transportador de uréia em *A. thaliana*, localizado na membrana plasmática de células epidérmicas da raiz. Esse transportador é essencial para absorção de uréia da solução do solo, apresentando alta afinidade por esse substrato ( $K_m = 4 \mu\text{M}$ ) (LIU et al., 2003; KOJIMA et al., 2007). Embora haja evidências filogenéticas de que este transportador esteja presente em todo o reino vegetal (DeMICHELE et al., 2012), ele foi caracterizado apenas em sistemas vegetais modelo (LIU et al., 2003; WANG et al., 2012).

Nas culturas agrícolas altamente exigentes em N, tais como o cafeeiro, esses transportadores apresentam um grande potencial de exploração, visando à otimização da absorção de uréia diretamente da solução do solo, antes que sofra hidrólise e seja convertida em formas de nitrogênio voláteis.

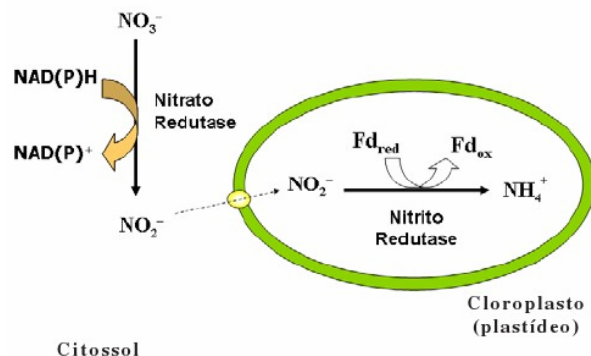
#### 2.1.10 Assimilação do Nitrogênio

O metabolismo de N é um processo fundamental da fisiologia vegetal, pois através dele o N é assimilado e reduzido até ser incorporado em esqueletos carbônicos, como as proteínas, ácidos nucleicos e outras moléculas essenciais das células.

As principais enzimas envolvidas no processo de incorporação do N nas plantas são: nitrato redutase (NR; EC 1.6.6.1), 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). Para cada N assimilado pela planta são consumidos 12 ATPs (EPSTAIN; BLOOM, 2006).

A nitrato redutase (NR) é a enzima chave envolvida na regulação do metabolismo de N, uma vez que o nitrato é uma das principais formas de N absorvida pelas raízes e é reduzido a  $\text{NH}_4^+$ , antes de ser incorporado em compostos orgânicos nas raízes ou na parte aérea (MEYER; STITT, 2001; TAIZ; ZEIGER, 2009). A NR reduz o nitrato a nitrito utilizando o  $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$  como substância doadora de elétrons, através da reação abaixo (Figura 7).

**Figura 7** – Representação da ação da Nitrato e Nitrito Redutase em plantas.



**Fonte:** disponível em: [www.lookfordiagnosis.com](http://www.lookfordiagnosis.com).

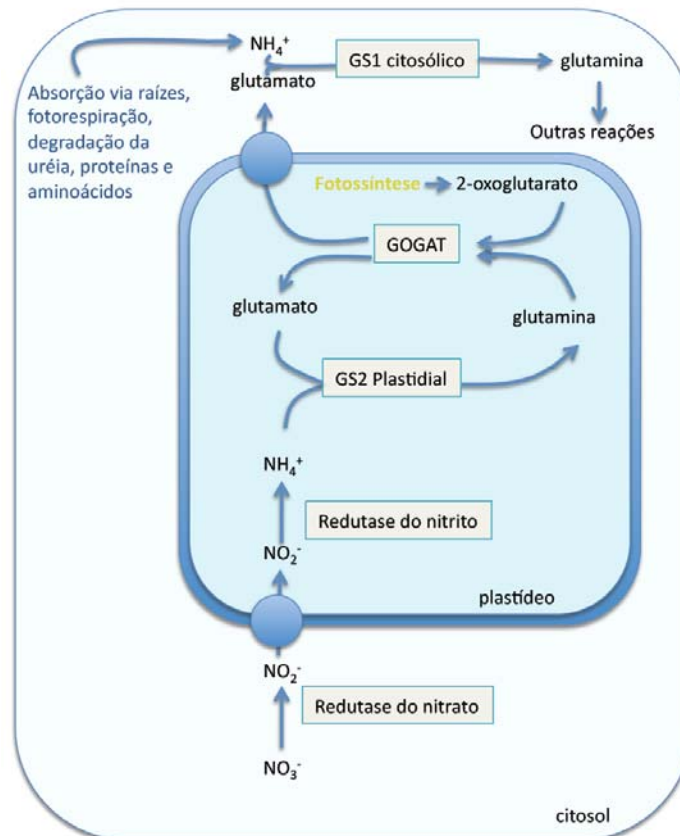
Além de ser uma importante fonte de N para as plantas, o nitrato é uma molécula osmoreguladora e sinalizadora, que modula a síntese de citocininas, que por sua vez controlam processos de desenvolvimento, síntese de proteínas e aquisição de macro e micronutrientes (HIROSE et al., 2008).

Na realização do metabolismo de plantas C3 nos tecidos da parte aérea, tal como, em arroz, a redução de nitrato está associada com a oxidação de metabólitos que são gerados pela fotossíntese e transportados ao citossol, através da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Em plantas de metabolismo C4, esta reação está vinculada à reação catalisada pela enzima NADH-malato desidrogenase.

O íon nitrito é altamente reativo e muito tóxico (TAIZ; ZEIGER, 2009), as células vegetais fazem o rápido transporte do nitrito que foi originado durante a redução do nitrato no citosol para o interior dos cloroplastos das folhas e nos plastídeos da raiz. Nessas respectivas organelas, a nitrito redutase (NiR), reduz o nitrito a amônio (Figura 7).

O amônio resultante da redução do nitrato é incorporado a compostos orgânicos pela conversão do nitrogênio-amônio em nitrogênio-amino. Esta conversão é feita pela ação do sistema enzimático glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) (LEA, 1993). 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 8). Através da interconversão entre glutamina e asparagina sintase ocorre o equilíbrio do metabolismo do carbono e nitrogênio (CORUZZI; BUSH, 2001).

**Figura 8** – Rota da assimilação primária e reciclagem do N em células vegetais (CORUZZI, 2003). Essas vias metabólicas são reguladas em diferentes níveis (transcricional, traducional e pós-traducional) por diversos fatores, incluindo metabólitos nitrogenados e luz.



Em plantas existem duas isoformas de GS: a GS1 (citosólica), GS2 (plastídica) (MIFLIN; HABASH, 2002). A GS1 ocorre no citosol de raízes e células da parte aérea e a GS2 está presente em tecidos fotossintéticos, raízes e plastídeos de outros tecidos não fotossintetizantes (ISHIYAMA et al., 2004). Estudos com várias espécies relataram que a GS1 é codificada por uma família multigênica (entre três e seis genes), porém para GS2 existe apenas um gene na maioria das plantas (HIREL; LEA, 2002).

A síntese de glutamina através da GS em plantas é considerada base da produtividade das plantas (UNNO et al., 2006). Ela catalisa a etapa da assimilação do N inorgânico que é a incorporação do amônio ao glutamato, resultando em glutamina. O grupamento amino da glutamina é transferido para  $\alpha$ -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.

Vários estudos têm sido realizados para elucidar a participação de cada enzima de assimilação durante o crescimento e o desenvolvimento das plantas (MIFLIN; HABASH, 2002; TCHERKEZ; HODGES, 2008), mas, a presença de múltiplas isoenzimas, distribuídas nos diferentes compartimentos celulares e órgãos, têm gerado resultados divergentes, dificultando o entendimento dos processos de assimilação (ISHIYAMA et al., 2004). A fonte disponibilizada de N e o local onde ocorre a sua assimilação podem ser importantes, especialmente em condições de crescimento nas quais a disponibilidade de energia é limitada para as plantas (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000).

#### 2.1.11 Remobilização do Nitrogênio

A redistribuição ou remobilização de nutrientes nas plantas é processada via floema, dos pontos de reserva nos vacúolos, para as partes apicais de crescimento, aérea ou radicular, juntamente com os fotoassimilados (BATAGLIA, 2001). Quando ocorre falta de um nutriente no ápice (demanda da parte aérea), um sinal é enviado e inicia-se a redistribuição das folhas mais velhas para as mais novas com maior ou menor rapidez, dependendo da sua função e mobilidade na planta.

A remobilização dos nutrientes minerais das folhas maduras para as áreas de crescimento é de grande importância para a conclusão do ciclo de vida das plantas, porém, a quantidade redistribuída, difere entre os minerais e reflete na localização dos sintomas visuais de deficiência nutricional nas plantas (CAMARGOS, 2005). Sintomas de deficiência nas folhas mais velhas elevam as taxas de redistribuição do nutriente, enquanto que em folhas mais novas e meristemas apicais, acarreta na redistribuição insuficiente (EPSTEIN; BLOOM, 2006).

A maior parte desta remobilização ocorre durante a senescência, onde N é transportado principalmente através de aminoácidos. Cerca de 80% do total de N encontrado nas folhas estão alocados nos cloroplastos, principalmente sob a forma de proteínas, sendo uma importante fonte de N para remobilização (ADAM et al., 2001). Dentre as proteínas cloroplasmáticas, a RUBISCO, é descrita como a principal proteína submetida à proteólise e responsável pela maior parte da remobilização de N durante a senescência foliar e preenchimento dos grãos (MAE et al., 1983). A degradação de proteínas pode ocorrer por três vias: a via de degradação do cloroplasto, a via vacuolar e autofágica, e a via proteossoma ubiquitina-26S (LIU et al., 2008).

Durante o processo de remobilização de N durante a senescência, quando as proteínas foliares são degradadas, o N é liberado na forma de  $\text{NH}_4^+$  e reassimilado, sendo convertido principalmente para as amidas glutamina e asparagina, que conseqüentemente são translocadas para os órgãos de crescimento e desenvolvimento (GHOSH et al., 1995; NAKASATHIEN et al., 2000).

Com a degradação das proteínas, durante a senescência, os aminoácidos liberados a partir das raízes e folhas são transportados para o floema. Embora todos os aminoácidos sejam remobilizados, a glutamina, asparagina, seguido pelo glutamato, aspartato, serina, alanina e são os aminoácidos predominantes no floema (SANDERS et al., 2009). Um grande número de transportadores de aminoácidos tem sido identificado em plantas através da análise do genoma e pela homologia. Sabe-se muito pouco sobre suas funções, com o entendimento e melhor caracterização, a sua utilização pode ter um grande potencial para melhorar o NUE (Uso eficiente de nitrogênio). Genes envolvidos na degradação de proteínas, no processo de autofagocitose e nas vias de ubiquitinação são também expressos sob limitação de N, e estão relacionados à reciclagem de N na célula (PENG et al., 2007).

### 2.1.12 A Biotecnologia e Estudos Transcricionais no Cafeeiro

Em razão de ser uma planta perene, na qual o ciclo de vida é longo, soluções biotecnológicas para se acelerar a propagação do cafeeiro já são estudadas desde os anos 70, como a cultura de tecidos, a micropropagação e a propagação *in vitro* (revisadas em CARNEIRO, 1997 e KUMAR et al., 2006).

Nos últimos anos foram incorporadas técnicas de Biologia Molecular ao Melhoramento do cafeeiro como o uso de marcadores moleculares para avaliação de diversidade genética e estudos de características quantitativas e resistência a doenças (MALUF et al., 2005; DIOLA et al., 2011). No entanto, e observada uma baixa diversidade genética entre genótipos, o que motivou estudos de maior escala, na genômica e transcriptômica.

Lin et al. (2005) desenvolveu um banco de sequências expressas (ESTs) do cafeeiro focado no desenvolvimento do fruto, com mais de 50000 sequências. Posteriormente o projeto brasileiro Genoma Café, desenvolvido por iniciativa do Consorcio Pesquisa Café, produziu um estudo com mais de 150000 sequências (VIEIRA et al., 2006; MONDEGO et al., 2011). Nesse projeto, foram parcialmente sequenciados transcritos oriundos de diversos órgãos/tecidos (folhas, raízes, frutos, flores e ramos) de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa*, órgãos/tecidos estes sadios ou submetidos a condições de estresse biótico e/ou abiótico em diversos estágios de desenvolvimento.

A maioria dos estudos moleculares em cafeeiro são muito direcionados a características básicas do melhoramento, com foco no entendimento do desenvolvimento dos frutos e seus aspectos metabólicos. No caso de estudos moleculares voltados para estresses em cafeeiro, a ênfase é grande no estudo do estresse hídrico (dos SANTOS et al., 2011; MARRACCINI et al., 2012).

Nesse sentido, este trabalho representa uma abordagem de vanguarda no desenvolvimento de estudos de genômica funcional em aspectos nutricionais do cafeeiro com grande potencialidade para a identificação de componentes de interesse biotecnológico, inclusive auxiliando na formação de uma linha de pesquisa pouco desenvolvida no Brasil, a interação entre Biologia Molecular, Biotecnologia e Nutrição Mineral.

### 3 REFERÊNCIAS

- ADAM Z, A. A.; NAKABAYASHI K, NAKABAYASHI, K.; OSTERSETZER, O.; HAUSSUHL, K.; MANUELL, A.; ZHENG, B.; VALLON, O.; RODERMEL, S. R.; SHINOZAKI, K.; CLARKE, A. K. Chloroplast and mitochondrial proteases in Arabidopsis. A proposed nomenclature. **Plant Physiology**, v. 125, p. 1912–1918, 2001.
- ALBORESI, A.; GESTIN, C.; LEYDECKER, M. T.; BEDU, M.; MEYER, C.; TRUONG, H. N. Nitrate, a signal relieving seed dormancy in Arabidopsis. **Plant Cell and Environment**, v. 28, p. 500–512, 2005.
- ALMAGRO, S.; LIN, S. H.; TSAY, Y. F. Characterization of the *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.6 reveals a role of nitrate in early embryo development. **The Plant Cell**, v. 20, p. 3289–3299, 2008.
- ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; QUIROS, O.; WILCHES, A.; LASHERMES, P.; BERTHAUD, J.; CHARRIER, A. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. **Euphytica**, v. 118, p. 53–65, 2001.
- ANTHONY, F.; COMBES, M. C.; ASTORGA, C.; BERTRAND, B.; GRAZIOSI, G.; LASHERMES, P. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 894–900, 2002.
- ANTHONY, F.; DUSSERT, S.; DULLOO, E. Coffee genetic resources. Topical reviews in agricultural biodiversity, p.15, 2007.
- ARAKI, R.; HASEGAWA, H. Expression of Rice (*Oryza sativa* L.). Genes Involved in High-Affinity Nitrate Transport during the Period of Nitrate Induction. **Breeding Science**, v. 56, p. 295–302, 2006.
- BARBOSA, J. G.; BARBOSA, M. S.; MUNIZ, M. A.; GROSSI, A. S. Mineral nutrition and fertilization of ornamental plants. **Informe Agropecuário**, v. 30, p. 16–21, 2009.
- BATAGLIA, O. C. Transporte e redistribuição de nutrientes via xilema e floema e sua regulação. In: FURLANI, A. M. C.; MEDINA, C. L.; FURLANI, P. R. Curso de atualização em nutrição mineral de plantas perenes. Resumos. Campinas: Instituto Agrônomo, p.14–18, 2001.
- BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, p. 365–372, 2000.
- CAMAÑES, G.; CERESO, M.; PRIMO-MILLO, E.; GOJON, A.; GARCÍA-AGUSTÍN, P. Ammonium transport and CitAMT1 expression are regulated by light and sucrose in Citrus plants. **Journal Experimental Botany**, v. 58, p. 2811–2825, 2007.
- CAMARGOS, S. L. Teores, acúmulo e redistribuição de macronutrientes em castanheira-do-Brasil. **Tese de doutorado** em Ciências. Centro de Energia Nuclear da Agricultura. UFMT, 2005.

- CARNEIRO, I. F. Adequação de técnicas de cultura *in vitro* para obtenção de mudas de bananeira (*Musa* sp.) cultivar Maçã. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, Goiás. 106 p, 1997.
- CASTRO, A. C. R. Deficiência de macronutrientes em helicônia 'Golden Torch'. Programa de Pós-Graduação em Botânica. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2007.
- CHAGAS, E.; ARAÚJO, A. P.; TEIXEIRA, M. G.; GUERRA, J. M. G. Decomposição e liberação do nitrogênio, fósforo e potássio de resíduos da cultura do feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 723–729, 2007.
- CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R. First *Coffea arabica* karyogram showing that this species is a true allotetraploid. **Plant Systematics and Evolution**, v. 274, p. 237–241, 2008.
- CORUZZI, G. M. Primary N-assimilation into amino acids in Arabidopsis. In: SOMERVILLE, C.R.; MEYERAWITZ, E.M. The Arabidopsis book. Rockville: **American Society of Plant Biologists**, p.1–17, 2003.
- CORUZZI, G.; BUSH, D, R. Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants. **Plant Physiology**, v. 125, p. 61–64, 2001.
- CRANE, E.; WALKER, P. The Impact of Pest Management on Bees and Pollination. Tropical Development and Research Institute, College House, Wrights Lane, London, UK, 1983.
- DANIEL-VEDELE, F.; CHAILLOU, S. Nitrogen. In Plant Nutritional Genomics (Broadley, M.R. and White, P.J., eds), Blackwell, v. 76, p. 1–25, 2005.
- DAVIS, A. P.; TOSH, J.; RUCH, N.; FAY FLS, M. F. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 167, 357–377, 2011.
- De MICHELE, R.; LOQUÉ, D.; LALONDE, S.; FROMMER, W. B. Ammonium and urea transporter inventory of the *Selaginella* and *Physcomitrella* genomes. **Front Plant Science**, v. 3, p. 62, 2012.
- DIOLA, V.; BRITO, G. G.; CAIXETA, E. T.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; SAKIYAMA, N. S.; LOUREIRO, M. E. High-density genetic mapping for coffee leaf rust resistance. **Tree Genetics and Genomes**, v. 7, p. 1199–1208, 2011.
- DOS SANTOS, T.; BUDZINSKI, I. G. F.; MARUR, C. J.; PETKOWICZ, C. L. O.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. 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, p. 441–448, 2011.
- EIRA, M. T. S.; DA SILVA, E. A. A.; DE CASTRO, R. D.; DUSSERT. S.; WALTERS, C. J.; BEWLEY, D.; HILHORST, H. W. M. Coffee seed physiology. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p.149–163, 2006.

ELBERRY, H.M.; MAJUMDAR, M.L.; CUNINGHAM, T. S.; SUMRADA, R.A.; COOPER, T.G. Regulation of the urea active transporter gene (DUR3) in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 4688–4698, 1993.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Londrina: Editora Planta, 403, p. 2006.

FAN, S. C.; LIN, C. S.; HSU, P. K.; LIN, S. H.; TSAY, Y. F. The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.7, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate. **The Plant Cell**, v. 21, p. 2750–2761, 2009.

FAQUIN, V. **Diagnose do estado nutricional das plantas** / Valdemar Faquin. Lavras: UFLA/FAEPE - Curso de Pós-Graduação “Lato Sensu” (Especialização) a Distância: Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas no Agronegócio, 2002.

FAQUIN, V. **Nutrição Mineral de Plantas**. Lavras: UFLA – FAEPE, 183 p. 2005.

FERNANDES, M. S. **Nutrição Mineral de Plantas**. 1. ed. Viçosa: UFV, 432 p. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 2006.

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 @gronegócio on line** - v. 8, n. 1 – Jan/Mar – 2012.

FERREIRA, M. M. M. Sintomas de deficiência de macro e micronutrientes de plantas de milho híbrido BRS 1010. **Revista Agro@ambiente** on-line, v. 6, p. 74–83, 2012.

FREE, J.B. **Insect Pollination of Crops**. **Academic Press**, London, 1993.

FREITAS, R. B. et al. Adubação do cafeeiro com nitrato de potássio via solo e folha, no outono inverno e primavera-verão: efeitos na atividade da redutase do nitrato, no crescimento das plantas e na produção. **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, v. 31, p. 945–952, 2007.

FURTINI NETO, A. E.; VALE, F. R.; RESENDE, A. V.; GUILHERME, L. R. G.; GUEDES, G. A. A. **Fertilidade do solo**. Lavras: UFLA/FAEPE, p. 252, 2001.

GLASS, A. D. M. Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraints upon nitrogen absorption. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, p. 453–470, 2003.

GUERREIRO-FILHO, O.; MEDINA-FILHO, H. P.; CARVALHO, A. Método para seleção precoce de cafeeiros resistentes ao bicho-mineiro *Perileucoptera coffeella*. **Turrialba**, v. 42, p.348–358, 1992.

GUO, F. Q.; WANG, R.; CHEN, M.; CRAWFORD, N. M. The *Arabidopsis* dual-affinity nitrate transporter gene *AtNRT1.1* (*CHL1*) is activated and functions in nascent organ development during vegetative and reproductive growth. **Plant Cell**. v. 13, p. 1761–1777, 2001.

GUO, F. Q.; YOUNG, J.; CRAWFORD, N. M. The nitrate transporter AtNRT1.1 (CHL1) functions in stomatal opening and contributes to drought susceptibility in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 15, p.107–117, 2003.

HIREL, B.; LEA, P. J. The biochemistry, molecular biology and genetic manipulation of primary ammonia assimilation. In Foyer, C.H.; Noctor, G. eds, *Photosynthetic Nitrogen Assimilation and Associated Carbon and Respiratory Metabolism*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, **The Netherlands**, p. 151–172, 2002.

HIROSE, N.; TAKEI, K.; KUROHA, T.; KAMADA-NOBUSADA, T.; HAYASHI, H.; SAKAKIBARA. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 75-83, 2008.

HO, C. H.; LIN, S. H.; HU, H. C.; TSAY, Y. F. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. **Cell**, v. 138, p. 1184–1194, 2009.

HORN, D.; ERNANI, P. R.; SANGOI, L.; SCHWEITZER, C.; CASSOL, P. C. Parâmetros cinéticos e morfológicos da absorção de nutrientes em cultivares de milho com variabilidade genética contrastante. **Revista Brasileira Ciências do Solo**, v. 30, p. 77–85, 2006.

ISHIYAMA, K.; INOUE, E.; WATANABE-TAKAHASHI, A.; OBARA, M.; YAMAYA, T.; TAKAHASHI, H. Kinetic properties and ammonium-dependent regulation of cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p.16598–16605, 2004.

JOHNSON, P. T.; CHASE, J. M.; DOSCH, K. L.; HARTSON, R. B.; GROSS, J. A.; LARSON, D. J.; SUTHERLAND, D. R.; CARPENTER, S. R. Aquatic eutrophication promotes pathogenic infection in amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 15781–15786, 2007.

KLEBL, F.; WOLF, M.; SAL, N. A defect in the yeast plasma membrane urea transporter Dur3p is complemented by CpNIP1, a Nod26-like protein from zucchini (*Cucurbita pepo* L.) and by *Arabidopsis thaliana* d-TIP or c-TIP. **FEBS Letters**, v. 547, p. 69–74, 2003.

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

KROUK, G.; LACOMBE, B.; BIELACH, A.; PERRINE-WALKER, F.; MALINSKA, K.; MOUNIER, E.; HOYEROVA, K.; TILLARD, P.; LEON, S.; LJUNG, K.; ZAZIMALOVA, E.; BENKOVA, E.; NACRY, P.; GOJON, A. Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. **Developmental Cell**, v. 18, p. 927–937, 2010.

LASHERMES, P.; COMBES, M. C.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; D'HONT, A.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular General Genetics**, v. 261, p. 259–266, 1999.

LASHERMES, P.; COMBES, M.; TROUSLOT, P.; CHARRIER, A. Phylogenetic relationships of coffee-tree species (*Coffea* L.) as inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. **Theoretical Applied Genetics**, v. 94, p. 947–955, 1997.

LEA, P. J. Nitrogen metabolism. In: LEA, P.J.; LEEGOOD, R.C. **Plant biochemistry and molecular biology**. Chichester: John Wiley and Sons. Chapter 7, p.155–180, 1993.

LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Nitrogen use efficiency. Uptake of nitrogen from the soil. **Annals of Applied Biology**, v. 149, p. 243–247, 2006.

LEROY, T.; RIBEYRE, F.; BERTRAND, B.; CHARMETANT, P.; DUFOUR, M.; MONTAGNON, C.; MARRACCINI, P.; POT, D. Genetics of coffee quality. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 229–242, 2006.

LI, J.-Y.; FU, Y.-L.; PIKE, S. M.; BAO, J.; TIAN, W.; ZHANG, Y.; CHEN, C.-Z.; ZHANG, Y.; LI, H.-M. HUANG, J.; LI, L.-G.; SCHROEDER, J. I.; GASSMANN, W.; GONG, J.-M. The arabidopsis nitrate transporter NRT1.8 functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance. **The Plant Cell**, v. 22, p. 1633–1646, 2010.

LI, W.; WANG, Y.; OKAMOTO, M.; CRAWFORD, N. M.; SIDDIQI, Y.; GLASS, A. D. M. Dissection of the AtNRT2.1:AtNRT2.2 inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. **Plant Physiology**, v. 143, p. 425–433, 2007.

LIN, C.; MUELLER, L.A.; MCCARTHY, J.; CROUZILLAT, D.; PÉTIARD, V.; TANKSLEY, S.D. Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, p. 114–130, 2005.

LIN, S. H.; KUO, H. F.; CANIVENC, G.; LIN, C. S.; LEPETIT, M.; HSU, P. K.; TILLARD, P.; LIN, H. L.; WANG, Y. Y.; TSAI, C. B.; GOJON, A.; TSAY, Y. F. Mutation of the *Arabidopsis* NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. **The Plant Cell**, v. 20, p. 2514–2528, 2008.

LIU, J.; HAN, L.; CHEN, F.; BAO, J.; ZHANG, F.; MI, G. Microarray analysis reveals early responsive genes possibly involved in localized nitrate stimulation of lateral root development in maize (*Zea mays* L.). **Plant Science**, v. 175, p. 272–282, 2008.

LIU, K. H.; TSAY, Y. F. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. **Embo Journal**, v. 22, p. 1005–1013, 2003.

LIU, L. H.; LUDEWIG, U.; GASSERT, B.; FROMMER, W. B.; VON WIRÉN, N. Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 133, p. 1220–1228, 2003.

LOQUÉ, D.; von WIREN, N. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. **Journal Experimental Botany**, v. 55, p. 1293–1305, 2004.

LOQUÉ, D.; YUAN, L.; KOJIMA, S.; GOJON, A.; WIRTH, J.; GAZZARRINI, S.; et al. Additive contribution of AMT1;1 and AMT1;3 to high-affinity ammonium uptake

across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots. **Plant Journal**, v. 48, p. 522–534, 2006.

KYA, C. L.; LOUARN, J.; DUSSERTA, S.; GUYOTC, B.; HAMONA, S.; NOIROT, M. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chemistry* 75 223–230, 2001.

KUMAR, S., KANWAR, J. K SHARMA, D. R. In vitro propagation of *Lilium*. **Advances in Horticultural Science**, v. 20, p. 181–188, 2006.

LUDEWIG, U.; von WIRÉN, N.; FROMMER, W. B. Uniport of  $\text{NH}_4^+$  by the root hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT1;1. **Journal Biology Chemistry**, v. 277, p. 13548–13555, 2002.

LUDEWIG, U.; WILKEN, S.; WU, B.; JOST, W.; OBRDLIK, P.; EL BAKKOURY, M.; MARINI, A. M.; ANDRE, B.; HAMACHER, T.; BOLES, E. Homo and heterooligomerization of ammonium transporter-1  $\text{NH}_4^+$  uniporters. **Journal Biology Chemistry**, v. 278, p. 45603–45610, 2003.

MAATHUIS, F. J. M. Physiological functions of mineral macronutrients. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, p. 250–258, 2009.

MAE, T.; MAKINO, A.; OHIRA, K. Changes in the amounts of ribulose biphosphate carboxylase synthesized and degraded during the life span of rice leaf (*Oryza sativa* L.). **Plant and Cell Physiology**, v. 24, p. 1079–1086, 1983.

MALAVOLTA, E. **Manual de Nutrição Mineral de Plantas**. 1 ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 638 p. 2006.

MALAVOLTA, E. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Informações Agronômicas, v. 111, 2005.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas e aplicação**. 2 ed, Piracicaba: Potafos, 1997.

MALUF, M. P.; SILVESTRINI, M.; RUGGIERO, L. M. C.; GUERREIRO-FILHO, O.; COLOMBO, C. A. Genetic diversity of cultivated *Coffea arabica* inbred lines assessed by RAPD, AFLP and SSR markers system. **Scientia Agricola**, v. 62, p. 366–373, 2005.

MARRACCINI, P.; DaMATTA, F. M.; VIEIRA, L. G. E.; VINECKY, F.; ELBELT, S.; VIEIRA, N. G.; CARNEIRO, F. A.; SILVA, V. A.; ANDRADE, A. C.; ALEKCEVETCH, J. C.; POT, D.; DA SILVA, F. R.; RAMOS, H. J. O.; SUJII, P. S.; ALVES, G. S. C.; FERRAO, M. A. G.; LEROY, T. Differentially expressed genes and proteins upon drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p.103, 2012.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2.ed. Academic Press, p. 889, 1995.

MARTINEZ, H. E. P.; ZABINI, A. V.; FRANCO, I. A. L.; NOVAIS, R. F. **Translocação e compartimentalização de Zn em função de doses aplicadas em feijoeiro e cafeeiro via radicular**. *Ciencia Rural*, v. **35**, 2005.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; DANIEL-VEDELE, F.; DECHORGNAT, J.; CHARDON, F.; GAUFICHON, L.; SUZUKI, A. **Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture**. *Annals of Botany*, v. **105**, p. 1141–57, 2010.

MATIELLO, J. B.; SANTINATO, R.; GARCIA, A. W. R.; ALMEIDA, S. R.; FERNANDES, D. R. **Cultura do café no Brasil. Manual de Recomendações**. Ed. MAPA/ PROCAFÉ, Varginha, MAPA/Fundação Procafé, Varginha, 2005.

MAURIN, O.; DAVIS, P. A.; CHESTER, M.; MVUNG, E. F.; JAUFEEERALLY-FAKIM, Y.; FAY, M. F. Towards a phylogeny for Coffea (Rubiaceae): Identifying well-supported lineages based on nuclear and plastid DNA sequences. *Annals of Botany*, v. 1, p. 12–19, 2007.

MELO, J. L. S.; LIMA, A. M.; MELO, H. N. S.; ANDRADE NETO, C. O.; LUCAS FILHO, M. **Avaliação da remoção dos macronutrientes sódio, potássio, cálcio e magnésio em disposição controlada em solo**. XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. Anais. Rio de Janeiro, v. 1, p. 6, 2000.

MENDES, A. N. G.; GUIMARAES, R. J.; SOUZA, C. A. S. **Classificação botânica origem e distribuição geográfica do cafeeiro**. In: Guimarães, R.J. *et al.* (Ed). *Cafeicultura*. p.39–99, 2002.

MENGEL, K.; KIRKBY, E. Principles of plant nutrition. 5.ed. Dordrecht/Boston/London: **Kluwer Academic Publishers**, p. 849, 2001.

MEYER, C.; STITT, M. Nitrate reduction and signalling. In: Lea PJ, Morot-Gaudry JF, eds. *Plant nitrogen*. Berlin: **Springer-Verlag**, p. 61–78, 2001.

MIFLIN, B. J.; HABASH, D. Z. 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*, v. 53, p. 979–987, 2002.

MILLER, A. J.; CRAMER, M. D. Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant and Soil*, v. 274, p. 1–36, 2004.

MILLER, A. J.; FAN, X.; ORSEL, M.; STITH, S. J.; WELLS, D. M. Nitrate transport and signalling. *Journal of Experimental Botany*, v. 58, p. 2297– 2306, 2007.

MIOTTO, A.; KAMINSKI, J.; RHEINHEIMER, D. S.; GATIBONI, L. C.; RUNETTO, G.; KLEIN, M. A.; CELLA, C. Suprimento de cálcio, magnésio e potássio às raízes de soja cultivada em solo com saturações de magnésio na CTC. **FertBio**, 2008.

MONDEGO, J. M. C.; VIDAL, R. O.; CARAZZOLLE, M. F.; TOKUDA, E. K.; PARIZZI, L. P.; COSTA, G. G. L.; PEREIRA, L. F. P.; ANDRADE, A. C.; COLOMBO, C. A.; VIEIRA, L. G. E.; PEREIRA, G. A. G. Brazilian Coffee Genome Project Consortium. An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression

features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. **BMC Plant Biology**, v. 11, p. 30, 2011.

MUÑOS, S.; CAZETTES, C.; FIZAMES, C.; GAYMARD, F.; TILLARD, P.; LEPETIT, M.; LEJAY, L.; GOJON, A. Transcript profiling in the chl1-5 mutant of *Arabidopsis* reveals a role of the nitrate transporter NRT1.1 in the regulation of another nitrate transporter, NRT2.1. **Plant Cell**, v. 16, p. 2433–2447, 2004.

NAIFF, A. P. M. Crescimento, Composição Mineral e Sintomas Visuais de Deficiências de Macronutrientes em Plantas de *Alpinia Purpurata* Cv. Jungle King. **Tese de Mestrado**. Universidade Federal Rural Da Amazônia. Belém, p.77, 2007.

NAKASATHIEN, S.; ISRAEL, W.; WILSON, F.; KWANYUEN, P. Regulation of seed protein concentration in soybean by supra-optimal nitrogen supply. **Crop Science**, v. 40, p. 1277–1284, 2000.

NINNEMANN, O.; JAUNIAUX, J. C.; FROMMER, W.B. Identification of a high affinity  $\text{NH}_4^+$  transporter from plants. **EMBO Journal**, v. 13, p. 3464–3471, 1994.

OKAMOTO, M.; OKADA, K. Differential responses of growth and nitrogen uptake to organic nitrogen in four gramineous crops. **Journal Experimental Botany**, v. 55, p. 1577–1585, 2004.

PENG, M. S.; BI, Y. M.; ZHU, T.; ROTHSTEIN, S. J. Genome-wide analysis of *Arabidopsis* responsive transcriptome to nitrogen limitation and its regulation by the ubiquitin ligase gene *NLA*. **Plant Molecular Biology**, v. 65, p. 775–797, 2007.

PEOPLES, M. B.; FRENEY, J. R.; MOSIER, A. R. Minimizing gaseous losses of nitrogen. In Bacon PE, ed, Nitrogen Fertilizer in the Environment. Marcel Dekker, Inc., New York, p. 565–606, 1995.

PEZZOPANE, J. R. M.; PEDRO JÚNIOR, M. J.; THOMAZIELLO, R. A.; CAMARGO, M. B. P. Escala para avaliação de estádios fenológicos do cafeeiro arábica. **Bragantia**, v. 62, p. 499–505, 2003.

PLETT, D.; TOUBIA, J.; GARNETT, T.; TESTER, M.; KAISER, B.; BAUMANN, . Dichotomy in the NRT gene families of dicots and grass species. **Plos One**, v. 5, 2010.

PRADO, R. M. Café. 2004. Disponível em: <http://www.nutricaoodeplantas.agr.br/site/culturas/cafe/introducao.php>. Acesso em: 20 jul. 2008.

PRINSI, B.; NEGRI, A. S.; PESARESI, P.; COCUCCHI, M.; ESPEN, L. Evaluation of protein pattern changes in roots and leaves of *Zea mays* plants in response to nitrate availability by two-dimensional gel electrophoresis analysis. **BMC Plant Biology**, v. 9, p. 113, 2009.

PURSEGLOVE, J. W. Tropical Crops. Dicotyledons I and II. Longmans, London, UK, 1968.

REMANS, T.; NACRY, P.; PERVENT, M.; FILLEUR, S.; DIATLOFF, E.; MOUNIER, E.; TILLARD, P.; FORDE, B. G.; GOJON, A. The Arabidopsis NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. **PNAS**, v. 103, p. 19206–19211, 2006.

RICCI, M. S. F.; ALVES, B. J. R.; MIRANDA, S. C. M.; OLIVEIRA, F. F. Growth rate and nutritional status of an organic coffee cropping system. **Scientia Agricola**, v. 62, p. 138–144, 2005.

SANDERS, A.; COLLIER, R.; TRETHERY, A.; GOULD, G.; SIEKER, R.; TEGEDER, M. AAP1 regulates import of amino acids into developing Arabidopsis embryos. **The Plant Journal**, v. 59, p. 540–552, 2009.

SANDIM, A.; VIAN, J. D.; SILVA, A. R. B.; CAMILI, E. C.; SILVA, P. R. A.; MONGELO, A. I. Avaliação de altura de plantas e número de gemas por metro da cultivar RB 83-5486 d cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) em diferentes fontes fosforadas na adubação de base em Campo Grande – MS. **FertBio: Desafios para o uso do solo com eficiência e qualidade ambiental**, 2008.

SANTI, S.; LOCCI, G.; MONTE, R.; PINTON, R.; AND VARANINI, Z. Induction of nitrate uptake in maize roots: expression of a putative high-affinity nitrate transporter and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase isoforms. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 1851–1864, 2003.

SCHUMACHER, M. V.; CECONI, D. E.; SANTANA, C. A. Influência de diferentes doses de fósforo no crescimento de plantas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert). **Boletim de Pesquisa Florestal**, v. 47, p. 99–114, 2003.

SENGIK, E. S. Os macronutrientes e os micronutrientes das plantas. Disponível em: <<http://www.dzo.uem.br/disciplinas/Solos/nutrientes.doc>>. 2005.

SEGONZAC, C.; BOYER, J. C.; IPOTESI, E.; SZPONARSKI, W.; TILLARD, P.; TOURAINE, B.; SOMMERER, N.; ROSSIGNOL, M.; GIBRAT, R. Nitrate efflux at the root plasma membrane: identification of an Arabidopsis excretion transporter. **Plant Cell**, v. 19, p. 3760–3777, 2007.

SILVA, A. M.; LIMA, E. P.; COELHO, G.; COELHO, M. R.; COELHO, G. S. Produtividade, rendimento de grãos e comportamento hídrico foliar em função da época de irrigação do parcelamento e do método de adubação do cafeeiro catuai. **Engenharia Agrícola**, v. 23, p. 434–440, 2003.

SIMON-ROSIN, U.; WOOD, C.; UDVARDI, M.K. Molecular and cellular characterisation of LjAMT2;1, an ammonium transporter from the model legume *Lotus japonicus*. **Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 99–108. 2003.

SOHLENKAMP, C.; WOOD, C. C.; ROEB, G. W.; UDVARDI, M. K. Characterization of Arabidopsis AtAMT2, a high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1788–1796, 2002.

SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Nitrogen-acquisition by plants in a sustainable environment. In: SINGH, R.P.; JAIWAL P.K. (Org.). Biotechnological approaches to

improve nitrogen use efficiency in plants. 1 ed. India: Studium Press, LLC, Houston, Texas, USA, v. 1, p. 41–62, 2006a.

SOTO, G.; ALLEVA, K.; MAZZELLA, M.A.; AMODEO, G.; MUSCHIETTI, J.P. *AtTIP1;3* and *AtTIP5;1*, the only highly expressed *Arabidopsis* pollen-specific aquaporins, transport water and urea. **FEBS Letters**, v. 582, p. 4077–4082, 2008.

SUENAGA, A.; MORIYA, K.; SONODA, Y.; IKEDA, A.; von WIRÉN, N.; HAYAKAWA, T.; YAMAGUCHI, J.; YAMAYA, T. Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter OsAMT2 in rice plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 44, p. 206–211, 2003.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; KINDRED, D.R. Analysing nitrogen responses of cereals to prioritize routes to the improvement of nitrogen use efficiency. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 1939–1951, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, p.449–484. 2009.

TCHERKEZ, G.; HODGES, M. How stable isotopes may help to elucidate primary nitrogen metabolism and its interaction with (photo) respiration in C-3 leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 1685–1693, 2008.

TILMAN, D.; REICH, P. B.; KNOPS, J.; WEDIN, D.; MIELKE, T.; LEHMAN, C. Diversity and productivity in a long-term grassland experiment. **Science**, v. 294, p. 843–845, 2001.

TODD, C. D.; POLACCO, J. C. Soybean cultivars ‘Williams 829 and ‘Maple Arrow’ produce both urea and ammonia during ureide degradation. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 867–877, 2004.

TORRES, J. L. R.; PEREIRA, M. G. Dinâmica do potássio nos resíduos vegetais de plantas de cobertura no cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1609–1618, 2008.

TSAY, Y. F.; CHIU, C. C.; TSAI, C. B.; HO, C. H.; HSU, P. K. Nitrate transporters and peptide transporters. **FEBS Letters**, v. 58, p. 2290–2300, 2007.

UNNO, H.; UCHIDA, T.; SUGAWARA, H.; KURISU, G.; SUGIYAMA, T.; YAMAYA, T.; SAKAKIBARA, H.; HASE, T.; KUSUNOKI, M. Atomic Structure of Plant Glutamine synthetase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 29287–29296, 2006.

VALARANI, V. Demanda de macronutrientes pelas folhas e frutos em cultivares de café arábica de porte baixo. **Tese de Mestrado**, IAC, Campinas: 78p. 2005.

van RAIJ, B.; QUAGGIO, J. A.; CANTARELLA, H. et al. **Interpretação de resultados de análise de solo**. In: van RAIJ, B.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. et al. (Eds.) *Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo*. Campinas: Instituto Agrônômico, p. 8–13, 1996.

van RAIJ, B. A Fertilização do cafeeiro no Brasil e o desenvolvimento sustentável. **Boas Práticas Agrícolas na Produção de Café**, p. 61–79, 2007.

VIDAL & GUTIÉRREZ. A systems view of nitrogen nutrient and metabolite responses in Arabidopsis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 521–529, 2008.

VIDAL, R. O.; MONDEGO, J. M. C.; POT, D.; AMBROSIO, A. B.; ANDRADE, A. C.; PEREIRA, L. F. P.; COLOMBO, C. A.; VIEIRA, L. G. E.; CARAZZOLLE, M. F.; PEREIRA, G. A. G. 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, p.1053–1066, 2010.

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

WANG, L. G.; QIU, J. J.; TANG, H. J.; HU, L.; LI, C.S.; ERIC, V. R. Modeling soil organic carbon dynamics in the major agricultural regions of China. **Geoderma**, v. 147, p. 47–55, 2008.

WANG, R.; TISCHNER R.; GUTIERREZ. R. A.; HOFFMAN, M.; XING, X.; CHEN, M.; CORUZZI, G.; CRAWFORD, N. M. Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.136, p. 2512–2522, 2004.

WANG, S.; ORABI, E. A.; BADAY, S.; BERNECHE, S.; LAMOUREUX, G. Ammonium transporters achieve charge transfer by fragmenting their substrate. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, p. 10419–10427, 2012.

WARAICH, E. A.; AHMAD, R.; SAIFULLAH.; ASHRAF, M. Y.; EHSANULLAH. Role of mineral nutrition in alleviation of drought stress in plants. **Journal of Crop Science**, v. 5, p. 764–777, 2011.

WITTE, C. P. Urea metabolism in plants. **Plant Science**, v. 180, p. 431–438, 2011.

YUAN, L.; LOQUÉ, D.; KOJIMA, S.; RAUCH, S.; ISHIYAMA, K.; INOUE, E. et al. The organization of high-affinity ammonium uptake in Arabidopsis roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. **Plant Cell**, v.19, p. 2636–2652. 2007a.

YUAN, L.; LOQUE, D.; YE, F.; FROMMER, W. B.; von WIRÉN, N. Nitrogen-dependent post transcriptional regulation of the ammonium transporter *AtAMT1;1*. **Plant Physiology**, v. 143, p. 732–744, 2007b.

## 4 ARTIGO A:

### CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E TRANSCRICIONAL DE *CaDUR3*, UM TRANSPORTADOR DE URÉIA DO CAFEIEIRO EM DIFERENTES ESTRESSES ABIÓTICOS

#### 4.1 RESUMO

A uréia está difundida na natureza, caracterizando-se como fonte de nitrogênio importante e disponível para o crescimento e desenvolvimento de diversos organismos. Devido aos custos elevados de fertilizantes de N na produção de café, é importante identificar genes envolvidos na absorção e translocação N em plantas no cafeeiro, visando uma maior eficiência e utilização N. O objetivo deste trabalho foi a identificação e caracterização molecular do homólogo do gene *DUR3* em cafeeiro. Foi identificado no banco de dados do Projeto Brasileiro do Genoma Café (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>) uma única sequência de cDNA de *Coffea arabica* relacionada ao transportador *DUR3* (*CaDUR3*). Através das análises semi-quantitativa nos diferentes tecidos de *C. arabica* foi observado a presença de transcritos de *CaDUR3* nos tecidos de folha, botão floral, flor, raiz e ramo. Em diferentes condições de estresses abióticos (hídrico, calor e salino), o semi-quantitativo de *CaDUR3* mostrou um aumento progressivo dos níveis de transcrição durante estresses, sendo detectado níveis menores de transcritos no estresse salino em relação a outros estresses. Através da expressão relativa em folha com supressão de N, foi observado aumento significativo após 24 horas sem N e um aumento significativo após 72 horas, e o perfil transcricional de *CaDUR3* se manteve até o décimo dia sem N. Para a raiz os níveis de transcritos ao longo do tratamento foram reduzidos em relação ao dia 0. Neste trabalho uma biblioteca BAC foi utilizada para a seleção de clones candidatos para o gene *CaDUR3*, onde foi identificado 3 possíveis clones BAC positivos para o gene *CaDUR3*. Foi realizado Southern blot para determinar o número de cópias para o gene *CaDUR3* em *C. arábica* cv. IAPAR-59 e entre os parentais, *C. canephora* e *C. eugenioides*. O resultado desta análise resultou na identificação de uma única cópia de *CaDUR3* possivelmente devido *C. arabica* ser um alotetraplóide originado a partir de *C. canephora* e *C. eugenioides*, onde ambos contribuíram com um alelo. O café é uma das commodities agrícolas mais importantes do mundo, mas as respostas moleculares a fatores ambientais e supressão de N que podem afetar a sua produção ainda são pouco compreendidas. As informações obtidas neste trabalho propiciarão a identificação de novos promotores e genes com potencial biotecnológico voltado para respostas a fatores abióticos em plantas.

**Palavras-chave:** Café. Supressão de nitrogênio. Expressão gênica.

## 4.2 INTRODUÇÃO

A uréia [CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] é a principal forma de fertilizante nitrogenado utilizado na agricultura. A uréia é uma molécula pequena e neutra, que está largamente disseminada na natureza, servindo como uma fonte de nitrogênio disponível para o crescimento e desenvolvimento de diversos organismos, incluindo bactérias, fungos e plantas (WANG et al., 2008). As plantas podem absorver o N na forma de uréia por meio das raízes, mas absorvem, preferencialmente, o amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) produzido a partir da uréia pela ação da enzima urease (KRAJEWSKA, 2009) ou o nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000) produzido através da oxidação do NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

Em plantas, o transporte de nutrientes é facilitado por várias famílias de proteínas transportadoras localizadas na membrana celular, que são capazes de mediar a absorção de diversas formas orgânicas e inorgânicas de N do solo. Os estudos inerentes aos sistemas de transporte de uréia em plantas foram descritos recentemente, pois até então, devido ao seu baixo peso molecular, caráter neutro e alta solubilidade em água, acreditava-se que a uréia permeava a membrana celular por difusão.

O desenvolvimento de uma levedura mutante incapaz de absorver uréia devido a uma mutação no gene *ScDUR3*, permitiu a caracterização do primeiro sistema transportador de uréia caracterizado em eucariotos (ELBERRY et al., 1993). A utilização deste mutante em estudos de complementação funcional permitiu a identificação de diversas proteínas transmembrana de plantas que medeiam o transporte de uréia. A primeira evidência de transporte ativo *in planta* foi realizada por Liu et al. (2003) na planta-modelo *Arabidopsis thaliana*, que demonstraram que a absorção de uréia por células em suspensão era sensível à adição de um protonóforo (CCCP), eliminando, portanto, o co-transporte de uréia com prótons e indicando o transporte ativo.

Foram descritos e caracterizados dois mecanismos de transporte de uréia mediados por proteínas transmembrana: um de alta afinidade (*High Affinity Transporter – HAT*) e um de baixa afinidade (*Low Affinity Transporters – LATs*). O sistema LATs para absorção de uréia em plantas constitui-se do grupo de proteínas intrínsecas de membrana (*Major Intrinsic Proteins – MIPs*), também chamadas de aquaporinas, agrupadas nas subfamília PIP (*Plasma Membrane Intrinsic Protein*),

TIPs (*Tonoplast Membrane Intrinsic Protein*), NIPs (*NOD26-like proteins*). Estas proteínas são descritas como facilitadoras do movimento da uréia com concentração linear, já foram validadas funcionalmente em diferentes sistemas heterólogos, como leveduras e oócitos de salamandra (GERBEAU et al., 1999; LIU et al., 2003b; GASPAR et al., 2003; SOTO et al., 2008).

Já o sistema de transporte de alta afinidade de uréia foi primeiramente descrito em *A. thaliana*, representado pelo gene *AtDUR3* (LIU et al., 2003a; KOJIMA et al., 2007). *AtDUR3* é uma proteína que integra a membrana plasmática com 14 domínios transmembrana, localizada preferencialmente na membrana plasmática de células epidérmicas da raiz (LIU et al., 2003a). Ela tem alta afinidade por uréia ( $K_m = 4 \mu\text{M}$ ), atuando como transportador ativo de uréia acoplado a um fluxo de prótons, e representa o principal sistema de absorção de uréia da solução do solo (LIU et al., 2003; KOJIMA et al., 2007). A *AtDUR3* pertence à superfamília “*Sodium Solute Symporter*” (SSS) (WANG et al., 2008), que compreende mais de uma centena de membros em procariotos e eucariotos, sendo relacionados com transporte de açúcares, aminoácidos, nucleosídeos, inositol, vitaminas e ânions (REIZER et al., 1994; TURK & WRIGHT, 1997; SAIER, 2000). *DUR3* apresenta-se como um gene de cópia única em angiospermas que tiveram o seu genoma completo sequenciado e avaliado até o momento, e figura como uma pequena família gênica em briófitas e algas unicelulares (De MICHELE et al., 2012).

O ortólogo de *AtDUR3* em arroz, *OsDUR3*, apresenta essencialmente as mesmas características de transporte (WANG et al., 2011). Nos dois sistemas-modelo, *DUR3* teve seu nível transcricional induzidos pela supressão de nitrogênio, sugerindo que este sistema de transporte tem papel importante em situações de desenvolvimento nas quais o nitrogênio é limitante (De MICHELE et al., 2012).

A despeito da importância agrônômica da utilização de uréia, a caracterização molecular detalhada de *DUR3* restringe-se a plantas-modelo com genoma completamente sequenciado, como *A. thaliana* e arroz, e nada se conhece sobre os aspectos moleculares de transportadores de uréia em espécies perenes, como o cafeeiro. Diante deste contexto, o presente trabalho teve por objetivo a identificação e caracterização molecular do homólogo do gene *DUR3* em cafeeiro (*CaDUR3*).

## 4.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.3.1 Identificação *In Silico* de Sequências Expressas Relacionadas ao Gene *DUR3*

Foram realizadas buscas a partir de palavra-chave *urea transporter* dentro do banco de dados do projeto Brasileiro Genoma Café (VIEIRA et al., 2006; MONDEGO et al., 2011). O EST identificado nesta procura teve sua similaridade confirmada por BLAST (ALTSCHUL et al., 1997). O clone de cDNA deste EST foi obtido junto ao CENARGEN/EMBRAPA (Brasília-DF), para sequenciamento do cDNA completo. O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal (IAPAR) no sequenciador ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) que utiliza o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), a partir de dois iniciadores (*primers*) para a obtenção sequêcia do clone de cDNA CA00-XX-IA2-016-H07-ECF.

### 4.3.2 Análise Filogenética

As sequências de aminoácidos obtidas foram alinhadas por meio do programa MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). O alinhamento obtido foi utilizado para a geração de uma árvore filogenética no programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis 5 (MEGA5) (TAMURA et al., 2011) por meio da metodologia de Neighbor joining, e teste estatístico de “bootstrap” com 1000 réplicas.

### 4.3.3 Material Vegetal

A metodologia para obtenção do material vegetal analisado segue a de artigos recentemente publicados pelo grupo (BUDZINSKI et al., 2011; Dos SANTOS et al., 2011; CARVALHO et al., 2013).

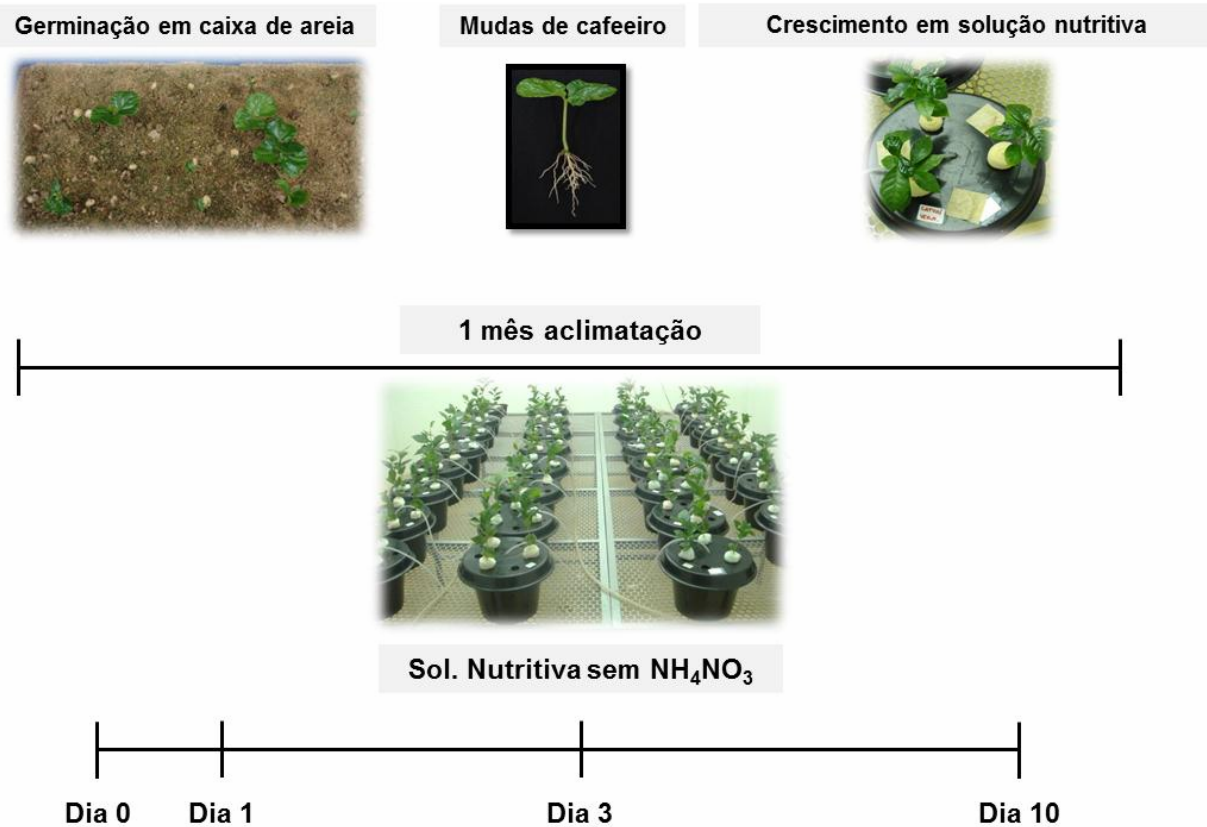
Folhas expandidas, botões florais, flores, ramos plagiotrópicos, raízes secundárias, endosperma e pericarpo de frutos maduros foram coletados de plantas mantidas em condições de campo na Estação Experimental do IAPAR, em Londrina, para análise transcricional de *CaDUR3*. Depois da coleta, todas as

amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a extração de RNA.

#### 4.3.4 Plantas crescidas sob supressão de N

Sementes de café da cultivar IAPAR-59 foram germinadas em caixas contendo areia esterilizada em casa de vegetação. Após quatro meses, as raízes foram lavadas cuidadosamente com água destilada para retirada da areia e as plantas foram então transferidas para vasos de 4 L com solução nutritiva e aeração constante. A solução nutritiva continha macro e micronutrientes com a seguinte composição (em  $\mu\text{M}$ ): 800  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 250  $\text{MgSO}_4$ , 200  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 500  $\text{CaCl}_2$ , 4000  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 100  $\text{NaFeEDTA}$ , 5  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 3  $\text{MnSO}_4$ , 2,5  $\text{ZnSO}_4$ , 0,1  $\text{CuSO}_4$ , 0,7  $\text{NaMoO}_4$ . Após um mês de crescimento em solução nutritiva, as plantas foram transferidas para meio sem N por 1, 3 e 10 dias, para verificação da dinâmica da modulação de *CaDUR3* (Figura 1).

**Figura 1** – Representação do experimento de supressão de N.



Para cada um dos pontos de avaliação, foram coletadas folhas e raízes laterais para extração de RNA total. Cada replicata biológica foi representada por *pools* de tecidos de ao menos nove plantas sob as mesmas condições. Os materiais vegetais coletados foram imersos imediatamente em N líquido e armazenada em freezer -80 °C até o momento da extração de RNA.

#### 4.3.5 Experimento de Estresse Hídrico

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). Foram utilizadas cinco plantas de *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 com a mesma idade e tamanho similar (um ano e oito meses e cerca de 70 centímetros de altura). Estas plantas foram mantidas em vasos com aproximadamente 25 kg de substrato (3 terra: 1 areia: 1 composto orgânico). Todos os vasos foram dispostos em posição semelhantes em relação à incidência da luz solar. As plantas foram submetidas à restrição hídrica e as coletas dos materiais para análise foram realizadas conforme as leituras do potencial hídrico, sendo subdividas em: sem estresse ( $\pm 1.36$  MPa), estresse moderado ( $\pm 2.35$  MPa), estresse severo ( $\pm 4.3$  MPa) e recuperado (material coletado 72 h após re-irrigação das plantas que atingiram o estresse severo). Para cada dia de análise foram feitas coletas de folhas (*pools* de dois pares de folhas dos cinco vasos sob as mesmas condições). As folhas coletadas foram imersas imediatamente em N líquido e armazenada em freezer -80°C até o momento de análise. O potencial de água na folha foi monitorado através de psicrômetros de termopar (modelo C-30, Wescor, Inc., Logan, Ut, U.S.A) acoplados a um datalogger (Campbell Scientific, Inc., Logan, Ut, U.S.A., modelo CR-7). A cada dia de leitura, entre 9h30min e 10h, uma amostra de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> da folha coletada da parte mediana de ramo plagiotrópico posicionado no meio da planta (folha totalmente madura e sem de sinais danos ou deficiências), de cada planta foi coletada e colocada nos psicrômetros. O datalogger foi programado para que as leituras fossem efetuadas a cada 10 min até o equilíbrio da pressão de vapor na câmara. A microvoltagem fornecida pelo sistema foi convertida em potencial da água (MPa) em função de prévia calibração dos sensores com soluções de cloreto de sódio. Após a obtenção do potencial total da água ( $\Psi_t$ ), os sensores foram imersos durante 4 min em

nitrogênio líquido e as leituras retomadas para obtenção do potencial osmótico ( $\Psi_s$ ). O cálculo do potencial de pressão foi realizado através de  $\Psi_t - \Psi_s$ .

#### 4.3.6 Experimento de Estresse Térmico

Esse experimento foi conduzido em câmara de crescimento no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). Foram utilizadas cinco plantas de *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 com a mesma idade e tamanho similar (um ano e dez meses e cerca de 70 cm de altura), sendo mantidas em vasos com aproximadamente 25 kg de substrato (3 terra: 1 areia: 1 composto orgânico). As plantas foram mantidas na câmara durante sete dias em uma temperatura de 24 °C e fotoperíodo controlado (12h:12h), para aclimação. Após esse período, a temperatura da câmara foi elevada para 37 °C durante cinco dias com manutenção de irrigação diária. Foram coletadas folhas em 3 situações: Dia 0 - folhas coletadas um dia antes do início do tratamento em plantas mantidas a 24 °C, Dia 3 e Dia 5 – folhas coletadas três e cinco dias após o início do tratamento térmico, respectivamente. As folhas foram coletadas no mesmo estágio de desenvolvimento (segundo par de folhas de cada ramo plagiotrópico) e imediatamente imersas em N líquido e mantidas em freezer – 80 °C. A cada coleta foi feito um *pool* de folhas (mistura de dois pares de folhas dos cinco vasos do experimento, sob as mesmas condições de estresse). Foram realizadas medições das trocas gasosas nas plantas utilizando o sistema portátil de fotossíntese, (Li6200-Licor, Licon, NE, EUA), com câmara de 1 litro, para a obtenção dos valores da taxa fotossintética após o início do estresse térmico.

#### 4.3.7 Experimento de Estresse Salino

O experimento de estresse salino também foi conduzido em casa de vegetação no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). Foram selecionadas vinte plantas de *C. arabica* cv. IAPAR-59, com idade aproximada de seis meses, todas cultivadas em vasos contendo 1,5 kg de substrato. Para evitar choque osmótico, as plantas foram irrigadas no primeiro dia com 50 mM de NaCl, e no segundo dia com 100 mM. A partir do terceiro dia até o final do experimento as plantas foram irrigadas diariamente com 150 mM de NaCl. Folhas de mesmo par foram coletadas de cada planta antes de iniciar o tratamento (controle sem adição de NaCl - dia 0) e 6, 12 e

25 dias após o início do tratamento com 150 mM de NaCl, e imediatamente submergidas em N líquido .

#### 4.3.8 Extração de RNA Total, Purificação e Síntese de cDNA

O RNA total de folha e raiz do tratamento sob supressão de N foi extraído conforme descrito por Chang et al (1993). As amostras de RNA foram purificadas utilizando o kit Pure Link Micro to Midi Total RNA Purification System (Invitrogen). Após a purificação foi verificado a integridade das amostras foram avaliadas por electroforese em gel de agarose 1% (p/v) com tampão TAE (2 M Tris – acetato, 0,05 M EDTA), contendo brometo de etídio ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e visualizados sob luz UV em transluminador. A concentração do RNA e a pureza foram determinadas usando NanoDrop® ND-100 espectrometria a 260 e 280 nm e as razões 260/280 e 260/230. Foram utilizadas as amostras que apresentaram razão acima de 1,8. A ausência de contaminação com DNA genômico foi confirmada por PCR utilizando o par de *primers CaEF1 $\alpha$* , descrito em Carvalho et al. (2013). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando o kit SuperScript III Transcriptase Reversa (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante, num volume final de 20  $\mu\text{l}$ , utilizando 5  $\mu\text{g}$  de RNA total. Para cada 1  $\mu\text{g}$  do RNA total extraído dos tecidos do cafeeiro foi misturado a 500 ng de Oligo (dT)12-18 e 1 mM de dNTPmix. A remoção do RNA original foi feita por meio de incubação dessa reação a 37 °C por 20 min com 2 unidades de RNase H (Invitrogen).

#### 4.3.9 Análise RT-PCR Semi-Quantitativo de *CaDUR3*

O perfil transcricional de *CaDUR3* em folhas sob estresses hídrico, salino e térmico foi avaliado por RT-PCR semi-quantitativo. As reações de amplificação PCR foram realizadas em volume final de 25  $\mu\text{l}$ , usando 2  $\mu\text{l}$  de cDNA, 1  $\mu\text{l}$  de cada iniciador a 10mM, 1,5  $\mu\text{l}$  de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 2,5  $\mu\text{l}$  de PCR Buffer 10x, 0,5  $\mu\text{l}$  de dNTP mix 10mM e 0,25  $\mu\text{l}$  de *Platinum Taq DNA Polymerase* (5 U/ $\mu\text{l}$ ). A amplificação foi conduzida em termociclador com o programa: 95 °C por 3 min uma vez, 95 °C por 20 segundos seguido de 60 °C por 30 segundos seguido de 72 °C por 45 segundos por 36 ciclos e a 72 °C por 10 min. A visualização dos amplicons foi feita em gel de agarose 2% (p/v) e tampão SB 1 X (NaOH 500 mM), com 1 hora de

corrida a 80V. Todas as reações foram feitas em triplicatas técnicas, incluindo uma amostra controle contendo água milli-Q.

#### 4.3.10 Análise qRT-PCR de *CaDUR3*

O nível transcricional do gene *CaDUR3* foi avaliado em situação de supressão de nitrogênio pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) utilizando *primers* específicos para o gene em estudo (Tabela 1). O gene *CaEF1 $\alpha$*  foi utilizado como normalizador, conforme recomendado por CARVALHO et al. (2013). Foi realizada diluições seriadas dos cDNAs de  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , e foi utilizada a diluição de  $10^{-1}$ , a qual apresentou maior estabilidade para os tecidos analisados. Cada reação continha 12.5  $\mu$ L 2x SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas), 0,5  $\mu$ L de cada primer (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ L de cDNA diluído 1:10 em água milli-Q, com um volume final de 25  $\mu$ L. As condições das reações foram de 10 min a 95 °C, seguido por quarenta ciclos de amplificação de 95 °C por 30 s e 60 °C por 60 s. Em todas as reações foi realizada curva de dissociação para verificar a presença de produtos inespecíficos. A eficiência de amplificação de todas as amostras foi avaliada pelo Programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003), sendo considerados apenas aquelas com eficiência entre 90% e 110%. Foram efetuadas três repetições técnicas para avaliação por ponto nas triplicatas biológicas. O calibrador utilizado para comparação do padrão de atividade transcricional entre os genes foi o Dia 0, tanto para folhas quanto para raízes. O cálculo de expressão relativa (RQ) foi feito analogamente ao realizado por Marraccini et al. (2012), mediante a aplicação da fórmula  $(1+E)^{-\Delta\Delta C_t}$ , onde  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{amostra}) - \Delta C_t(\text{calibrador})$  e E=eficiência de amplificação. O experimento de qRT-PCR seguiu o “*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*” (MIQE – BUSTIN et al., 2009).

**Tabela 1** – Descrição dos genes e sequências para análise de qPCR.

<b>Gene</b>	<b>Primer Foward</b>	<b>Primer Reverse</b>	<b>Acesso NCBI</b>	<b>EST</b>	<b>Ortólogos - Arabidopsis</b>
<i>CaDUR3</i>	GGCCTCTTCTCCCACAATTT	CCTCAAACAGCTGCTTCCAT	GW440609.1	CA00-XX-IA2-016-H07-EC.F	AT5G45380.1
<i>CaEF1<math>\alpha</math></i>	AAGGGAGCTTCCAGCTTTACC T	TGTGAGAGGTGTGGCAGTCA A	GT708303.1	CA00-XX-FB1-023-D02-UT.F	AT1G07940

#### 4.3.11 Teor de Uréia em Folha e raiz Sob Supressão de N

O material vegetal (folhas e raízes – IAPAR-59) foi congelado e homogeneizado em água milliQ autoclavada, centrifugado a 10.000 rpm, a 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi filtrado em lã de vidro, transferido para um novo tubo e mantido no gelo até o momento das análises. A mistura de reação foi formado por 750 µl de tampão fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0,1 M pH 7,5, 200 µl de extrato vegetal e 50 µl de solução de enzima urease 50 mM. A reação foi incubada em banho-maria a 37 °C por 40 min e quantificada segundo Weatherbun (1967), utilizando a uréia como padrão.

#### 4.3.12 Extração de DNA Genômico

Para extração do DNA genômico de folhas, foi utilizado o protocolo de Doyle e Doyle (1987), com modificações, das seguintes espécies: *Coffea canephora*, *C. eugenoides*, *C. arabica* cv. IAPAR-59 e *C. arabica* cv Hibrido Timor acesso CIFC 832/2. Foram utilizados cerca de 2 g de material macerado em nitrogênio líquido, adicionados 20 mL de tampão de extração [2% (p/v) CTAB, 2% (p/v) PVP, 100 mM de TRIS-HCL, 25 mM de EDTA, 20 mM de NaCl, e 2% metabissulfito de sódio]. O material foi incubado a 65 °C por 20 min e centrifugado a 7.500 rpm por 5 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de centrifugação sendo adicionado o mesmo volume de clorofórmio (1:1), seguido de homogenização e centrifugação a 7.500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, a fase superior foi transferida para novo tubo onde foi adicionado 0,6 X volume de isopropanol. Após precipitação *overnight*, a -20 °C, as amostras foram centrifugadas a 7.500 rpm por 30 min a 4 °C e o sobrenadante descartado. Em seguida o pellet foi ressuscendido em 1 mL de água milliQ autoclava e 200 µl de RNase (1 mg. mL<sup>-1</sup>) deixado a 37 °C por 1 h. Foi adicionado 100 µg de proteinase K e após a amostra permanecer 37 °C por 1 h foi adicionado 1 X volume de clorofórmio seguido de centrifugação a 7.500 rpm por 5 min em temperatura ambiente; este passo foi repetido mais uma vez. A fase superior foi transferida para novo tubo e precipitada com acetato de sódio (3 M) 10% e 2 X o volume de etanol 100% *overnight* a -20 °C. Após a precipitação as amostras foram

centrifugadas a 7.500 rpm por 30 min a 4 °C, o precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em água milli-Q autoclavada.

As amostras foram submetidas à eletrofose com tampão SB 1 X (NaOH 500 mM) em gel de agarose 1% (p/v) com brometo de etídio (0,5 µg.mL<sup>-1</sup>) e visualizadas sob luz UV em transluminador, para avaliação de qualidade. A quantificação do DNA foi feita por espectrofotometria, no aparelho NanoDrop® ND-100 (Thermo).

#### 4.3.13 Southern Blot

Para avaliação do número de cópias de *CaDUR3*, foi utilizada a técnica de Southern Blot. Amostras de DNA genômico (15 µg µl<sup>-1</sup>) dos genótipos relacionados acima, foram hidrolisadas com a enzima de restrição *DraI* por incubação a 37 °C por 16 h. Posteriormente, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,7% (p/v) em tampão SB1 X a 2 V/cm por 16 h. Após a eletroforese, o gel foi lavado com solução de depuração (0,25 M HCl) por 15 min, solução de desnaturação (NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M) 2 X por 30 min e solução de neutralização (Tris 0,5 M; NaCl 3 M) 2 vezes por 30 minutos. Foi feita a transferência do DNA à membrana de nylon XL Hybond (Amersham Biosciences) por capilaridade em solução tampão *overnight* SSC 10 X. Em seguida, a membrana foi submetida a 80 °C por duas horas para *crosslink*. A membrana foi pré-hibridizadas por 2 h com solução UltraHyb (Ambion) e hibridizadas com sonda marcada com α-dCTP<sup>32</sup> usando a técnica de oligonucleotídeos aleatórios (*random primer*), por 24 h a 37 °C. Após hibridização a membrana foi lavada 2 X durante 10 min com o tampão (SSC 2X; SDS 0,1%) e com tampão 2 X (SSC 1X; SDS 0,1%), selada em plástico e exposta em placa de imagem BAS-IP MS 2340. A imagem foi capturada utilizando aparelho fluorescent image analyzer FLA 3000 – series (Fuji Photo Film CO, Lts. Tokyo – Japan).

#### 4.3.14 Seleção de Clones BAC para o Gene *CaDUR3* por PCR e Membranas de Hibridização

Foi utilizada uma biblioteca BAC de *C. arabica* Híbrido de Timor acesso CIFC 832/2 (CAÇÃO et al., 2007) para a seleção de clones candidatos

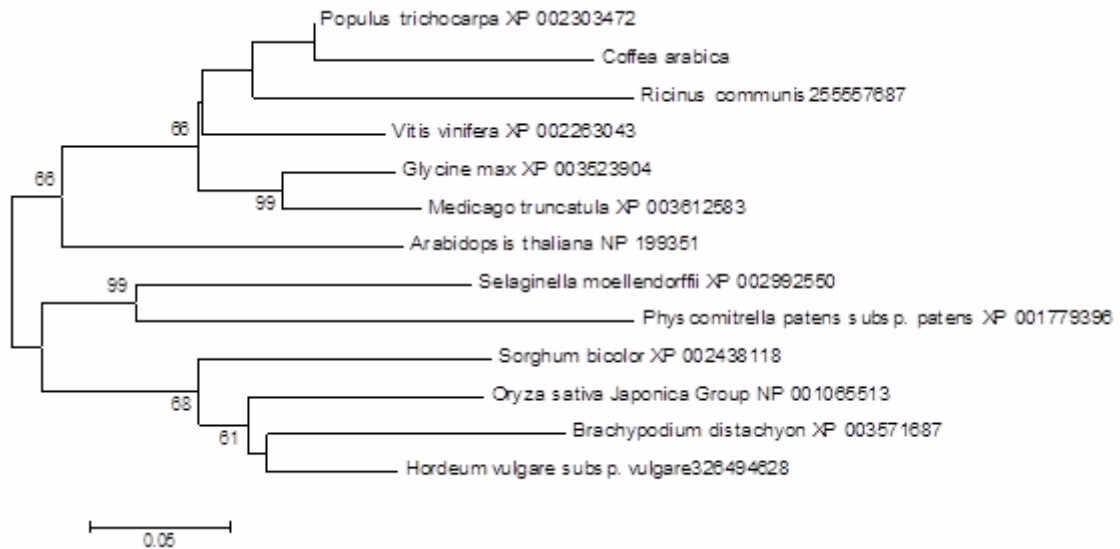
contendo o gene *CaDUR3*. Os superpools e pools de clones BAC passaram por uma triagem através da técnica de PCR. As amplificações foram realizadas utilizando 50 ng de DNA dos pools/ superpools. Para amplificação do gene *CaDUR3* foram utilizados os *primers* específicos: 5`-GGCCTCTTCTCCCACAATTT-3` e 3`-CCTCAAACAGCTGCTTCCAT-5`. A reação de PCR foi realizada nas mesmas condições descrito no item 4.3.9. Os conjuntos de placas selecionados para o gene *CaDUR3* foram utilizados para hibridação em filtro. As colônias foram inoculadas em membranas de nylon carregadas positivamente, em placas de Petri contendo meio LB (Luria-Bertani broth) e incubadas a 37 °C durante 16 h. Os clones cultivados em membranas foram submetidas ao processo de desnaturação e neutralização, seguido por tratamento com proteinase K e fixado na membrana a 80 °C durante três horas. As membranas foram hibridizadas com a sonda do gene *CaDUR3* conforme item 4.3.13.

#### 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.4.1 Análise *In Silico* de *CaDUR3*

A busca pelo transportador de uréia de café compreendeu uma análise *in silico* a partir da palavra-chave *urea transporter* dentro da plataforma cafEST (<https://alanine.cenargen.embrapa.br/cafEST>), onde foi encontrado somente o EST parcial CA00-XX-IA2-016-H07-EC.F. A análise com a ferramenta BlastX indica que o *read* pertence a subfamília de transportadores de uréia DUR3, relacionado com a superfamília de transportadores de solutos por simporte com sódio (SSS; KOJIMA et al., 2006). A Figura 2 demonstra que os genes do tipo *DUR3* formaram um agrupamento que respeita a divisão filogenética entre dicotiledôneas, monocotiledôneas e plantas basais. A sequência de *CaDUR3* agrupou-se com sequências de dicotiledôneas (Figura 2).

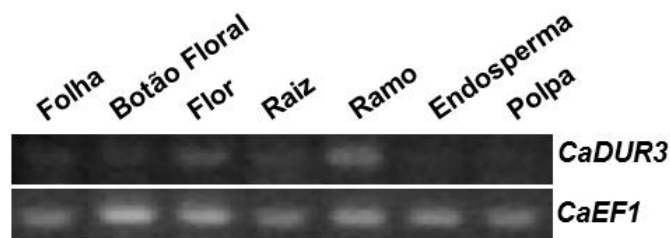
**Figura 2** – Árvore filogenética de transportadores de uréia utilizando o programa Evolutionary Genetics Analysis 5 MEGA5 (TAMURA et al., 2011). São indicados valores de *bootstrap* acima de 50%.



#### 4.4.2 Análise Transcricional de *CaDUR3* em Diferentes Tecidos

Para verificar o perfil transcricional de *CaDUR3*, foi realizado RT-PCR semi-quantitativo em folhas, botões florais, flores, raízes secundárias, ramos plagiotrópicos, endosperma e polpa de frutos de *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 cultivado em condição de campo (Figura 3).

**Figura 3** – RT-PCR semi-quantitativo do gene *CaDUR3* nos diferentes tecidos do cafeeiro: folha, botão floral, flor, raiz, ramo, endosperma e polpa. Foi utilizado o gene de referência *CaEF1 $\alpha$*  (CARVALHO et al., 2013) como controle do experimento.



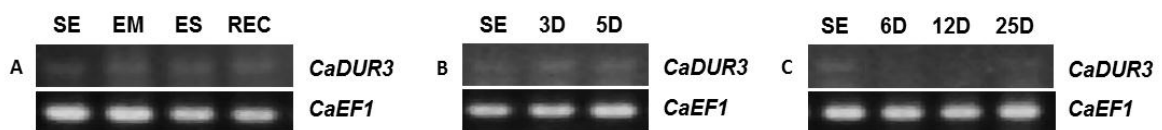
Foi observada a presença de transcritos de *CaDUR3* em folhas, botão floral, flores, raízes laterais e (Figura 3), indicando que *CaDUR3* é transcricionalmente ativo em diferentes tecidos de *C. arabica*. É possível desse

modo que ocorra transporte de uréia não apenas por absorção das raízes, mas também por remobilização de N em café.

#### 4.4.3 Análise Transcricional de *CaDUR3* em Estresse Hídrico, Salino e Térmico

Os estresses abióticos como seca, salinidade, temperaturas extremas, deficiências nutricionais e toxicidades minerais estão entre os principais fatores que afetam a produção de alimentos em todo o mundo e nos países tropicais (ROY et al., 2011). Diversos trabalhos têm mostrado os efeitos dos estresses abióticos sobre o metabolismo do nitrogênio (FLORES et al., 2000; CARILLO et al., 2005). A partir destas informações, buscou-se caracterizar o padrão transcricional do gene *CaDUR3* em diferentes níveis de estresses abióticos: déficit hídrico, altas temperaturas e salinidade. Foi possível observar o nível transcricional basal desse gene em condições normais de irrigação, com aumento em déficits hídricos moderado, severo e na recuperação após o estresse (Figura 4 A).

**Figura 4** – RT-PCR semi-quantitativo do gene *CaDUR3* em estresses abióticos. **A** – Estresse hídrico: Sem estresse (SE), estresse moderado (EM), estresse severo (ES) e recuperado (REC). **B** – Estresse térmico: Sem estresse (SE), estresse moderado (3 D), estresse severo (5 D). **C** – Estresse salino: Sem estresse (SE), 6 D, 12 D e 25 D após o início do estresse salino (150 mM NaCl). Foi utilizado o gene de referência *CaEF1 $\alpha$*  como controle do experimento (CARVALHO et al., 2013).



No estresse térmico, o gene *CaDUR3* apresentou uma expressão constante durante todo o período do estresse (Figura 4 B), pouco superior ao observado no material não-estressado, similarmente ao observado no experimento de estresse hídrico (Figura 4 A).

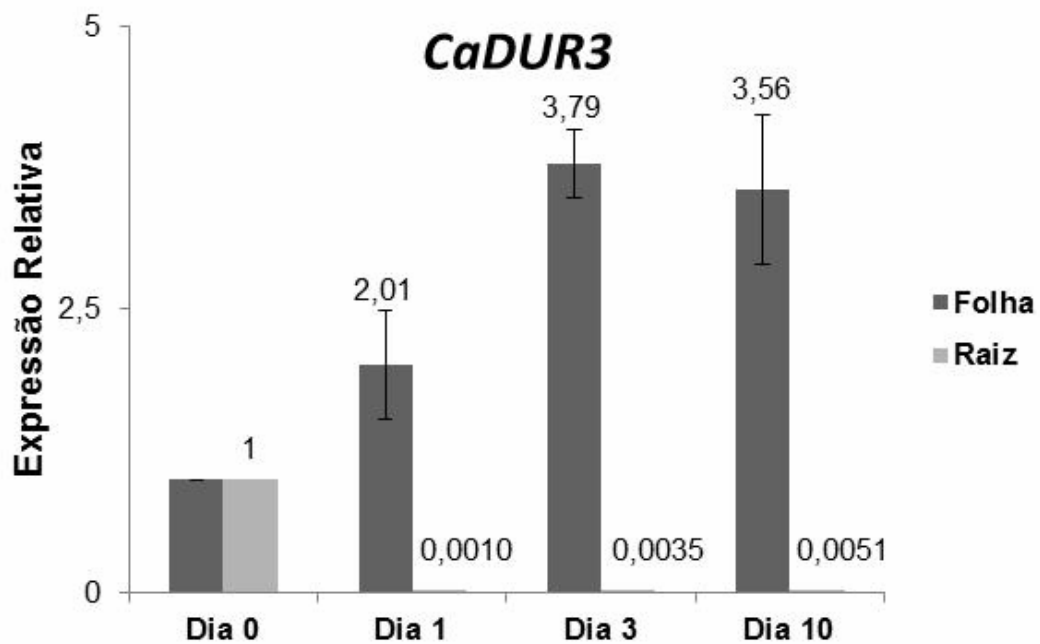
*CaDUR3* durante o período de irrigação com solução salina (6, 12 e 25 dias) teve redução em seu nível transcricional, quando comparado com demais estresses abióticos e com a condição não-estressada do experimento (Figura 4). Em nosso estudo, *CaDUR3* foi regulado em folhas, sob diferentes estresses abióticos

(estresse hídrico, altas temperaturas e salino), sugerindo que esse transportador é diferencialmente regulado por estresses.

#### 4.4.4 Análise Transcricional sob Supressão de N

Para entender o mecanismo transcricional de *CaDUR3* no cafeeiro, plantas foram submetidas a supressão de N (Figura 1) e realizada análise por qPCR (Figura 5).

**Figura 5** – Expressão relativa do gene *CaDUR3* nos tecidos de folha e raiz crescidas sob supressão de nitrogênio. Após o Dia 0 a fonte de N ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) foi retirada até o término do experimento (Dia 10) das plantas cultivadas em solução nutritiva. A normalização feita com o gene de referência *CaEF1 $\alpha$*  (CARVALHO et al., 2013).



De acordo com o padrão do perfil transcricional do gene *CaDUR3* obtido por qRT-PCR (Figura 5), pode-se concluir que a sua expressão relativa aumenta em folhas após a supressão de N. Após 24 horas de supressão de N, o nível transcricional dobra em relação ao Dia 0, ficando cerca de 3,5X maior após 72h e até 10 dias (Figura 5). Em raiz, os níveis transcricionais foram inibidos após o dia 0. Em plantas de *Arabidopsis* e arroz a expressão do gene *DUR3* também foi induzida em condições de deficiência de N (LIU et al., 2003; WANG et al., 2011; WANG et al., 2012). No cafeeiro, *CaDUR3* respondeu de maneira distinta a

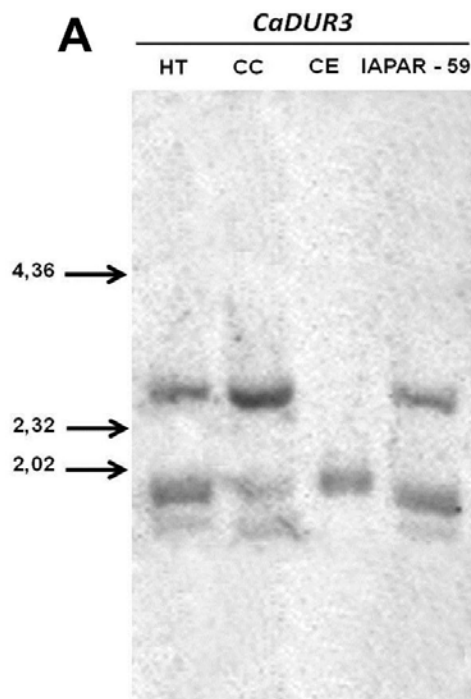
observada em sistemas-modelo, abrindo a perspectiva de estudos mais detalhados que confirmem se o padrão transcricional observado é característico de plantas perenes.

#### 4.4.5 Número de Cópias de *CaDUR3*

A determinação do número de cópias do gene *CaDUR3* foi realizada por meio da técnica de Southern blot, utilizando membrana de náilon contendo DNAs de *C. arabica* cv. Híbrido de Timor CIFIC 832/2, *C. canephora*, *C. eugenioides* e *C. arabica* cv. IAPAR-59 digeridos com a enzima de restrição *DraI* (Figura 6).

A análise de Southern blot exibiu uma única banda no genoma *C. eugenioides*, e dois sinais fortes de hibridização em *C. arabica* que é semelhante ao padrão de restrição observado no parental *C. canephora*, indicando que provavelmente *CaDUR3* atua como um gene de cópia única.

**Figura 6** – Análise do número de cópias de *CaDUR3* em café. O DNA genômico de *C. arabica* cv. Híbrido de Timor CIFIC 832/2 (HT), *C. canephora* (CC), *C. eugenioides* (CE) e *C. arabica* cv. IAPAR-59 foram digeridos com as enzimas de restrição *DraI*. O inserto do clone CA00-XX-IA2-016-H07-EC.F, que corresponde ao gene *CaDUR3*, foi usado como sonda.



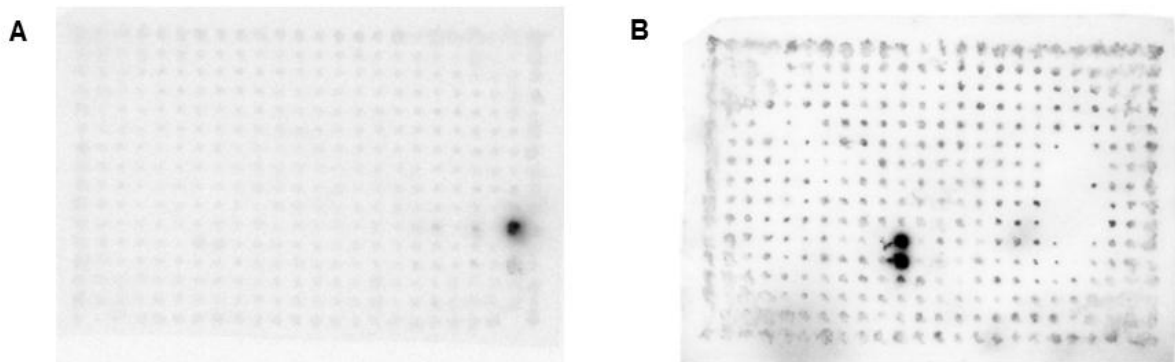
*DUR3* pertence a uma família de transportadores de diversos solutos encontrados em eucariontes, e que apresenta-se como sendo de cópia única nos sistemas vegetais avaliados até o momento (DeMICHELE et al., 2012), mostrando que os dados observados em cafeeiro são concordantes com o observado em outros genomas vegetais sequenciados.

#### 4.4.6 Identificação de Clones BAC Contendo o Gene *CaDUR3*

O uso de bibliotecas BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) tem se tornado uma ferramenta importante na pesquisa genética devido a sua facilidade de manipulação. Já foram construídas várias bibliotecas para diferentes organismos de interesse agrônomo como sorgo (KLEIN et al., 2000), soja (WU et al., 2004), maçã (HAN et al., 2007) e algodão (KELLEHER et al., 2007). Neste trabalho uma biblioteca BAC de *C. arabica* Híbrido de Timor CIFIC 832/2 (CAÇÃO et al., 2007) foi utilizada para a seleção de clones que poderiam conter o gene *CaDUR3*. A biblioteca BAC contém 56.832 clones com insertos em torno de 118 Kb que variam de 45 a 250 kb, indicando que esta biblioteca fornece uma cobertura de 5 a 6 vezes o tamanho do genoma do Híbrido Timor CIFIC 832/2.

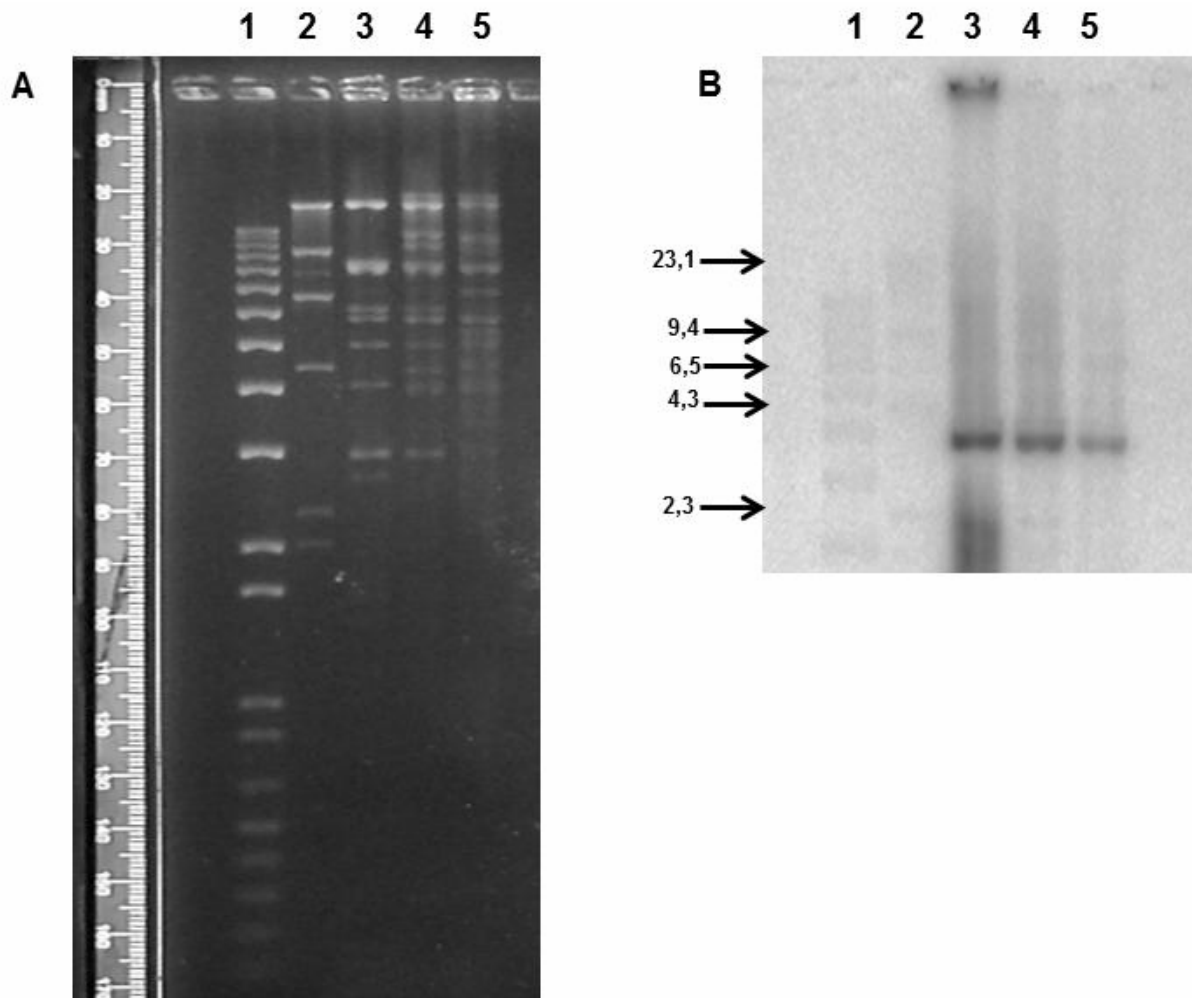
A biblioteca BAC foi condensada em *superpools* e *pools* de clones BAC os quais passaram por uma triagem através da técnica de PCR (dados não mostrados) e posterior de hibridação de colônias, onde foram identificados 3 possíveis clones BAC positivos contendo o gene *CaDUR3* (Figura 7).

**Figura 7** – Hibridização de clones BAC em membranas. Nas placas 9K23 (A) – 90K11 e P90L11 (B), foram encontrados possíveis clones para o gene *CaDUR3*.



Os BACs selecionados foram submetidos à análise do padrão de restrição utilizando a enzima *HindIII* (Figura 8 A) realizado hibridização utilizando como sonda o gene *CaDUR3* (Figura 8 B).

**Figura 8** – **A** – Perfil de restrição, utilizando a enzima *HindIII*, dos clones BAC em gel de agarose 1%. **1** – Peso Molecular 1Kb; **2** – DNA  $\lambda$  *HindIII*; **3** – Placa09K23; **4** – Placa90K11; **5** – Placa90L11. **B** – Hibridização com a sonda *CaDUR3*.

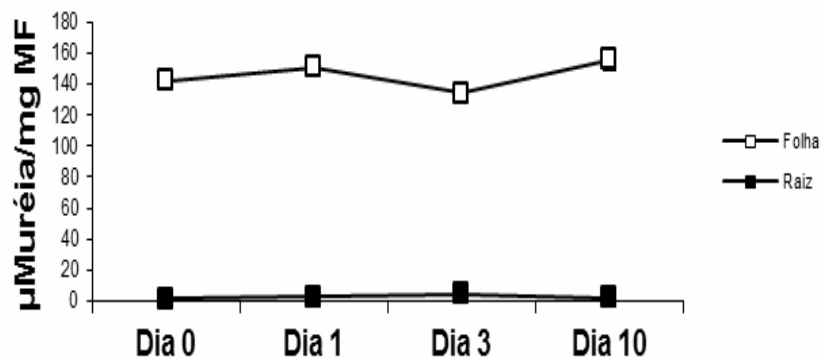


A hibridização dos clones 09K23, 90K11 e 90L11 (Figura 8 B) foram semelhantes, sugerindo a recuperação de diferentes homeólogos representativos de *CaDUR3*. O número de clones identificado na biblioteca está relacionado com a cobertura desta no genoma de *C. arabica* (~5 vezes) e pelo fato do gene *DUR3* ser cópia única, semelhante a outras plantas (De MICHELE et al, 2012). Futuros trabalhos de sequenciamento e análise de BACs poderão permitir uma análise genômica comparativa mais detalhada do *locus* onde encontra-se *CaDUR3*.

#### 4.4.7 Teor de Uréia

A uréia é uma importante fonte N disponível para as plantas nos solos e um intermediário essencial no metabolismo de N (por exemplo, produzido durante a degradação de arginina pela arginase) (WANG et al., 2008; WITTE, 2011). Com relação ao teor de uréia em folhas e raízes sob supressão de N, observou-se que as folhas apresentavam um maior teor de uréia, porém não houve variação entre os pontos de coleta (Figura 9).

**Figura 9** – Teor de uréia detectado em folha e raiz sob supressão de N. Valores apresentados por média  $\pm$  erro padrão (n=3).



Embora as raízes das plantas absorvam todos os elementos (seja elas nutrientes ou não) que estiverem em forma disponível na solução do solo, boa parte destes elementos é assimilada nas folhas. (FAQUIN, 2005).

#### 4.5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi demonstrado que, embora os homólogos de DUR3 tenham papel fundamental na aquisição de uréia por alta afinidade, o ortólogo de cafeeiro *CaDUR3* é transcricionalmente ativo em outros tecidos vegetativos e reprodutivos de cafeeiro.

*CaDUR3* é um gene que comporta-se como cópia única no genoma tetraplóide de *C. arabica*, em concordância com dados observados em sistemas modelos.

Futuros estudos funcionais de *CaDUR3*, que caracterizem funcionalmente sua atividade de transporte de uréia em sistemas heterólogos, bem

como a caracterização genômica do *locus* de *CaDUR3* por meio do sequenciamento de BACs de *C. arabica* aqui selecionados, proporcionarão uma importante base na compreensão de mecanismos moleculares relacionados a absorção e uso de uréia no cafeeiro.

#### 4.6 REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J. et al. Gapped BLASTband PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389–3402, 1997.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, v. 30, p. 365–372, 2000.

BUDZINSKI, I. G. F.; SANTOS, T. B.; SERA, T.; POT, D.; VIEIRA, L. G. E.; PEREIRA, L. F. P. Expression patterns of three  $\alpha$ -expansin isoforms in *Coffea arabica* during fruit development. **Plant Biology**, v. 13, p. 462–471, 2010.

CAÇÃO, S. M. B. Construção e caracterização de uma biblioteca genômica de *C. arabica* em Cromossomo Artificial de Bactéria. **Tese de Doutorado**, Fitotecnia. Universidade Estadual de Londrina. Londrina-PR. 76 p. 2012.

CARILLO, P.; MASTROLONARDO, G.; NACCA, F.; FUGGI, A. Nitrate reductase in durum wheat seedlings as affected by nitrate nutrition and salinity. **Functional Plant Biology**, v. 32: 209–219, 2005.

CARVALHO, K.; BESPALHOK FILHO, J. C.; DOS SANTOS, T. B.; SOUZA, S. G. H.; VIEIRA, L. G. E.; PEREIRA, L. F. P.; DOMINGUES, D. S. Nitrogen Starvation, Salt and Heat Stress in Coffee (*Coffea arabica* L.): Identification and Validation of New Genes for qPCR Normalization. **Molecular Biotechnology**, 2012.

CENCI, A.; COMBES, M. C.; LASHERMES, P. Genome evolution in diploid and tetraploid *Coffea* species as revealed by comparative analysis of orthologous genome segments. **Plant Molecular Biology**, v. 78, p.135–45, 2012.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology**, v.11, p.113–116, 1993.

DE MICHELE, R.; LOQUÉ, D.; LALONDE, S.; WOLF, B. Ammonium and urea transporter inventory of the *Selaginella* and *Physcomitrella* genomes. **Front Plant Science**, v. 3, p. 62, 2012.

Dos SANTOS, T. B.; BUDZINSKI, I. G. F.; MARUR, C. J.; PETKOWICZ, C. L. O.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. 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**, 49: 441–448, 2011.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem Bull**, v. 19, p. 11–15, 1987.

ELBERRY, H. M.; MAJUMDAR, M. L.; CUNNINGHAM, T. S.; SUMRADA, R. A.; COOPER, T. G. Regulation of the urea active transporter gene (DUR3) in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Bacteriology**, v. 175, p. 4688–4698, 1993.

FAQUIN, V. **Nutrição Mineral de Plantas**. Lavras: UFLA – FAEPE, p.183, 2005.

FLORES P, BOTELLA MA, MARTÍNEZ V, CERDÁ A. Ionic and osmotic effects of nitrate reductase activity in tomato seedlings. **Journal of Plant Physiology**, 156:552–557, 2000.

GASPAR, L.; BOUSSER, A., SISOËFF, I.; ROCHE, O.; HOARAU, J.; MAHÉ, A. Cloning and characterization of ZmPIP1-5b, an aquaporin transporting water and urea mar0301. **Plant Science**, v. 165, p. 21–31, 2003.

GERBEAU, P.; GUCLU, J.; RIPOCHE, P.; MAUREL, C. Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. **Plant Journal**. v. 18, p. 577–587, 1999.

GONTHIER, L.; BELLEC, A.; BLASSIAU, C.; PRAT, E.; HELMSTETTER, N.; RAMBAUD, C.; HUSS, B.; HENDRIKS, T.; BERGÈS, H.; QUILLET, M-C. Construction and characterization of two BAC libraries representing a deep-coverage of the genome of chicory (*Cichorium intybus* L., Asteraceae). **BMC Research**, v. 3, p. 225, 2010.

HAN, Y.; GASIC, K.; MARRON, B.; BEEVER, J. E.; KORBAN, S. S. A BAC-based physical map of the apple genome. **Genomics**, v. 89. p. 630–637, 2007.

KELLEHER, C. T.; CHIU, R.; SHIN, H.; BOSDET, I. E.; KRZYWINSKI, M. I.; FJELL, C. D.; WILKIN, J. A physical map of the highly heterozygous *Populus* genome: integration with the genome sequence and genetic map and analysis of haplotype variation. **Plant Journal**, v. 50, p. 1063–1078, 2007.

KLEIN, P. E.; KLEIN, R. R.; CARTINHOOR, S. W.; ULANCH, P. E.; DONG, J.; OBERT, J. A.; MORISHIGE, D. T.; SCHLUETER, S. D.; CHILDS, K. L.; ALE, M.; MULLET, J. E. A high throughput AFLP-based method for constructing integrated genetic and physical maps: progress toward a sorghum genome map. **Genome Research**, v. 10, p.789–807, 2000.

KOJIMA, S.; BOHNER, A.; GASSERT, B.; YUAN, L.; von WIRÉN, N. AtDUR3 represents the major transporter for high-affinity urea transport across the plasma membrane of nitrogen-deficient Arabidopsis roots. **Plant Journal**, v. 52, p. 30–40, 2007.

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

LIU, L. H.; LUDEWIG, U.; GASSERT, B.; FROMMER, W. B.; VON WIRÉN, N. Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.133, p.1220–1228, 2003.

LOQUÉ, D.; von, WIRÉN, N. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. **Journal Experimental Botanical**, v. 55, p. 1293–1305, 2004.

MOREL, M.; JACOB, C.; FITZ, M.; WIPF, D.; CHALOT, M.; BRUN, A. Characterization and regulation of PiDur3, a permease involved in the acquisition of urea by the ectomy-corrhizal fungus *Paxillus involutus* fungal **Genetica Biology**, v.45, p. 912–921, 2008.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREEZ, R. H.; MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, 339: 62–66, 2003.

REIZER, J.; A. REIZER, M. H.; SAIER JR. A functional superfamily of sodium/solute symporters, **Biochemistry Biophysical**, v. 1197, p.133–166, 1994.

ROY, S. J.; TUCKER, E. J.; TESTER, M. Genetic analysis of abiotic stress tolerance in crops. **Current Opinion in Plant Biology**, 14: 232–239, 2011.

SAIER, M. H. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. **Microbiology Molecular Biology**, v. 64, p. 354–411, 2000.

SCHROEDER, J.; SOTO, G.; ALLEVAB, K.; MAZZELLAA, M. A.; AMODEOB, G.; MUSCHIETTI, J. P. AtTIP1;3 and AtTIP5;1, the only highly expressed Arabidopsis pollen-specific aquaporins, transport water and urea. **FEBS Letters**, v. 582, p. 4077–4082, 2008.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods Molecular. **Biology Evolutionary**, v. 28, p. 2731–2739, 2011.

TURK, E.; WRIGHT, E. M. Membrane topology motifs in the SGLT cotransporter family. **Journal of Membrane Biology**, v. 159, p. 1–20, 1997.

VIEIRA, L. G. E.; ANDRADE, A. C.; COLOMBO, C. A.; MORAES, A. H. A.; METHA, A., et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 18, p.95–108, 2006.

WANG, W. H.; KOHLER, B.; CAO, F. Q.; LIU, L. H. Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants. **Plant Science**, 175: 467–477, 2008.

WANG, W.; KOHLER, H.; CAO, B.; LIU, F. Q.; GONG, G. W.; SHENG, Y. Y.; SONG, S.; CHENG, Q. C.; GARNETT, X. Y.; OKAMOTO, T.; QIN, M.; MÜLLER-RÖBER, R. B.; TESTER, M.; LIU, L. H. Rice DUR3 mediates high-affinity urea transport and plays an effective role in improvement of urea acquisition and utilization when expressed in *Arabidopsis*. **New Phytology**, v.193, p. 432–444, 2011.

WEATHERBURN, M. W. Phenol–hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, v. 39, p. 971–974, 1967.

WITTE, C. P. Urea metabolism in plants. **Plant Science**, v.180, p.431–438, 2011.

WU, C.; SUN, P.; NIMMAKAYALA, F. A.; SANTOS, K.; MEKSEM et al., A BAC- and BIBAC-based physical map of the soybean genome. **Genome Research**. v.14, p. 319–326, 2004.

YU, Q.; GUYOT, R.; KOCHKO, A.; DE BYERS, A.; NAVAJAS-PÉREZ, R.; LANGSTON, B.J.; DUBREUIL-TRANCHANT, C.D.; PATERSON, A.H.; PONCET, V.; NAGAI, C.; MING, R. Micro-collinearity and genome evolution in the vicinity of an ethylene receptor gene of cultivated diploid and allotetraploid coffee species (*Coffea*). **Plant Journal**, v. 67, p. 305–317, 2011.

## 5 ARTIGO B:

### A SUPRESSÃO DE NITROGÊNIO (N) MODULA TRANSCRICIONALMENTE GENES RELACIONADOS A ABSORÇÃO E ASSIMILAÇÃO DE N EM RAÍZES E FOLHAS EM CAFEIEIRO.

#### 5.1 RESUMO

O nitrogênio (N) é o nutriente mais requerido pelo cafeeiro, com aquisição principalmente pelas raízes. As formas de N mais abundantes em solos agrícolas são o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e o amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), enquanto que a uréia [ $\text{CO}_2(\text{NH})_2$ ] é a principal forma de N utilizada na adubação. Aumentar a eficiência do uso de nitrogênio (NUE) é um fator essencial para uma agricultura sustentável, levando a um aumento da produção com menor uso de insumos e menos impactos ao ambiente. Compreender os mecanismos transcricionais dos genes envolvidos nesses processos é de grande importância para o desenvolvimento de cultivares com maior eficiência nutricional. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar transcricionalmente genes relacionados com a absorção e assimilação de N em plantas de *C. arabica* mantidas em solução nutritiva sob supressão de N. Foram selecionados para as análises por qPCR os genes *CaNRTa*, *CaAMTd*, *CaGSc* e *CaNR*. As análises por qPCR demonstram que esses genes apresentaram padrões de modulação transcricional diferentes em *C. arabica* com relação à absorção e assimilação de N. As atividades de nitrato redutase (ANR) nas folhas e raízes não apresentaram diferenças representativas, enquanto que a atividade de glutamina sintetase (GS) apresentou diferenças entre os tecidos analisados (folha e raiz). Através das respostas moleculares reguladas pela falta de N e sobre os papéis desempenhados pelas enzimas envolvidas nesse processo no cafeeiro, este conjunto de informações propiciará um maior entendimento visando à aplicação de novas estratégias voltadas para resposta a supressão de N.

**Palavras-chave:** Eficiência de uso de nitrogênio. Expressão gênica. *Coffea arabica*.

#### 5.2 Introdução

O nitrogênio (N) é quantitativamente o nutriente mais importante para as plantas, pois o seu fornecimento tem uma profunda influência sobre muitos aspectos relacionados ao crescimento e desenvolvimento, incluindo o crescimento das raízes (KROUK et al., 2010; LIMA et al., 2010) e ramos (HIREL et al., 2007.; TSCHOEP et al., 2009). O N constitui cerca de 2% da matéria seca das plantas e é o componente essencial mais exigido pelo cafeeiro e mais exportado para os grãos (van RAIJ et al., 1996; VALARANI, 2005), pois trata-se de componente inorgânico

necessário para a síntese de proteínas, ácidos nucleicos, enzimas, vitaminas, pigmentos e uma variedade de outros metabólitos (MALAVOLTA et al., 1997; CRAWFORD; FORDE, 2002; KUSANO et al., 2011). A falta 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 e de outras culturas, levando a sintomas de amarelecimento e queda das folhas (Da MATTA et al., 2007).

As plantas são capazes de absorver diversas formas orgânicas e inorgânicas de N do solo, contudo, a uréia, o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e o amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) são as principais fontes de N disponíveis para plantas. Quando o  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  são oferecidos às plantas em quantidades equivalentes, o amônio é geralmente absorvido mais rapidamente do que o nitrato (MACDUFF; JACKSON, 1991). Além da sua importância como fonte de N para as plantas, o nitrato é uma molécula osmoreguladora e sinalizadora, que modula a síntese de citocininas, que por sua vez controlam processos de desenvolvimento, síntese de proteínas e aquisição de macro e micronutrientes (HIROSE et al., 2008). A redução do  $\text{NO}_3^-$  para nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) é realizada no citosol, pela enzima nitrato redutase (NR), que entra nos plastídios (cloroplasto na parte aérea), sendo reduzido para  $\text{NH}_4^+$  pela nitrito redutase (NiR) (SHI et al., 2010). O  $\text{NH}_4^+$  é então assimilado no primeiro passo para a via glutamina sintase (GS)/glutamato sintase (GOGAT), onde é convertida a glutamina, podendo ocorrer rotas alternativas em condições específicas (DUBOIS et al., 2003). 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).

Em plantas, existem duas isoformas de GS: a GS1 (citosólica), que ocorre no citosol de raízes e células da parte aérea, e a GS2 (plastídica), que está presente nos tecidos fotossintéticos, plastídios de raízes e outros tecidos não fotossintéticos (ISHIYAMA et al., 2004; SWARBRECK et al., 2011). GS1 apresenta como função vital a assimilação de  $\text{NH}_4^+$  em glutamina para transporte e distribuição por toda a planta. Durante a senescência nas folhas, a GS1 cumpre uma função chave na assimilação e reciclagem de  $\text{NH}_4^+$  gerado a partir de vários processos catabólicos (BAUER et al., 1997; MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010). Estudos

tem relatado o aumento das taxas de crescimento de plantas transgênicas superexpressando GS1 em condições de baixo suprimento de N (OLIVEIRA et al., 2002; FU et al., 2003).

Em plantas superiores, duas famílias de transportadores, NRT1/PTR e NRT2, estão envolvidas em absorção radicular de nitrato (DECHORGNAT et al., 2011). Vários estudos já caracterizaram transcricionalmente em sistemas vegetais modelo a resposta ao sinal primário de nitrato (WANG et al., 2000, 2003; SCHEIBLE et al., 2004;. ORSEL et al., 2006;. GUTIÉRREZ et al., 2007). O nitrato não apenas induz rapidamente genes que são responsáveis pelo seu transporte (por exemplo, NRT1.1 e NRT2.1) e assimilação (por exemplo, *NIA1*, *NIA2*, e *Nii*), como também provoca uma alteração na expressão de aproximadamente 1.000 genes responsivos ao  $\text{NO}_3^-$  em *A. thaliana* (KROUK et al., 2010; CASTAINGS et al., 2011). Os transportadores *NRT2* são caracterizados por apresentarem alta afinidade no transporte de nitrato, enquanto a maioria dos membros da família *NRT1* apresentam baixa afinidade, exceto *NRT1.1* que possui uma dupla afinidade. *NRT1.1*, *NRT1.2*, *NRT2.1*, e *NRT2.2* estão envolvidos principalmente na absorção de nitrato a partir da ambiente externo (MILLER et al., 2007; TSAY et al, 2007; HO et al., 2009).

Os primeiros genes transportadores de amônio (*AMT*) foram identificados em trabalhos com leveduras (MARINI et al., 1994). Nas plantas, as famílias *AMT* podem ser subdivididas em duas subfamílias (LOQUÉ & VON WIREN, 2004): *AMT1* – alta afinidade (SALVEMINI et al., 2001) e *AMT2* – baixa afinidade, que podem ainda ser divididos em três subclasses como em arroz (SUENAGA et al., 2003). São descritos vários membros da subfamília *AMT1* em plantas, incluindo homólogos de *A. thaliana* (*AtAMT1.1*, *AtAMT1.2*, *AtAMT1.3*: NINNEMANN et al., 1994; GAZZARRINI et al., 1999), *Brassica napus* (*BnAMT1.2*: PEARSON et al., 2002), *Lotus japonicus* (*LjAMT1.1*, *LjAMT1.2*, *LjAMT1.3*: SALVEMINI et al., 2001; D'APUZZO et al., 2004), *Solanum lycopersicon* (*LeAMT1.1*, *LeAMT1.2* e *LeAMT1.3*: LAUTER et al., 1996; von WIRÉN et al., 2000b; BECKER et al., 2002; LUDEWIG et al., 2002), *Oryza sativa* (*OsAMT1.1*, *OsAMT1.2*, *OsAMT1.3*: SONODA et al., 2003). Em *Populus trichocarpa* foram caracterizados 14 genes *AMT*, dos quais seis genes são pertencentes a subfamília *AMT1* e oito a subfamília *AMT2* (COUTURIER et al., 2007).

É importante ressaltar que há demanda para uma compreensão detalhada do complexo morfológico, transcricional, adaptações fisiológicas e

bioquímicas de plantas sob supressão de N (KANT et al., 2011). O presente trabalho teve como objetivo avaliar transcricionalmente genes relacionados à absorção e assimilação de N em plantas de café cultivadas sob supressão de N.

### 5.3 MATERIAL E MÉTODOS

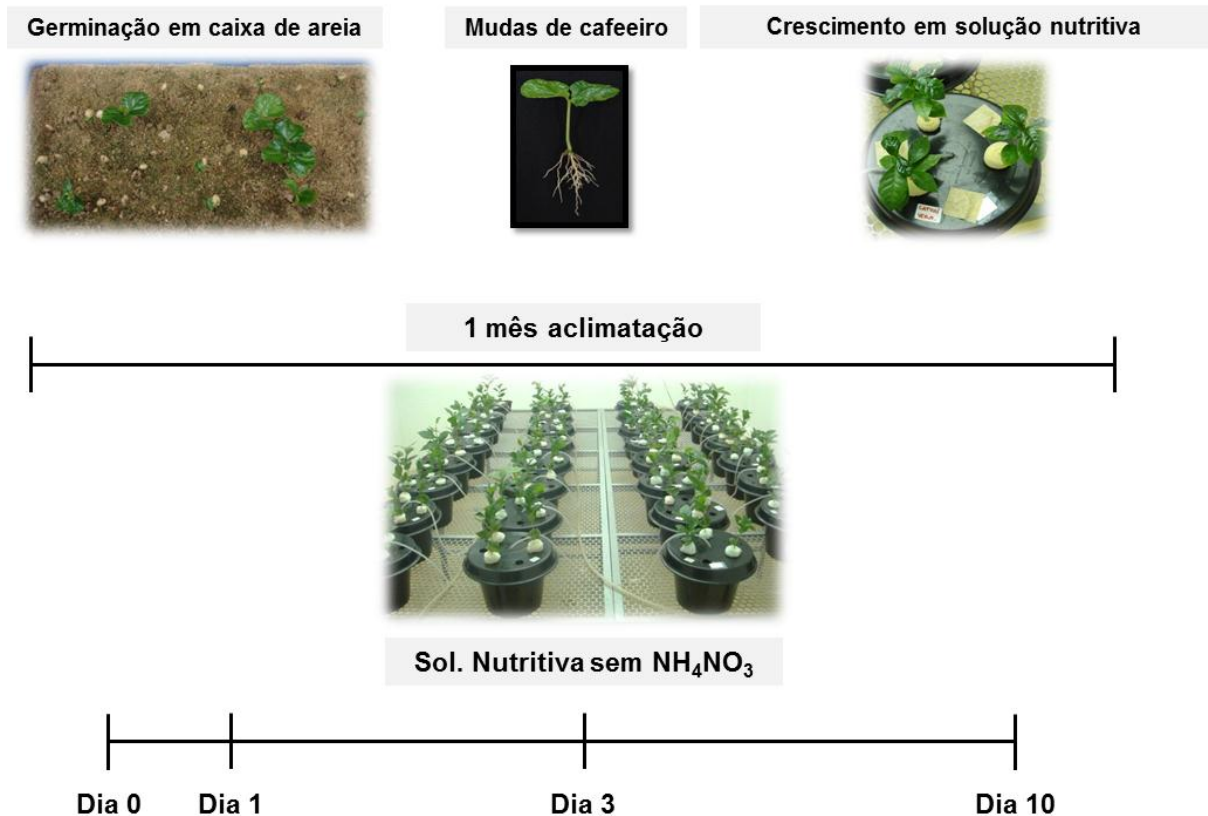
#### 5.3.1 Identificação *In Silico* de Sequências Expressas Relacionadas aos Genes Envolvidos na Absorção e Assimilação de N

Foram realizadas buscas a partir de palavras-chave para genes envolvidos na absorção e assimilação de N dentro do banco de dados do projeto Brasileiro Genoma Café (VIEIRA et al., 2006; MONDEGO et al., 2011). Os ESTs identificados nesta procura tiveram sua similaridade confirmada por BLAST (ALTSCHUL et al., 1997). A relação dos genes selecionados para análise pela técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) estão descritas na Tabela 1.

#### 5.3.2 Plantas Crescidas Sob Supressão de N

Sementes de café da cultivar IAPAR-59 foram germinadas em caixas contendo areia esterilizada em casa de vegetação. Após quatro meses, as raízes foram lavadas cuidadosamente com água destilada para retirada da areia e as plantas foram então transferidas para vasos de 4 L com solução nutritiva e aeração constante contendo macro e micronutrientes com a seguinte composição (em  $\mu\text{M}$ ): 800  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 250  $\text{MgSO}_4$ , 200  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 500  $\text{CaCl}_2$ , 4000  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 100  $\text{NaFeEDTA}$ , 5  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 3  $\text{MnSO}_4$ , 2,5  $\text{ZnSO}_4$ , 0,1  $\text{CuSO}_4$ , 0,7  $\text{NaMoO}_4$ . Após um mês de crescimento em solução nutritiva, as plantas foram transferidas para meio sem N por 1, 3 e 10 dias para verificação da dinâmica da modulação dos genes selecionados (Figura 1).

**Figura 1** – Representação do experimento de supressão de N.



Para cada um destes pontos, foram coletadas folhas e raízes laterais para extração de RNA total. Cada replicata biológica foi representada por *pools* de tecidos de ao menos 9 plantas sob as mesmas condições. Os materiais vegetais coletados foram imersos imediatamente em N líquido e armazenada em freezer  $-80^\circ\text{C}$  até o momento de extração de RNA.

### 5.3.3 Extração de RNA Total, Purificação e Síntese de cDNA

O RNA total de folha e raiz do tratamento sob supressão de N foi extraído conforme descrito por Chang et al (1993). As amostras de RNA foram purificadas utilizando o kit Pure Link Micro to Midi Total RNA Purification System (Invitrogen). Após a purificação foi verificado a integridade das amostras foram avaliadas por electroforese em gel 1% (p/v) de agarose com tampão TAE (2 M Tris – acetato, 0,05 M EDTA), contendo brometo de etídio ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e visualizados sob luz UV em transluminador. A concentração do RNA e a pureza foram determinadas usando NanoDrop® ND-100 espectrometria a 260 e 280 nm e as razões 260/280 e 260/230. Foram utilizadas as amostras que apresentaram razão acima de 1,8. A

ausência de contaminação com DNA genômico foi confirmada por PCR utilizando o par de *primers CaEF1 $\alpha$* , descrito em Carvalho et al. (2013). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por um SuperScript III Transcriptase Reversa (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante, num volume final de 20  $\mu$ L, utilizando 5  $\mu$ g de RNA total. Para cada 1  $\mu$ g do RNA total extraído dos tecidos do cafeeiro foi misturado a 500 ng de Oligo (dT)<sub>12-18</sub> e 1 mM de dNTPmix. A remoção do RNA original foi feita por meio de incubação dessa reação a 37°C por 20 min com 2 unidades de RNase H (Invitrogen). Os produtos finais de cDNA foram diluídas 10 vezes antes de serem utilizados em qPCR.

#### 5.3.4 Análise qRT-PCR

O nível transcricional dos genes *CaNRTa*, *CaAMTd*, *CaGSc* e *CaNR* foram avaliados em situação de supressão de nitrogênio pela técnica de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) utilizando *primers* específicos para os genes em estudo (Tabela 1). O gene *CaEF1 $\alpha$*  foi utilizado como normalizador, conforme recomendado por CARVALHO et al. (2013). Foi realizada diluições seriadas dos cDNAs de 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, e foi utilizada a diluição de 10<sup>-1</sup>, a qual apresentou maior estabilidade para os tecidos analisados. Cada reação continha 12.5  $\mu$ L 2x SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas), 0,5  $\mu$ L de cada primer (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ L de cDNA diluído 1:10 em água milli-Q, com um volume final de 25  $\mu$ L. As condições das reações foram de 10 min a 95 °C, seguido por quarenta ciclos de amplificação de 95 °C por 30 s e 60 °C por 60 s. Em todas as reações foram realizadas uma curva de dissociação para verificar a presença de produtos inespecíficos. A eficiência de amplificação de todas as amostras foram avaliadas de acordo com os valores individuais de amplificação de transcritos apresentados por cada um deles e estes foram plotados e analisados *in silico* pelo Programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003). Os dados utilizados apresentaram eficiência entre 90% e 110%. Foram efetuadas três repetições técnicas para avaliação por ponto nas triplicatas biológicas. O calibrador utilizado para comparação do padrão de atividade transcricional entre os genes foi o Dia 0, tanto para folhas quanto para raízes, e para este foi adotado o valor igual 1 em todas as análises. O cálculo de expressão relativa (RQ) foi feito analogamente ao realizado por Marraccini et al. (2012), mediante a aplicação da fórmula  $(1+E)^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(amostra)} -$

$\Delta C_{t(\text{calibrador})}$  e  $E$ =eficiência de amplificação. O experimento de qPCR seguiu o “*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*” (MIQE – BUSTIN et al., 2009).

## 5.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

### 5.4.1 Conteúdo de Proteínas Totais

O material vegetal armazenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (folha e raiz) foi homogeneizado em 2 mL tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,3), PVP 1% (p/v) e EDTA 0,1 mM, previamente resfriado a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após centrifugação por 10 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 7500 rpm, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e mantido no gelo até o momento das análises. Os extratos foram submetidos à quantificação de proteínas totais pelo método Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Para cada tecido analisado foram realizadas três replicadas.

### 5.4.2 Determinação da Quantidade de Prolina

A determinação da concentração de prolina nas folhas e raízes foi realizada baseada em curva-padrão, conforme descrito por Bates (1973). Em condições normais e de supressão de N, folhas e raízes foram utilizadas para a análise de prolina. Foram coletados 100 mg de tecido, rapidamente congelado e macerado em  $\text{N}_2$  líquido. A extração foi feita com adição de ácido sulfosalicílico (10%) e, em seguida, o extrato foi centrifugado (10.000 rpm) por 5 min. Foram coletados 2 mL do centrifugado e acrescentados 2 mL da solução de ácido nítrico (1,25 g de nítrina; 30 mL de ácido acético glacial; 20 mL de ácido fosfórico 6 M) e de 2 mL de ácido acético glacial em tubos de microcentrífuga de 15 mL. As amostras foram então incubadas a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 h e, em seguida, transferidas para gelo. Após incubação, as amostras foram acrescidas de 4 mL de tolueno e homogeneizadas por 20 s para completa extração da prolina. O sobrenadante foi utilizado para determinação da concentração de prolina por espectrofotometria (520 nm). Para cada tecido analisado foram realizadas três replicadas.

### 5.4.3 Conteúdo de Aminoácidos Totais

O material vegetal congelado foi homogeneizado em etanol 80%, incubado a 80 °C por 20 min e centrifugado a 10.000 rpm por 10 min. As análises das concentrações de aminoácidos totais foram realizadas por uma metodologia otimizada para cafeeiro (PRAXEDES et al., 2006). Na mistura de reação continha 50 µL de tampão de citrato de NaOH  $1 \text{ kmolm}^{-3}$  (pH 5,2) com 0.2% (p/v) ácido ascórbico, 50 µL extrato etanólico e 100 µL de 1% (v/v) ninhidrina em 70% (v/v) etanol. A concentração de aminoácidos foi estimada utilizando uma curva padrão com uma mistura equimolecular de glicina, ácido glutâmico, fenilalanina e arginina em 70% (v/v) de etanol a 570 nm. Para cada tecido analisado foram realizadas três replicadas.

## 5.5 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

### 5.5.1 Atividade da Glutamina Sintetase (GS)

O material vegetal congelado foi homogeneizado em tampão contendo 25 mM Tris-HCl (pH 7,6), 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EDTA, 14 mM  $\beta$ -mercaptoetanol e 1% (p/v) de polivinilpirrolidona (PVP). O homogeneizado foi centrifugado a 25.000 g durante 30 min a 4 °C. Atividade da glutamina sintetase foi determinada usando hidroxilamina como substrato e a formação de  $\gamma$ -glutamil-hidroxamato ( $\gamma$ -GHM) foi determinada com cloreto férrico acidificado (WALLSGROVE et al., 1979). O  $\gamma$ -GHM foi quantificado usando glutamina comercial como padrão e a absorbância medida a 540 nm. Para cada tecido analisado foram realizadas três replicadas.

### 5.5.2 Atividade do Nitrato Redutase (NR) *In Vitro*

A atividade *in vitro* da NR foi determinada segundo Rossa (1999), com modificações. Cerca de 70 mg de tecido foram triturados em almofariz com  $\text{N}_2$  líquido, suspenso em um tampão de extração {0,2 M tampão fosfato de sódio, pH 8,0 [2,8% (p/v)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e 97,2% (p/v)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ]; 5 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,3% (p/v) BSA} e centrifugado a 12.000 rpm e 4 °C por 15 min. O

sobrenadante foi recolhido e incubado em tampão de reação (0,2 M tampão fosfato de sódio, pH 8,0; 6 mM KNO<sub>3</sub>; 0,5 mM MgSO<sub>4</sub>) a 25 °C e com adição de 0,04 mM NADH para iniciar a reação enzimática. Controles sem a adição de NADH foram realizados para cada tratamento. A reação foi interrompida com 1,4 mM ZnSO<sub>4</sub> e 43% (v/v) etanol e o material centrifugado a 12.000 rpm e 4°C por 10 min. A concentração de nitrito produzido pela atividade da NR foi determinada espectrofotometricamente pela absorção a 543 nm, usando uma cubeta de polipropileno de percurso óptico de 1 cm, logo após a adição de 9,6 mM sulfanilamida e 0,7 mM *n*-(1-naftil)-etilenodiamina diidroclorato (NED). Uma solução de NaNO<sub>2</sub> 0,1 mM foi usada para a confecção da curva padrão. A atividade *in vitro* da NR (ANR) foi calculada segundo a fórmula abaixo:

$$\text{ANR} = (\text{EBt} \cdot \text{NO}_2^- \text{ produzido}) / (\text{EBi} \cdot t \cdot \text{MF})$$

Onde EBt = volume de extrato bruto total, EBi = volume de extrato bruto incubado, t = tempo de incubação e MF = massa fresca. O resultado foi expresso em U.g<sup>-1</sup>, assumindo-se que 1 unidade de atividade da NR (U) corresponde a 1 µmol de nitrito produzido por minuto (CHAPMAN & HARRISON, 1988), sob temperatura constante de 25 °C. Para cada tecido analisado foram realizadas três replicadas.

## 5.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.6.1 Análise *In Silico*

A partir de palavras-chave foram realizadas buscas para os genes envolvidos na absorção e assimilação de N dentro do banco de dados do projeto Brasileiro Genoma Café (VIEIRA et al., 2006; MONDEGO et al., 2011). A análise com a ferramenta BlastX indica que os ESTs selecionados correspondem a transportadores de nitrato da família NRT, transportadores de amônio da família AMT, isoformas citosólica e plastidial de glutamina sintetase (GS), glutamato sintase dependente de NADH (NADH-GOGAT) e nitrato redutase. Os ESTs identificados analisados por qPCR foram: membro da família NRT – *CaNRTa*; família AMT – *CaAMTd*; uma isoforma de glutamina sintetase – *CaGSc* e nitrato redutase – *CaNR*.

A relação dos ESTs identificados, e os iniciadores desenhados para qPCR estão colocados na Tabela 1.

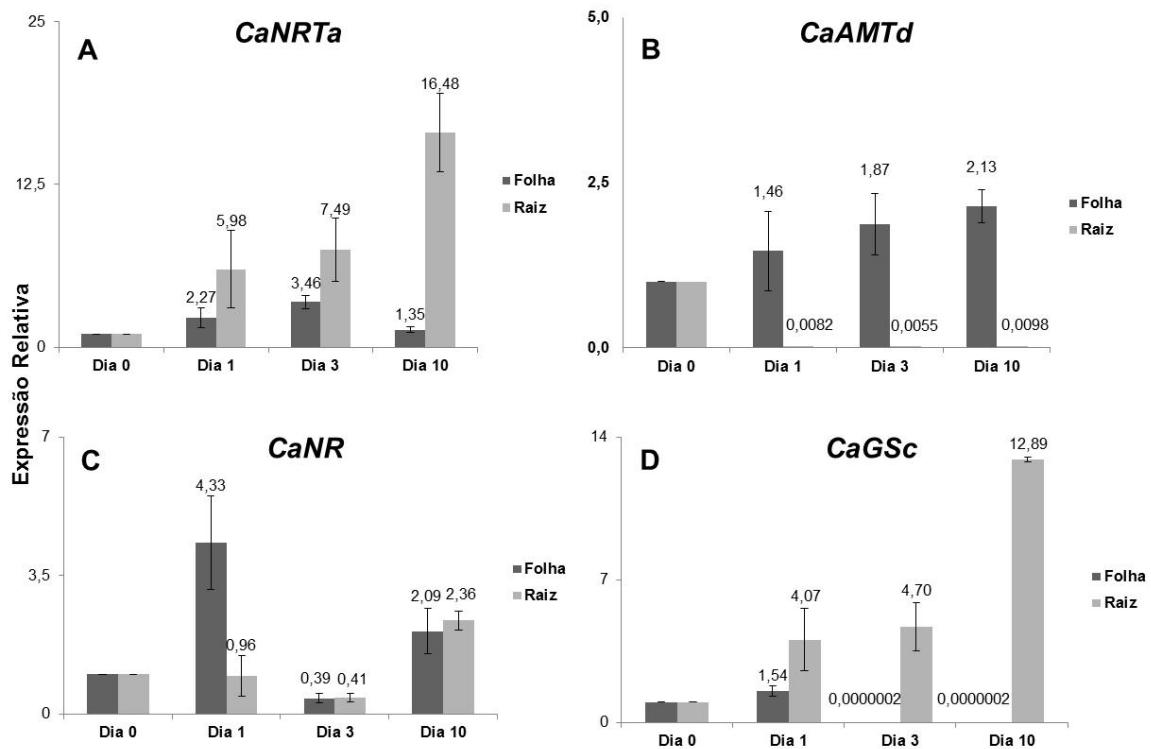
**Tabela 1** – Identificação dos genes de café e sequência dos respectivos pares de *primers* utilizados na análise por qRT-PCR de plantas submetidas a supressão de N.

<b>Gene</b>	<b>Primer Forward</b>	<b>Primer Reverse</b>	<b>Acesso NCBI</b>	<b>ESTs</b>	<b>Ortólogos - <i>Arabidopsis</i></b>
<i>CaNRTa</i>	GTGCCTTGGGAGTGACATTT	ATTGCTGTTTTCTGGGGTCA	GW491248.1	CA00-XX-LV5-018-B08-EQ.F	AT3G21670
<i>CaAMTd</i>	TCATCCTCTACGGCAGCATA	ACGTTACCCAGCAGATGACC	GW453001.1	CA00-XX-BP1-026-G02-BM.F	AT2G38290
<i>CaGSc</i>	GGAATGGTGCTGGTGCTCAC	CATAAGCAGCAATATGATCCTTGTG	GW490449.1	CA00-XX-FR2-004-E06-MC.F	AT5G16570
<i>CaNR</i>	TGTGCTACGGTTGATGAAAAGCTAT	ATCCAAGTATTGTGACATAACCCCTC	GT716337.1	CA00-XX-SH2-036-E02-EM.F	AT1G37130

### 5.6.2 Análise qPCR

Os genes *CaAMTd*, *CaNRTa*, *CaGSc* e *CaNR* foram selecionados para as análise por qPCR (Figura 2).

**Figura 2** – Perfil transcricional dos genes envolvidos na assimilação de N (**A** - *CaNRTa* – transportador de nitrato; **B** - *CaAMTd* – transportador de amônio; **C** - *CaNR* – nitrato redutase; **D** - *CaGSc* – glutamina sintetase citosólica) em folha e raiz do cafeeiro, em condição de supressão de N. Após o Dia 0 a fonte de N ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) foi retirada até o término do experimento (Dia 10). Foi utilizado o gene *CaEF1 $\alpha$*  como normalizador (CARVALHO et al., 2013). Os dados de expressão foram normalizados utilizando como calibrador o Dia 0 (plantas cultivadas sob suficiência N). Os valores são representados pela média  $\pm$  desvio-padrão (n = 3).



Em plantas superiores, existem duas famílias de transportadores responsáveis pela absorção de nitrato (NITRATE TRANSPORTER – NRT), os NRT1/PTR e NRT2, envolvidas em absorção radicular de nitrato (DECHORGNAT et al., 2011). A família de genes que codificam os transportadores NRT1/PTR possuem 53 membros, enquanto que a família NRT2 possui 7 membros em *A. thaliana* (MILLER et al., 2007).

O gene *CaNRTa* apresentou aumento significativo e gradativo na expressão relativa em raiz durante o período de supressão de N (Figura 2A). No

entanto, na folha foi observado um aumento no Dia 3 e um decréscimo de aproximadamente metade no décimo dia sem N (Figura 2A). A absorção de nitrato pode ser regulada, tanto a nível transcricional como modulada pós-transcricionalmente, através da interação dos genes *CHL1* (*Chlorate resistant 1*) (*NRT1.1*), *NRT1.2*, *NRT2.1*, *NRT2.2*, e *NRT2.4*. Estes transcritos são regulados pela presença de nitrato, nitrito, amônio, glutamina, deficiência de N, sacarose, luminosidade e pH (WANG et al., 2012).

A absorção de nitrato em raízes é controlada pelo status de N da planta. Em arroz, todas as isoformas da família NRT são expressas nas raízes, sendo *NRT2.1* e *NRT2.2* (HATs) induzidas por  $\text{NO}_3^-$  e as outras isoformas (*OsNRT2.3* e *OsNRT2.4*) constitutivas (ARAKI e HASEGAWA, 2006), ou induzidos (iHATS) por deficiência de N (LI et al., 2007; MILLER et al., 2007). O gene *NRT2.1*, em *Arabidopsis*, que codifica um transportador de alta afinidade, é o principal alvo deste mecanismo de sinalização (GIRIN et al., 2010). Em *A. thaliana* dois membros da família *NRT2*, *AtNRT2.1* e *AtNRT2.2*, são caracterizados por corresponderem ao sistema iHATS (KROUK et al., 2010). Com base no perfil transcricional observado, é provável que a isoforma *CaNRTa* seja um membro da família iHATS.

Na literatura, existem trabalhos que descrevem a função de outras famílias de transportadores de nitrato. *NRT1.5* é mediador da saída de nitrato a partir de células da raiz, sendo responsável por carregar o nitrato do xilema da raiz para as folhas através do transportador de nitrato (LIN et al., 2008). *AtNRT1.8* é responsável pela recuperação de nitrato pelo xilema (LI et al., 2010). *AtNRT1.7* está envolvido na remobilização de nitrato, mediada pelo floema das folhas mais velhas para as mais jovens (FAN et al., 2009). *AtNRT1.6* está envolvido no transporte de  $\text{NO}_3^-$  nos tecidos de embriões em desenvolvimento (ALMAGRO et al., 2008). No entanto, para determinação da função de *CaNRTa*, outros experimentos são necessários para verificar o comportamento desse gene espacial e temporalmente.

A absorção de  $\text{NH}_4^+$  e o transporte realizado pelas raízes são facilitados por membros da família AMT (LUDEWIG et al., 2007; YUAN et al., 2007). Os genes *AMT* já foram caracterizados em várias espécies de planta, tais como: *A. thaliana* (NINNEMANN et al., 1994; LOQUÉ et al., 2007, YUAN et al., 2007), *Nicotiana tabacum* (MATT et al., 2001), *Lotus japonicus* (SALVEMINI et al., 2001; SIMON-ROSIN et al., 2003), *Oryza sativa* (SUENAGA et al., 2003; SONODA et al., 2003), *Populus tremula* x *alba* (COUTURIER et al., 2007), *Citrus* (CAMAÑES et al.,

2007), *Solanum lycopersicon* (LUDEWIG et al., 2007; GRAFF et al., 2011). Existem seis genes homólogos de transportadores do tipo AMT/MEP em *A. thaliana*, onde quatro destes genes apresentam uma função aditiva e cooperativa, sendo que a afinidade por amônio das proteínas codificadas por estes genes é de acordo com a sua localização nas raízes (YUAN et al., 2007).

A análise por qPCR da atividade transcricional do gene *CaAMTd* no cafeeiro demonstrou que a expressão deste teve leve aumento após a supressão de N (Figura 2B). No tecido foliar, a expressão relativa apresentou um aumento gradual até o Dia 10. No entanto, em raiz a expressão foi fortemente inibida desde o Dia 1 (Figura 2B). LOQUÉ et al. (2007), relatam que isoformas *AMT1.1* e *AMT1.2* (alta afinidade) são expressas somente nas raízes, ao contrário do observado no cafeeiro, o que sugere que a isoforma denominada *CaAMTd*, pode ser um transportador de baixa afinidade (LATS – Low Affinity Transport System) na absorção de  $\text{NH}_4^+$ .

A via de assimilação do nitrato é um processo biológico essencial, por ser a principal rota pela qual o nitrogênio inorgânico é incorporado em compostos orgânicos (FALCÃO, 2006). A maior parte do nitrogênio é absorvida pelas plantas na forma de nitrato, que ao ser absorvido pelas raízes, pode ser reduzido ou armazenado nos vacúolos, ou translocado para a parte aérea, onde será reduzido ou armazenado nos vacúolos foliares (TAIZ & ZEIGER, 2009). Sabe-se que a expressão dos genes que codificam para nitrato redutase são reprimidos por formas de N reduzido (KLEIN et al., 2000). A nitrato redutase sofre um forte controle, tanto a nível transcricional, quanto pós- transcricional por fosforilação reversível e seguida de degradação (KAISER, 1999).

Em *Arabidopsis*, a indução da expressão dos genes que codificam para as enzimas Glutamina Sintetase (GS) e Nitrato Redutase (NR) foi observada após 20 min de exposição a nitrato (WANG et al., 2000). No cafeeiro em supressão de N, o gene NR apresentou aumento significativo dos transcritos em folha, após 24 h da supressão, decaindo em seguida (Figura 2C). Em raiz os níveis de transcritos durante a supressão de N foi menor quando comparado com a folha, sendo observado um ligeiro aumento no Dia 10 (Figura 2C). No entanto, Wang et al. (2000) afirmam que a expressão de transcritos para NR não é controlada apenas pela presença do nitrato, provavelmente outros fatores devem influenciar a sua modulação transcricional.

Em plantas de tabaco transgênicas, a indução da expressão da NR por nitrato foi observada apenas após o fornecimento de açúcares, mostrando que há influência destes sobre expressão da NR, porém, apenas quando os açúcares atingem níveis críticos (KLEIN et al., 2000).

O amônio é assimilado primariamente via glutamina sintase (GS)/ glutamato sintase (GOGAT), embora possam existir rotas alternativas em condições específicas (DUBOIS et al., 2003), existem dois tipos de GS nas plantas, GS1 (citosólica) e GS2 (plastídica) (ISHIYMA et al., 2004; BERNARD & HABASH, 2009). Neste trabalho, buscando um maior entendimento sobre a assimilação do N, foi realizado análise quantitativa (qPCR) para os gene *CaGSc* e *CaNR*. Durante o período de supressão de N, a expressão relativa do gene *CaGSc* foi induzida em raiz, sendo quatro vezes maior que o dia 0 nos dias 1 e 3 e aos 10 dias já era 12 vezes mais expresso do que antes da supressão (Figura 2D). Em plantas de arroz mantidas sem N por 48 (ZHAO et al., 2006) e 72 horas (BUCHER, 2007), foi observado o mesmo padrão de expressão para *OsGS1.1* e *OsGS1.2*. Nas raízes de arroz, foi observado que durante o tratamento sem N a expressão de *OsGS1.1* representa praticamente toda a expressão e atividade de GS nas raízes (BUCHER, 2007), similarmente ao observado na isoforma encontrada neste trabalho.

Com relação à expressão de *CaGSc* em folha de cafeeiro, houve significativa inibição da expressão a partir do dia 3 quando comparado com o dia 0 (Figura 2D). É importante ressaltar que o uso do N pelas plantas envolve várias etapas, incluindo captação, assimilação, translocação e diferentes formas de processos de reciclagem e remobilização, onde todos eles são de grande importância em termos de eficiência de utilização de N (GOOD et al., 2004; HIREL et al., 2007). No cafeeiro o gene *CaGSc* pode estar assimilando o N que foi remobilizado e reciclado durante o período de supressão de N pelas raízes, para poder disponibilizar para outros tecidos em desenvolvimento, tais como, folhas jovens. Estudos com diversas espécies mostraram que a GS1 é codificada por uma família multigênica (HIREL & LEA, 2002). As isoformas citosólicas de GS (*ECGs*), segundo Gupta et al. (2013), estão presentes em diferentes órgãos como raízes, caules e podem estar envolvidos na reciclagem de amônia durante algumas etapas do desenvolvimento, tais como senescência de folhas e na síntese de glutamina para transporte do floema. Especificamente, nas raízes, a isoforma (GS1) facilita a assimilação de amônio absorvida do solo ou fornecida a partir de fixação de N

simbiótico (GUPTA et al., 2013). Os genes *NR* e *GS*, além de serem regulados transcricionalmente devido há sinalização de nitrato, podem também ser regulados em nível de proteína/enzima. Além disso, o fator de transcrição Dof1 pode estar envolvido na modulação de *NR*, *GS* e *GOGAT*, e a expressão destes genes pode estar correlacionada com as diferentes concentrações de N na raiz (GUPTA et al., 2013).

Muitos desses estudos relacionados à *GS1* estão voltados para interesses agrônômicos para recursos de ganhos genéticos (revisado por BERNARDO & HABASH, 2009). Estudos têm mostrado que isoformas citosólicas de *GS* estão envolvidas na remobilização de N durante a senescência foliar e enfatizado um papel para esta enzima na produção de grãos, principalmente em plantas como arroz, milho e trigo (HIREL et al., 2001; TABUCHI et al., 2005; OBARA et al., 2001; SANTOS et al., 2007; SWARBRECK et al., 2011).

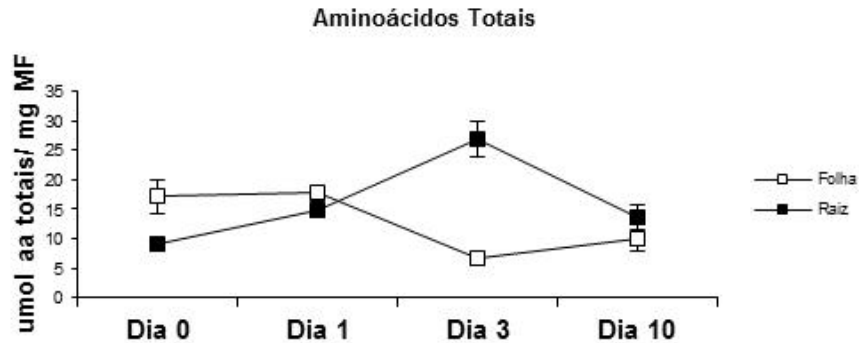
## 5.7 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS NO CAFEIEIRO EM CONDIÇÕES DE SUPRESSÃO DE N

### 5.7.1 Aminoácidos Totais

Os aminoácidos são importantes formas de transporte do N orgânico proveniente da redução e assimilação do  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  na maioria das espécies de vegetais e esse processo pode ocorrer nos tecidos foliares ou radiculares (KERBAUY, 2004). O armazenamento, remobilização e transporte dos aminoácidos permitem a reciclagem interna do N reduzido e a manutenção do metabolismo e crescimento da planta, mesmo quando o N do ambiente se torna limitante. Esse armazenamento e remobilização dependem fundamentalmente do transporte de aminoácidos (AMARANTE, 2002).

A concentração de aminoácidos totais em tecidos foliares e radiculares do cafeeiro foi influenciada pela supressão de N. O tecido radicular foi o que apresentou maior variação na concentração de aminoácidos, com incremento de quase 3 vezes, 3 dias após a supressão (Figura 3). Já nos tecidos foliares foi observado diminuição na concentração de aminoácidos a partir do dia 3, com perda de aproximadamente 50% da quantidade inicial (Figura 3).

**Figura 3** – Concentração de aminoácidos ( $\mu\text{mol}$  de aminoácidos totais/mg matéria fresca) em folha e raiz de cafeeiro, em condição de supressão de N. Após o Dia 0 a fonte de N ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) foi retirada até o término do experimento (Dia 10).



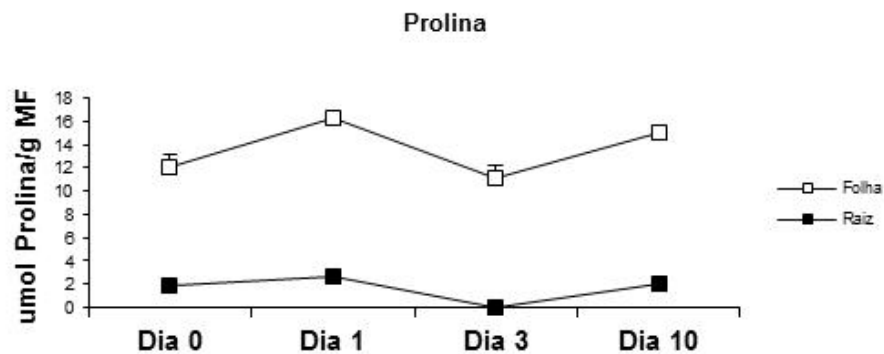
Esses resultados sugerem uma atividade do metabolismo do N diferenciada entre os dois tecidos, podendo atribuir o teor elevado de aminoácidos nas raízes à transferência do N assimilado nas folhas ao sistema radicular via floema.

### 5.7.2 Prolina

A prolina é um osmólito nitrogenoso conhecido por desempenhar papel importante na tolerância ao estresse em plantas, onde seus metabólitos podem impactar na utilização e remobilização de N foliar, especialmente sob deficiência de N (ALBERT et al., 2012). A prolina também pode servir como fonte de carbono, nitrogênio e energia quando é remobilizado ou oxidado durante a recuperação do estresse (TROTEL et al. 1996; SZABADOS; SAVOURÉ 2010).

Buscando entender o mecanismo fisiológico de plantas sob estresse de N, foi realizada a quantificação do teor de prolina livre em folha e raiz do cafeeiro (Figura 4).

**Figura 4** – Teor de prolina livre ( $\mu\text{mol Prolina/g MF}$ ) em folha e raiz do cafeeiro, em condição de supressão de N. Após o Dia 0 a fonte de N ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) foi retirada até o término do experimento (Dia 10).



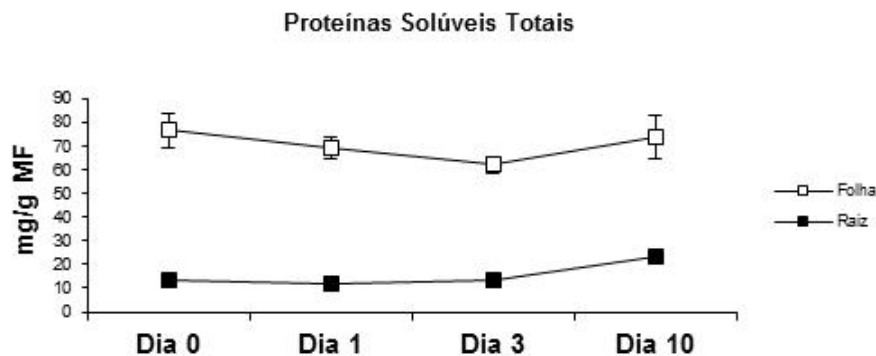
A quantidade de prolina livre em folhas sob supressão de N foi maior do que a observada em raízes, porém com o mesmo perfil em resposta ao tempo de tratamento (Figura 4). Em ambos os tecidos houve um aumento no Dia 1, decréscimo no terceiro dia e novamente aumento na concentração de prolina no Dia 10 (Figura 4).

A prolina está ligada ao metabolismo primário do glutamato-glutamina, que é de grande importância para a remobilização N durante a senescência foliar e induzida por fatores ambientais, tais como estresse hídrico (MOLINARI et al., 2004) e na eficiência do uso de N (ALBERT et al., 2012). Este aminoácido é sintetizado principalmente a partir de glutamato pela enzima  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato sintetase (EC 2.7.2.11; P5CS), ocorrendo uma ciclização a  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5C) pela P5C redutase (EC 1.5.1.2; P5CR) e convertido a glutamato pela o prolina-desidrogenase (PDH; EC 1.5.99.8) e P5C desidrogenase (EC 1.5.1.12; P5CDH) (SZÉKELY et al., 2008). O acúmulo de prolina observada nas folhas do cafeeiro (Figura 4) em resposta a supressão de N, pode estar desempenhando um importante papel adaptativo na tolerância a esse tipo de estresse. Podemos propor que o baixo acúmulo encontrado nas raízes (Figura 4), pode estar relacionado com a remobilização de N para a parte aérea, evitando danos nas folhas.

### 5.7.3 Proteínas Solúveis Totais

A concentração de proteínas solúveis totais no experimento de supressão de N em café foi maior em folha do que em raiz (Figura 5). Nas folhas, a concentração no dia 0 foi em torno de 78  $\mu\text{mol/g}$  MF, observando uma queda no conteúdo de proteínas solúveis totais até o terceiro dia sem N, com 60  $\mu\text{mol/g}$  MF (Figura 5). Na raiz, o conteúdo de proteínas solúveis totais teve um aumento a partir do dia 3, variando entre 12  $\mu\text{mol/g}$  MF no dia 0 a 20  $\mu\text{mol/g}$  MF no décimo dia sem N (Figura 5).

**Figura 5** – Conteúdo de proteínas solúveis totais ( $\mu\text{mol/g}$  MF) em folha e raiz do cafeeiro, em condição de supressão de N. Após o Dia 0 a fonte de N ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) foi retirada até o término do experimento (Dia 10) das plantas cultivadas em solução nutritiva.



As proteínas não têm somente uma função estrutural, mas frequentemente são enzimas e, assim, responsáveis por reações bioquímicas. Aquelas que se estendem através das membranas formam canais entre as duas faces (interna e externa), o que pode ser importante para a passagem de partículas hidrofílicas, como moléculas de água e íons inorgânicos (FAQUIN, 2005). O N é facilmente redistribuído nas plantas via floema, na forma de aminoácidos. Quando o suprimento de N pelo meio é insuficiente, o N das folhas velhas é remobilizado para outros órgãos e folhas novas (FAQUIN, 2005). No experimento realizado neste trabalho, a baixa disponibilidade de N pode ter ocasionado a proteólise foliar, sendo observada uma queda nos aminoácidos totais (Figura 3) e proteínas totais durante os dias 1 e 3 (Figura 5), possivelmente resultando no colapso dos cloroplastos e decréscimo no conteúdo de clorofila. Reis (2007) relata que o teor de proteínas

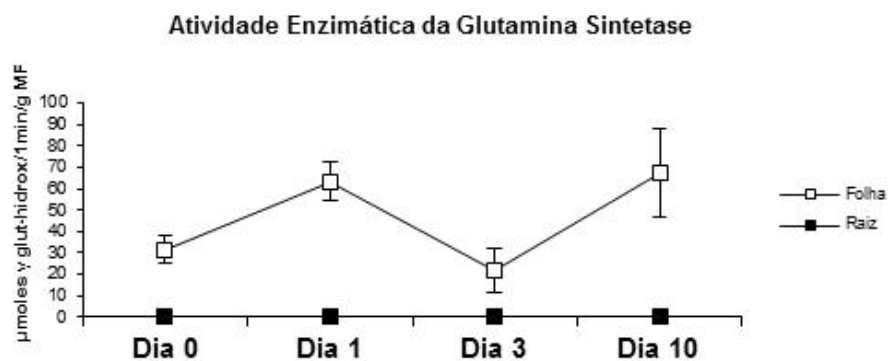
totais foliar diminui conforme a maturação dos frutos e apresentam alta correlação com a produtividade. Normalmente, plantas com deficiência de N, apresentam baixo teor de proteínas nos cloroplastos e rápida degradação (REIS, 2007), onde a perda de estruturas de membranas está associada com o baixo teor protéico (LAWLOR et al., 2001).

#### 5.7.4 Atividade Enzimática da Glutamina Sintetase (GS)

A glutamina sintetase (GS) é uma enzima responsável pela assimilação de  $\text{NH}_4^+$ , catalisando a reação entre este íon e glutamato formando glutamina, com gasto de ATP (SOUZA; FERNANDES, 2006).

De acordo com os resultados obtidos, foi demonstrado que a atividade de GS foi maior em folha e praticamente nula na raiz do cafeeiro (Figura 6).

**Figura 6** – Atividade de Glutamina Sintetase em folha e raiz do cafeeiro, em condição de supressão de N. Após o Dia 0 a fonte de N ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) foi retirada até o término do experimento (Dia 10) das plantas cultivadas em solução nutritiva.



Foi observada grande variação na atividade de GS no tecido foliar entre os tratamentos, de 30  $\mu\text{moles } \gamma\text{-glut-hidroxi/1min/g MF}$  no Dia 0 e 65  $\mu\text{moles } \gamma\text{-glut-hidroxi/1min/g MF}$  no décimo dia sem N (Figura 6). A flutuação da atividade da GS pode ser explicada pela sua dependência da quantidade de luz e da própria atividade da nitrato redutase (TJADEN et al., 1995). O aumento da atividade de GS no cafeeiro, neste caso, nas folhas, pode estar ocorrendo pela indução pelo  $\text{NH}_4^+$  resultante da redução do nitrato.

Durante a assimilação do N ocorre a redução do nitrato a amônio e a incorporação do amônio em aminoácidos. A quantidade de N assimilado pelas plantas depende da atividade das enzimas envolvidas no ciclo do N e também da disponibilidade de energia necessária para os processos de assimilação (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000).

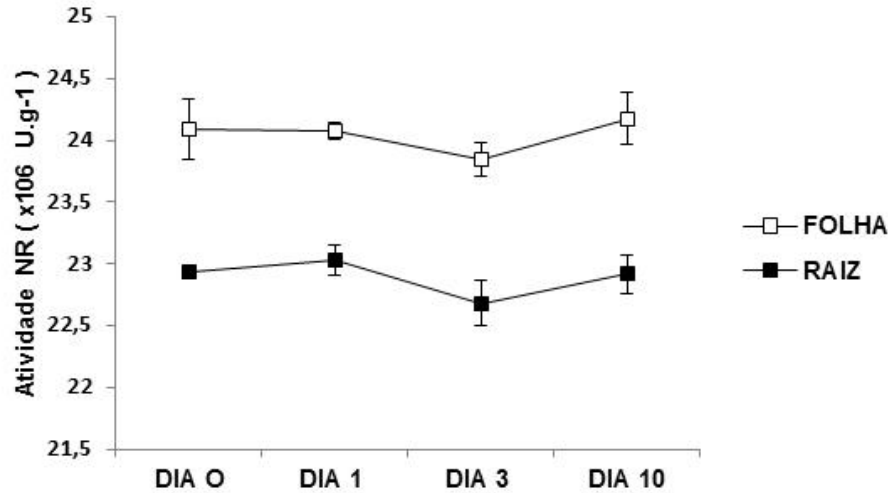
A variação observada na atividade da GS no cafeeiro (Figura 6) pode ser atribuída à diminuição da GS2, assim como de outras proteínas cloroplásticas/foliares, que podem ter sofrido hidrólise no período de supressão de N. A maior atividade de GS em baixo suprimento N indica que está ocorrendo produção de  $\text{NH}_4^+$ , que pode ser devido à maior ANR nas raízes do cafeeiro Arábica e a maior atividade de GS ajudaria a manter baixa concentração de amônio na célula evitando seus efeitos tóxicos (LOTHIER et al., 2011).

#### 5.7.5 Atividade da Nitrato Redutase (ANR)

No processo de redução e assimilação do nitrato pelas plantas, a nitrato redutase (NR, EC 1.6.6.1) é a primeira e mais importante enzima deste processo. Sua atividade depende, principalmente, da luz e do contínuo suprimento de nitrato, através do xilema (KAWACHI et al., 2002). Existem evidências sugerindo que a nitrato redutase é a principal enzima que limita a assimilação do nitrogênio em muitas plantas (LEA et al., 1997), e que é regulada em nível de transcrição ou pós-tradução, tornando-se um marcador potencial do nível de N interno na planta, por refletir o regime de N a ela imposto (GENENGER et al., 2003). Sua atividade pode ocorrer no citoplasma tanto de raiz como de folhas (SOUZA; FERNANDES, 2006).

A determinação da atividade da ANR no tecido foliar de cafeeiros submetidos à supressão de N demonstrou que houve uma leve queda na atividade entre os dias 0 e 3 (Figura 7). Na raiz, a atividade da ANR observada foi menor em comparação com o tecido foliar, porém com o mesmo perfil de queda da atividade da NR aos 3 dias, com recuperação aos 10 dias (Figura 7).

**Figura 7** – Atividade da Nitrato Redutase (ANR) em folha e raiz do cafeeiro, em condição de supressão de N. Após o Dia 0 a fonte de N ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) foi retirada até o término do experimento (Dia 10) das plantas cultivadas em solução nutritiva.



A ANR é influenciada por vários fatores, como luz, nitrato, glutamina e açúcares (STITT et al., 2002). O cafeeiro apresenta alto potencial de assimilação do nitrato nas folhas, bem como nas raízes (CARELLI et al., 2006). No entanto, existem muitas controvérsias sobre este assunto na literatura. Alguns trabalhos demonstraram que a maior ANR ocorre no tecido foliar (CARELLI et al., 1990a; DaMATTA et al, 1999; AMARAL et al, 2001), e outros nas raízes (CARELLI & FAHL, 1991, QUEIROZ et al., 1991, 1993a). Através da disponibilidade de nitrato, raízes de cafeeiros apresentaram alta capacidade de exportar nitrato para a parte aérea. Depois de suplementar plantas com  $15 \text{ mol.m}^{-3} \text{ NO}_3^-$  que estavam com deficiência de N, ambos, folhas e raízes acumularam níveis similares de nitrato ao mesmo tempo, onde a ANR foi rapidamente induzida nas raízes e folhas de maneira similar (CARELLI & FAHL, 2006). Estudando a ANR durante ciclo diário, Queiroz et al. (1993) e Andrade Netto (2005), observaram que a atividade da enzima decresceu durante o período luminoso, posteriormente aumentou nas primeiras horas do escuro e estabilizou a noite. A ANR neste trabalho foi maior nas folhas que nas raízes (Figura 7). Esses dados junto com os outros já citados, indicam que a ANR é bastante variável e que vários fatores devem ser considerados, tais como, espécie vegetal, tecido e idade da planta, metodologia adotada para a quantificação de NR (*in vitro* ou *in vivo*), variação ambiental, parâmetros fisiológicos e genéticos da planta. A maior ANR nas folhas do cafeeiro submetidas à supressão de N sugere a

ocorrência de maior influxo de  $\text{NO}_3^-$  nessa condição. É importante ter cautela durante a avaliação, pois a ANR pode não refletir a taxa de redução real de nitrato. Shi et al. (2010) determinaram a atividade *in vitro* apenas na presença de NADH, o que pode alterar o resultado, pois a NR pode ser modulada pelos níveis de NADH e a relação NADH/NAD endógena (NUNES-NESI et al., 2010). Segundo Gallais & Hirel (2004), alta ANR e eficiência na redução de N pode ser um indicativo de genótipos menos eficientes no uso de N. É importante ressaltar, que neste trabalho a avaliação da ANR foi realizada em um único cultivar de café.

## 5.8 CONCLUSÃO

Neste trabalho genes relacionados a absorção de nitrogênio, pertencentes a família NRT - *CaNRTa*; AMT - *CaAMTd*; e genes envolvidos na assimilação de N, *CaNR* e *CaGSc* tiveram o perfil transcricional caracterizado em condição de supressão de N. Os dados obtidos demonstram que esses genes apresentam padrões de modulação transcricional diferentes com relação à absorção e assimilação de N. Essas divergências encontradas variam conforme a classificação da família a qual o gene pertence e de acordo com as características designadas aos mesmos.

Atividade de NR entre folha e raiz não apresentaram variação significativa em resposta à supressão de N. O gene que codifica para nitrato redutase foi mais expresso em folha, embora em raiz tenha sido observado aumento nos transcritos no décimo dia sem N. Possivelmente o cafeeiro adotou a estratégia em acumular nitrato nas raízes para posteriormente remobilizá-lo para novos tecidos em desenvolvimento em período de déficit de N.

O cafeeiro apresentou diferenças na atividade da GS entre os tecidos analisados (folha e raiz), observando uma maior expressão relativa da isoforma denominada *CaGSc* no décimo dia sem N em raiz. Isto é um indicativo da necessidade de compreender os processos bioquímicos e fisiológicos relacionados ao uso do N e buscar o entendimento sobre os papéis desempenhados pelas enzimas envolvidas na absorção e remobilização do N durante o desenvolvimento do cafeeiro.

## 5.9 REFERÊNCIAS

- ALBERT, B.; CAHÉREC, F.; NIOGRET, M.; FAES, P.; AVICE, J. C.; LEPORT, L.; BOUCHEREAU, A. Nitrogen availability impacts oilseed rape (*Brassica napus* L.) plant water status and proline production efficiency under water-limited conditions. **Planta**, v. 236 (2):659–76, 2012.
- ALMAGRO, A.; LIN, S.; TSAY, Y. Characterization of the Arabidopsis nitrate transporter NRT1.6 reveals a role of nitrate in early embryo development. **The Plant Cell**, v. 20, p. 3289–3299, 2008.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J., ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389–3402, 1997.
- AMARANTE, L. Transporte e metabolismo de glutamina em soja (*Glycine max* L.): uma relação estreita com a fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico. **Tese** (Doutorado em Biologia Vegetal) – Curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 173 p. 2002.
- ANDRADE NETTO, J. F. Atividade das enzimas redutase do nitrato e glutamina sintetase em cafeeiro arábica. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2005.
- ARAKI, R. & HASEGAWA, H. Expression of Rice (*Oryza sativa* L.) Genes Involved in High-Affinity Nitrate Transport during the Period of Nitrate Induction. **Breeding Science**, v. 56, p. 295–302, 2006.
- BATES, L.S.; WALDRAN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant Soil**, v. 39, p. 205–208, 1973.
- BAUER, D.; BIEHLER, K.; FOCK, H.; CARRAYOL, E.; HIREL, B.; MIGG, A.; BECKER, T. A role for cytosolic glutamine synthetase in the remobilisation of leaf nitrogen during water stress in tomato. **Plant Physiology**, v. 99: p. 241–248, 1997.
- BERNARD, S. M.; HABASH, D. Z. The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. **New Phytologist**, v.182, p. 608–620, 2009.
- BRADFORD, 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, p. 248–254, 1976.
- BREDEMIER, C.; MUNDSTOCK, C. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, v. 30, p. 365–372, 2000.
- BUCHER, C. A. Avaliação através de RT-PCR da expressão dos genes que codificam para enzimas de assimilação de nitrogênio em variedades de arroz. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J. and WITTEWER, C.T. The MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, p. 611–622, 2009.

CAMAÑES, G.; CERESO, M.; PRIMO-MILLO, E.; GOJON, A.; GARCIA-AGUSTIN, P. Ammonium transport and *CitAMT1* expression are regulated by light and sucrose in Citrus plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 2811–2825, 2007.

CARELLI, M. L. C. et al. Atividade da redutase de nitrato em folhas e raízes de plantas de café (*Coffea arabica* L.). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.13, p.119–123, 1990.

CARELLI, M. L. C.; FAHL, J. I.; RAMALHO, J. D. C. Aspects of nitrogen metabolism in coffee plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 9–21, 2006.

CARELLI, M. L. C.; FAHL, J. I. Distribuição da assimilação do nitrato e da matéria seca em plantas jovens de café cultivadas em diferentes níveis de nitrogênio. **Bragantia**, Campinas, v. 50, p. 29–37, 1991.

CARVALHO, K.; BESPALHOK FILHO, J. C.; DOS SANTOS, T. B.; SOUZA, S. G. H.; VIEIRA, L. G. E.; PEREIRA, L. F. P.; DOMINGUES, D. S. Nitrogen Starvation, Salt and Heat Stress in Coffee (*Coffea arabica* L.): Identification and Validation of New Genes for qPCR Normalization. **Molecular Biotechnology**, *on line*, 2012.

CHANG, S.; PURYEAR J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology**, v.11, p.113–116, 1993.

CHAPMAN, D. J.; HARRISON, P. J. Nitrogen metabolism and measurement of nitrate reductase activity. *In* Experimental phycology. A laboratory manual (C.S. Lobban, D.J. Chapman & B. Kremer, eds.). Cambridge University Press, Cambridge, p.196–202, 1988.

CORUZZI, G. M. Primary N-assimilation into amino acids in Arabidopsis. *In*: SOMERVILLE, C.R.; MEYERAWITZ, E.M. The Arabidopsis book. Rockville: **American Society of Plant Biologists**, p.1–17, 2003.

COUTURIER, J.; MONTANINI, B.; MARTIN, F.; BRUN, A.; BLAUDEZ, D.; CHALOT, M. The expanded family of ammonium transporters in the perennial poplar plant. **New Phytologist**, v. 174, p. 137–50, 2007.

CRAWFORD, N. M.; FORDE, B. G. Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. *In* E Meyerowitz, C Somerville, eds, The Arabidopsis Book. **American Society of Plant Biologists**, Rockville, MD,. 2002.

D'APUZZO, E.; ROGATO, A.; SIMON-ROSIN, U.; EL ALAOUI, H.; BARBULOVA, A.; BETTI, M.; DIMOU, M.; KATINAKIS, P.; MARQUEZ, A.; MARINI, A. M, UDVARDI, M. K.; CHIURAZZI, M. Characterization of three functional high affinity ammonium transporters in *Lotus japonicus* with differential transcriptional regulation and spatial expression. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1763–1774, 2004.

- DaMATTA, F. M.; Ronchi, C. P.; Maestri, M.; Barro, R. S. Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 04, p. 485–510, 2007.
- DaMATTA, F. M.; AMARAL, J. A. T.; RENA, A. B. Growth periodicity in trees of *Coffea arabica* L. in relation to nitrogen supply and nitrate reductase activity. **Field Crops Research**, v. 60, p. 223–229, 1999.
- DECHORGNAT, J.; NGUYEN, C. T.; ARMENGAUD, P.; JOSSIER, M.; DIATLOFF, E.; FILLEUR, S.; DANIEL-VEDELE, F. From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 1349–1359, 2011.
- DUBOIS, F.; TERCÉ-LAFORGUE, T.; GONZALEZ-MORO, M. B.; ESTAVILLO, M. B.; SANGWAN, R.; GALLAIS, A.; HIREL, B. Glutamate dehydrogenase in plants; is there a new story for an old enzyme? **Plant Physiology Biochemistry**, v. 41, p. 565–576, 2003.
- EPSTEIN, E & BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Londrina: Editora Planta, 403p. 2006.
- FAN, S. C.; LIN, C.-S.; HSEU, P. K.; LIN, S. H.; TSAY, Y. F. The Arabidopsis nitrate transporter NRT1.7, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate. **The Plant Cell**, v. 21(9), p. 2750–2761, 2009.
- FAQUIN, V. **Nutrição Mineral de Plantas**. Lavras: UFLA – FAEPE, 2005. p. 183.
- FU, J.; SAMPALO, R.; GALLARDO, F.; CÁNOVAS, F. M.; KIRBY, E. G. Assembly of a cytosolic pine glutamine synthetase holoenzyme in leaves of transgenic poplar leads to enhanced vegetative growth in young plants. **Plant Cell and Environment**, v. 26, n.3, p. 411–418, 2003.
- GALLAIS, A.; HIREL, B. An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize. **Journal of Experimental Botany**, v.396, p. 295–306, 2004.
- GAZZARRINI, S.; LEJAY, L.; GOJON, A.; NINNEMANN, O.; FROMMER, W. B.; vonWIRÉN, N. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation induced uptake of ammonium into Arabidopsis roots. **Plant Cell**, v. 11, p. 937–947, 1999.
- GENENGER, M. et al. The effects of fertilizer or wood ash on nitrate reductase activity in Norway spruce fine roots. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 175, n.1- 3, p. 413–426, 2003.
- GIRIN, T.; EL-KAFABI, E. S.; WIDIEZ, T.; ERBAN, A.; HUBBERTEN, H.M.; KOPKA, J.; HOEFGEN, R.; GOJON, A.; LEPETIT, M. Identification of Arabidopsis mutants impaired in the systemic regulation of root nitrate uptake by the nitrogen status of the plant. **Plant Physiology**, v. 153, p. 1250–1260, 2010.
- GOOD, A. G.; SHRAWAT, A. K.; MUENCH, D. G. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? **Trends in Plant Science**, v. 9 n. 12, p. 598–605, 2004.

GRAFF, L.; OBRDLIK, P.; YUAN, L.; LÓQUE, D.; FROMMER, W. B.; von WIRÉN, N. N-terminal cysteines affect oligomer stability of the allosterically regulated ammonium transporter *LeAMT1;1*. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 1361–1373, 2011.

GUPTA, A. K.; GAUR, V. S.; GUPTA, S.; KUMAR, A. Nitrate signals determine the sensing of nitrogen through differential expression of genes involved in nitrogen uptake and assimilation in finger millet. **Functional & Integrative Genomics**, on line, 2013.

GUTIERREZ, L.; MAURIAT, M.; PELLOUX, J.; BELLINI, C.; WUYTSWINKEL, O. Towards a systematic validation of references in Real-Time RT-PCR. **The Plant Cell**, v. 20, p. 1734–1735, 2008.

HIREL, B.; BERTIN, P.; QUILLERÉ, I.; BOURDONCLE, W.; ATTAGNANT, C.; DELLAY, C.; GOUY, A.; CADIOU, S.; RETAILLIAU, C.; FALQUE, M.; GALLAIS, A. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. **Plant Physiology**, v. 125, p. 1258–1270, 2001.

HIREL, B.; LEA, P. J. Photosynthetic nitrogen assimilation and associated carbon and respiratory metabolism. In: FOYER, C. H.; NOCTOR, G. (Org.). *The biochemistry, molecular biology and genetic manipulation of primary ammonia assimilation*, Netherlands, Kluwer Academic, p. 71–92, 2002.

HIREL, B.; LEGOUIS, J.; NEY, B.; GALLAIS, A. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 2369–2387, 2007.

HIROSE, N.; TAKEI, K.; KUROHA, T.; KAMADA-NOBUSADA, T.; HAYASHI, H.; SAKAKIBARA, H. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 75–83, 2008.

HO, C. H.; LIN, S. H.; HU, H. C.; TSAY, Y. F. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. **Cell**, v. 138, p. 1184–1194, 2009.

ISHIYAMA, K.; INOUE, E.; TABUCHI, M.; YAMAYA, T.; TAKOSASHI, H. Biochemical backgrounds of compartmentalized functions of cytosolic glutamine synthetase for active ammonium assimilation in rice roots. **Plant Cell Physiology**, v. 45, p. 1640–1647, 2004.

ISHIYAMA, K.; INOUE, E.; WATANABE-TAKAHASHI, A.; OBARA, M.; YAMAYA, T.; TAKAHASHI, H. Kinetic properties and ammonium-dependent regulation of cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 16598–16605, 2004.

KAISER, W. M.; WEINER, H.; HUBER, S. C. Nitrate reductase in higher plants: A case study for transduction of environmental stimuli into control of catalytic activity. **Physiologia Plantarum**, v. 105, p. 385–390, 1999.

KAISER, W. M.; KANDBINDER, A.; STOIMENOVA, M.; GLAAB, J. Discrepancy between nitrate reduction rates in intact leaves and nitrate reductase activity in leaf extracts: what limits nitrate reduction in situ? **Planta**, v. 210, p. 801–807, 2000.

KANT, K.; BI, Y. M.; ROTHSTEIN, S. J. Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 4, p. 1499–1509, 2011.

KAWACHI, T. Y.; SHOJI, Y.; SUGIMOTO, T.; OJI, Y.; KLEINHOF, A.; WARNER, R. L.; OHTAKE, N.; OHYAMA, T.; SUEYOSHI, K. Role of xylem sap nitrate in regulation of nitrate reductase gene expression in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 48, n. 1, p. 79–85, 2002.

KERBAUY, G. B. Fisiologia vegetal. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004. 452 p.  
LIMA, M. C. Influência de níveis de sombreamento sobre o crescimento, produção de pigmentos fotossintéticos e assimilação de nitrogênio em mil folhas (*Achillea millefolium* L.). 2009. 83 p. **Dissertação** (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

KLEIN, D.; MORCUENDE, R.; STITT, M.; KRAPP, A. Regulation of nitrate reductase expression in leaves by nitrate and nitrogen metabolism is completely overridden when sugars fall below a critical level. **Plant Cell and Environment**, v. 23, p. 863–871, 2000.

KRAISER, T.; GRAS, D. E.; GUTIÉRREZ, A. G.; GONZÁLEZ, B.; GUTIÉRREZ, R. A. A holistic view of nitrogen acquisition in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 4, p. 1455–1466, 2011.

KROUK, G.; CRAWFORD, N. M.; CORUZZI, G. M.; TSAY, Y. F. Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, p. 266–273, 2010.

KUSANO, M.; FUKUSHIMA, A.; REDESTIG, H.; SAITO, K. Metabolomic approaches toward understanding nitrogen metabolism in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 1439–1453, 2011.

LAUTER, F.R.; NINNEMANN, O.; BUCHER, M.; RIESMEIER, J.W.; FROMMER, W. B. Preferential expression of an ammonium transporter and two putative nitrate transporters in root hairs of tomato. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 8139–8144, 1996.

LEA, P. J. Primary nitrogen metabolism. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Ed.). **Plant biochemistry**, New York: Academic Press, p. 273–313, 1997.

LI, J. Y.; FU, Y. L.; PIKE, S. M.; BAO, J.; TIAN, W.; ZHANG, Y.; CHEN, C. Z.; ZHANG, Y.; LI, H. M. HUANG, J.; LI, L. G.; SCHROEDER, J. I.; GASSMANN, W.; GONG, J. M. The arabidopsis nitrate transporter NRT1.8 functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance. **The Plant Cell**, v. 22(5), p. 1633–1646, 2010.

LI, W.; WANG, Y.; OKAMOTO, M.; CRAWFORD, N. M.; SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D.M. Dissection of the AtNRT2.1:AtNRT2.2 inducible high affinity nitrate transporter gene cluster. **Plant Physiology**, v.143, p. 425–433, 2007.

LIMA, J. E.; KOJIMA, S.; TAKAHASHI, H.; VON WIRÉN, N. Ammonium triggers lateral root branching in arabidopsis in an AMMONIUM TRANSPORTER1;3-dependent manner. **The Plant Cell**, v. 22(11), p. 3621–3633, 2010.

LIN, S. H.; KUO, H. F.; CANIVENC, G.; LIN, C. S.; LEPETIT, M.; HSU, P. K.; TILLARD, P.; LIN, H. L.; WANG, Y. Y.; TSAI, C. B.; GOJON, A.; TSAY, Y. F. Mutation of the Arabidopsis NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. **The Plant Cell**, v. 20, p. 2514–2528, 2008.

LOQUÉ, D.; von WIRÉN, N. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 1293–1305, 2004.

LOQUÉ, D.; LALONDE, S.; LOOGER, L. L.; von WIRÉN, N.; FROMMER, W. B. A cytosolic trans-activation domain essential for ammonium uptake. **Nature**, v. 446, p. 195–198, 2007.

LOTHIER, J.; GAUFICHON, L.; SORMANI, R.; LEMAÎTRE, T.; AZZOPARDI, M.; MORIN, H.; CHARDON, F.; REISDORF-CREN, M.; AVICE, J. C.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. The cytosolic glutamine synthetase GLN1;2 plays a role in the control of plant growth and ammonium homeostasis in *Arabidopsis* rosettes when nitrate supply is not limiting. **Journal of Experimental Botany**, v.62, p. 1375–1390, 2011.

LUDEWIG, U.; NEUHÄUSER, B.; DYNOWSKI, M. Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants. **FEBS Letters**, v. 581, p. 2301–2308, 2007.

LUDEWIG, U.; von WIRÉN, N.; FROMMER, W. B. Uniport of  $\text{NH}_4^+$  by the root hair plasma membrane ammonium transporter *LeAMT1;1*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 13548–13555, 2002.

MACDUFF, J. H.; JACKSON, S.B. Influx and efflux of nitrate and ammonium in Italian ryegrass and white clover roots: comparisons between effects of darkness and defoliation. **Journal of Experimental Botany**, 43, 525–535, 1992.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. Piracicaba: POTAFOS, 319 p., 1997.

MARINI, A. M.; VISSERS, S.; URRESTARAZU, A.; ANDREÁ, B. Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO Journal**, v. 13, p. 3456–3463, 1994.

MARRACCINI, P.; DaMATTÀ, F. M.; VIEIRA, L. G. E.; VINECKY, F.; ELBELT, S.; VIEIRA, N. G.; CARNEIRO, F. A.; SILVA, V. A.; ANDRADE, A. C.; ALEKCEVETCH, J. C.; POT, D.; DA SILVA, F. R.; RAMOS, H. J. O.; SUJII, P. S.; ALVES, G. S. C.; FERRAO, M. A. G.; LEROY, T. Differentially expressed genes and proteins upon drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p.103, 2012.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; DANIEL-VEDELE, F.; DECHORGNAT, J.; CHARDON, F.; GAUFICHON, L.; SUZUKI, A. Nitrogen uptake, assimilation and

remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. **Annals of Botany**, v. 105(7), p. 1141–57, 2010.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; VALADIER, M. H.; CARRAYOL, E.; REISDORF-CREN, M.; HIREI, B. Diurnal changes in the expression of glutamate dehydrogenase and nitrate reductase are involved in the C/N balance of tobacco source leaves. **Plant Cell and Environment**, v. 25, p. 1451–1462, 2002.

MATT, P.; SCHURR, U.; KLEIN, D.; KRAPP, A.; STITT, M. Growth of tobacco in short-day conditions leads to high starch, low sugars, altered diurnal changes in the *Nia* transcript and low nitrate reductase activity, and inhibition of amino acid synthesis. **Planta**, v. 207, p. 27–41, 1998.

MILLER, A. J.; FAN, X.; ORSEL, M.; STITH, S. J.; WELLS, D. M. Nitrate transport and signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 9, p. 2297–2306, 2007.

MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; BESPALHOK J. C.; KOBAYASHI, A. K.; PILEGGI, M.; PEREIRA, F. P. P.; VIEIRA, L. G. E. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**, v.167, p. 1375–1381, 2004.

MONDEGO, J. M. C.; VIDAL, R. O.; CARAZZOLLE, M. F.; TOKUDA, E. K.; PARIZZI, L. P.; COSTA, G. G. L.; PEREIRA, L. F. P.; ANDRADE, A. C.; COLOMBO, C. A.; VIEIRA, L. G. E.; PEREIRA, G. A. G. Brazilian Coffee Genome Project Consortium. An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. **BMC Plant Biology**, v. 11, p. 30, 2011.

NINNEMANN, O.; JAUNIAUX, J. C.; FROOMER, W. B. Identification of a high-affinity transporter from plants. **EMBO Journal**, 13: p. 3463–3471, 1994.

NUNES-NESE, A.; FERNIE, A. R.; STITT, M. Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. **Molecular Plant**, v.3, n. 6, p. 973–996. 2010.

OBARA, M.; KAJIURA, M.; FUKUTA, Y.; YANO, M.; HAYASHI, M., YAMAYA T, SATO, T. Mapping of QTLs associated with cytosolic glutamine synthetase and NADHglutamate synthase in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 1209–1217, 2001.

OKAMOTO, M.; KUMAR, A.; LI, W.; WANG, Y, SIDDIQI, M.Y, CRAWFORD, N.M, GLASS, A.D.M. High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis* depends on expression of the *NAR2*-like gene. *AtNRT3.1*. **Plant Physiology**, v. 140, p. 1036–1046, 2006.

OKAMOTO, M.; VIDMAR, J. J.; GLASS, A. D. Regulation of *NRT1* and *NRT2* gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. **Plant Cell Physiology**, v.44, p. 304–317, 2003.

OLIVEIRA, I. C.; BREARS, T.; KNIGHT, T. J.; CLARK, A.; CORUZZI, G. M. Overexpression of cytosolic Glutamine Synthetase: relation to nitrogen, light, and photorespiration. **Plant Physiology**, v.129, p. 1–11, 2002.

ORSEL, M.; CHOPIN, F.; LELEU, O.; SMITH, S. J.; KRAPP, A.; DANIEL-VEDELE, F.; MILLER, A. J. Characterization of a two component high affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis*; physiology and protein–protein interaction. **Plant Physiology**, v.142, p. 1304–1317, 2006.

PRAXEDES, S. C.; DAMATTA, F. M.; LOUREIRO, M. E.; FERRÃO, M. A. G.; CORDEIRO, A. T. Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *kouillou*) leaves. **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, p. 263–273, 2006.

QUEIROZ, C. G. S. et al. Efeito do cloranfenicol, n-propanol, pH e temperatura sobre a atividade in vivo da redutase do nitrato em cafeeiros jovens. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.14, p.73-77, 1991.

QUEIROZ, C.G.S. et al. Ritmo diurno na atividade da redutase de nitrato em folhas e raízes de *Coffea arabica* L. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 28, p. 787–795, 1993.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H.; MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, p. 62–66, 2003.

ROSSA, M.M. A luz como fator de regulação da atividade enzimática da nitrato redutase (NR) e superóxido dismutase (SOD) em *Gracilariaopsis tenuifrons* (Rhodophyta). **Dissertação de mestrado**, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1999.

SALVEMINI, F.; MARINI, A.; RICCIO, A.; PATRIARCA, E. J.; CHIURAZZI, M. Functional characterization of an ammonium transporter gene from *Lotus japonicus*. **Gene**, v. 270, p. 237–243, 2001.

SANTOS, A. M. S.; STARK, E. M. L. M.; FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. Effects of seasonal nitrate flush on nitrogen metabolism and soluble fractions accumulation in two rice varieties. **Journal of Plant Nutrition**, v. 30, p. 1371–1384, 2007.

SCHEIBLE, W. R.; MORCUENDE, R.; CZECHOWSKI, T.; FRITZ, C.; OSUNA, D.; PALACIOS-ROJAS, N.; SCHINDELASCH, D.; THIMM, O.; UDVARDI, M. K.; STITT, M. Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. **Plant Physiology**, v. 136, p. 2483–2499, 2004.

SHI, W. M.; XU, W. F.; LI, S. M.; ZHAO, X. Q.; DONG, G. Q. Responses of two rice cultivars differing in seedling-stage nitrogen use to growth under low-nitrogen conditions. **Plant and Soil**, v. 326, p.291–302, 2010.

SIMON-ROSIN, U.; WOOD, C.; UDVARDI, M. K. Molecular and cellular characterization of *LjAMT2;1*, an ammonium transporter from the model legume *Lotus japonicus*. **Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 99–108, 2003.

- SONODA, Y.; IKEDA, A.; SAIKI, S.; von WIRÉN, N.; YAMAYA, T.; YAMAGUCHI, J. Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (*OsAMT1;1-1;3*) in rice. **Plant Cell Physiology**, v. 44, p.726–734, 2003.
- SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Nitrogen-acquisition by plants in a sustainable environment. In: Singh, R.P. & Jaiwal, P.K. (eds.) Biotechnological approaches to improve nitrogen use efficiency in plants, Studium Press, LLC, Houston, Texas, USA, p. 41–62, 2006.
- STITT, M.; MULLER, C.; MATT, P.; GIBON, Y.; CARILLO, P.; MORCUENDE, R.; SCHEIBLE, W.R.; KRAPP, A.. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 959–970, 2002.
- SUENAGA, A.; MORIYA, K.; SONODA, Y.; IKEDA, A.; von WIRÉN, N.; HAYAKAWA, T.; YAMAGUCHI, J.; YAMAYA, T. Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter *OsAMT2* in rice plants. **Plant Cell Physiology**, v. 44, p. 206–211, 2003.
- SWARBRECK, S. M.; LINDQUIST, E. A.; ACKERLY, D. D.; ANDERSEN, G. L. Analysis of leaf and root transcriptomes of soil-grown *Avena barbata* plants. **Plant Cell Physiology**, v. 52, p. 317–332, 2011.
- TABUCHI, M.; SUGIYAMA, K.; ISHIYAMA, K.; INOUE, E.; SATO, T.; TAKAHASHI, H.; YAMAYA, T. Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking *OsGS1;1*, a cytosolic glutamine synthetase1;1. **The Plant Journal**, v. 42, p.641–651, 2005.
- TAIZ, L & ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- TJADEN, G.; EDWARDS, J.W.; CORUZZI, G.M. *cis* elements and *trans*-acting factors affecting regulation of a non-photosynthetic light-regulated gene for chloroplast glutamine synthetase. **Plant Physiology**, v. 108, p.1109–1117, **Trends in Plant Science**, v. 15, p. 89–97, 1995.
- TROTEL, P.; A. BOUCHEREAU, M. F. NIOGRET, F.; LARHER. The fate of osmo-accumulated proline in leaf discs of rape (*Brassica napus* L.) incubated in a medium of low osmolarity. **Plant Science**, v. 118, p. 31–45, 1996.
- TSAY, Y. F.; CHIU, C. C.; TSAI, C. B.; HO, C. H.; HSU, P. K. Nitrate transporters and peptide transporters. **FEBS Letters**, v. 581, p. 2290–2300, 2007.
- TSCHOEP, H.; GIBON, Y.; CARILLO, P.; ARMENGAUD, P.; SZECOWKA, M.; NUNES-NESE, A.; FERNIE, A. R.; KOEHL, K.; STITT, M. Adjustment of growth and central metabolism to a mild but sustained nitrogen limitation in *Arabidopsis*. **Plant, Cell and Environment**, v. 32, p. 300–318, 2009.
- VALARANI, V. Demanda de macronutrientes pelas folhas e frutos em cultivares de café arábica de porte baixo. **Tese de Mestrado**, IAC, Campinas, 78. 2005
- van RAIJ, B.; COSTA, W. M. D.; IGUE, T.; SERRA, J.; GUERREIRO, G. Calagem e adubação nitrogenada e potássica para o cafeeiro. **Bragantia**, 1996, 55: 347-355.

- VIEIRA, L. G. E.; ANDRADE, A. C.; COLOMBO, C. A; et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Journal Brazilian Plant Physiology**, v. 18, p. 95-108, 2006.
- von WIRÉN, N.; LAUTER, F. R.; NINNEMANN, O.; GILLISSEN, B.; WALCH-LIU, P.; ENGELS, C.; JOST, W.; FROMMER, W. B. Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. **Plant Journal**, v. 21, p. 167–175, 2000.
- WALLSGROVE, R. M.; LEA, P. J.; MIFLIN, B. J. Distribution of the enzymes of nitrogen assimilation within the pea leaf cell. **Plant Physiology**, v. 63, p. 232–236, 1979.
- WANG, R.; GUEGLER, K.; LABRIE, S. T.; CRAWFORD, N. M. Genomic analysis of a nutrient response in arabidopsis reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. **The Plant Cell**, v.12, p.1491–1509, 2000.
- WANG, R.; OKAMOTO, M.; XING, X.; CRAWFORD, N. M. Microarray analysis of the nitrate response in arabidopsis roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. **Plant Physiology**, v.132, p. 556–567, 2003.
- WANG, Y. Y.; HSU, P. K.; TSAY, Y. F. Uptake, allocation and signaling of nitrate Trends in Plant Science (in press), 2012.
- YUAN, L.; LOQUÉ, D.; KOJIMA, S.; RAUCH, S.; ISHIYAMA, K.; INOUE, E.; TAKAHASHI, H.; von WIRÉN, N. The organization of high-affinity ammonium uptake in *Arabidopsis* roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. **Plant Cell**, v. 19, p. 2636–2652, 2007.
- ZHAO, X. Q.; SHI, W. M. Expression analysis of the glutamine synthetase and glutamate synthase gene families in young rice (*Oryza sativa*) seedlings. **Plant Science**, v. 170, p. 748–754, 2006.
- ZHOU, J. J.; FERNANDEZ, E.; GALVAN, A.; MILLER, A. J. A high affinity nitrate transport system from *Chlamydomonas* requires two gene products. **FEBS Letters**, v. 466, p. 225–227, 2000.