



HUMBERTO DIAS SOUZA

**IDENTIFICAÇÃO E EXPRESSÃO DE GENES
QUE CODIFICAM TRANSPORTADORES DE
FÓSFORO (PROTEÍNAS PHT1) EM CAFÉ, COM
E SEM MICORRIZA**

LAVRAS - MG

2012

HUMBERTO DIAS SOUZA

**IDENTIFICAÇÃO E EXPRESSÃO DE GENES QUE CODIFICAM
TRANSPORTADORES DE FÓSFORO (PROTEÍNAS PHT1) EM CAFÉ,
COM E SEM MICORRIZA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Alan Carvalho Andrade, PhD

**LAVRAS - MG
2012**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Souza, Humberto Dias.

Identificação e expressão de genes que codificam transportadores de fósforo (Proteínas PHT1) em café, com e sem micorriza / Humberto Dias Souza. – Lavras : UFLA, 2012.

116 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Alan Carvalho Andrade.

Bibliografia.

1. *Coffea arabica*. 2. Simbiose. 3. Deficiência. 4. Facilitadores.
4. qPCR. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD - 633.73

HUMBERTO DIAS SOUZA

**IDENTIFICAÇÃO E EXPRESSÃO DE GENES QUE CODIFICAM
TRANSPORTADORES DE FÓSFORO (PROTEÍNAS PHT1) EM CAFÉ,
COM E SEM MICORRIZA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 15 de abril de 2010.

Dr. Luciano Vilela Paiva UFLA

Dra. Fátima Maria de Souza Moreira UFLA

Dr. Alan Carvalho Andrade, PhD
Orientador

Coorientador

Francisco Adriano de Souza, PhD

LAVRAS - MG

2012

A Deus, pela força e serenidade nos momentos mais difíceis,
A Jesus, pelo exemplo de homem íntegro e sereno,
Aos meus avós e familiares.

Ofereço

Aos meus pais, Nerodias e Ivana
Ao meu irmão João Lucas

Com amor e carinho dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me iluminar e estar sempre ao meu lado quando não caminhando comigo, me carregando em seus braços.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Curso de Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade de realização de um sonho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Agrobiologia e ao Laboratório Central de Biologia Molecular da UFLA pela realização de meus experimentos.

Ao meu orientador, Dr. Alan Carvalho Andrade, pela ajuda sempre que precisei.

Ao Prof. Dr. Luciano, pela oportunidade concedida a mim para a realização do mestrado e por não medir esforços para ajudar.

Aos professores do curso de Biotecnologia Vegetal, pelos ensinamentos.

Ao Dr. Francisco Adriano de Souza, por estar sempre ao meu lado ajudando-me e me ensinando.

Ao Prof. Dr. Chalfun pela amizade e pelas palavras de conforto em momentos difíceis.

Aos membros da banca examinadora.

À minha família, meus pais Nerodias e Ivana e meu irmão João Lucas, pelo apoio e carinho constantes.

Aos meus avós, Osmarina e Ivan, por estarem sempre presentes dando-me forças para continuar trilhando meu caminho.

À minha namorada, Jaqueline, por estar presente nessa reta final de mestrado ouvindo e tendo toda a paciência do mundo para me aconselhar.

À minha Banda Gasolina Adulterada pelos preciosos momentos de refúgio e companheirismo.

Aos meus amigos Lauro, Rodolfo, Pablo, Wellington, Rômulo, Lucas e todos os demais, por me acompanharem desde a graduação com ótimos conselhos.

Aos amigos da República Vira Copos, por estarem em minha caminhada desde a época da graduação ensinando-me a ser uma pessoa um pouco melhor.

Aos colegas de curso e de laboratório, pelo convívio e amizade.

Ao Horllys e Anderson pela ajuda nas horas de aperto.

Por fim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO GERAL

A cultura do café é responsiva à adubação com fósforo. No entanto, com as reservas naturais de fósforo se esgotando e sua importância para a agricultura, ocorre interesse em se estudar alternativas de utilização desse recurso, dentre os quais está a associação com fungos micorrízicos arbusculares (FMA). Foram avaliados parâmetros como porcentagem de esporos no solo, taxa de colonização de raízes, peso foliar, área foliar e matéria seca em plantas de café arábica cultivar catuaí, inoculadas com *Scutellospora* sp, *Glomus* sp FDS1, *Acaulospora*, *Gigaspora*, além de uma mistura desses fungos e um controle não inoculado. Foi determinada também a atividade de transportadores de P da família Pht1, sem aplicação de P e 5 horas após essa aplicação. Inicialmente, a caracterização e identificação de genes candidatos a transportadores Pht1 em café, *in silico*, foi realizada por meio de palavras-chave (Phosphate transport) e análises de tBlastn com a sequência de MtPT4 (*M. truncatula*) e com a sequência do domínio conservado Pht, utilizando-se do banco de dados do CAFEST, gerado pelo projeto Genoma Brasileiro do Café. As sequências genômicas dos contigs 123, 1001 e 249-1263 e do singlet NS1 foram obtidas e analisadas por meio de um alinhamento com o programa ClustalW, possibilitando a identificação desses genes, por análises filogenéticas, como transportadores da família Pht1. Com esses resultados, foram desenhados pares de primers para todos os contigs com a finalidade de caracterizá-los por meio de qPCR. O RNA de raízes de plantas inoculadas com a mistura de fungos e o controle não inoculado após 5 horas da aplicação de P e sem aplicação de P, foi extraído seguindo-se o protocolo *Concert* (Invitrogen). Também foi extraído o RNA de folhas de plantas de café, inoculadas ou não com a mistura de fungos, após uma semana da aplicação de P. A síntese dos cDNAs foi feita a partir de *pools* do RNA total de raízes e folhas e após ensaios de diluição, definiu-se a diluição de 1:50, como a melhor. As análises por qPCR foram realizadas utilizando-se a ubiquitina como gene constitutivo para a normalização dos resultados. O contig 1001 não apresentou diferenças nos níveis de expressão para aplicação ou não de P, em raízes, nem para presença ou não do fungo. O singlet NS1 foi mais expresso em raízes de plantas com déficit de P e sem micorriza e em folhas de plantas micorrizadas com aplicação de P após uma semana. Os contigs 249-1263 apresentaram maior expressão em raízes de plantas com aplicação de P, porém maior nas não micorrizadas e em folhas, a diferença não foi significativa. O contig 123 não apresentou expressão em folhas e em raízes apresentou maior expressão em plantas micorrizadas com aplicação de P.

Palavras-chave: Fósforo. Transportadores. Café. Fungos micorrízicos.

Excluído: a

Excluído:

Excluído:

Excluído:

Excluído:

Excluído: n

Excluído: ,

Formatado: Fonte: Itálico

Excluído: ,

Excluído: e

Excluído: it

Excluído: M

GENERAL ABSTRACT

With the exhausting of phosphorus natural reserves and its importance to agriculture, there is interest in studying a better way to use this resource, among which is the association with mycorrhizal fungi, capable of inducing carriers family Pht1. Were evaluated parameters such as percentage of spores in the soil, rate of colonization of roots, leaf weight, leaf area and dry matter in coffee plants inoculated with *Scutellospora* sp, *Glomus* sp FDS1, *Acaulospora*, *Gigaspora*, a mixture of fungi and an uninoculated control without the application of P and 5 hours after application. Differences were observed among genera of fungi, but not between the times of application of P. The time of one week after P application only served to evaluate the number of spores. The characterization and identification of candidate genes for transporters Pht1 in coffee, *in silico*, was realized using keywords (Phosphate transport) and tBlastN analysis with the sequence of MtPT4 (*M. truncatula*) and the sequence of a conserved domain Pht1 against the database CAFEST, generated by the Brazilian Coffee Genome Project. Genomic sequences of contigs 123, 1001 and 249-1263 and singlet NS1 were obtained and analyzed through an alignment in ClustalW, enabling the identification of these genes by phylogenetic analysis, as transporters of Pht1 family. With these results we designed primer pairs for all identified contigs in order to characterize them by means of qPCR. The roots RNA of the plants inoculated with the fungi mixture and uninoculated control after five hours of P application and without P application were extracted following the *Concert* (Invitrogen) protocol. Total RNA from leaves of coffee plants inoculated or not with a mixture of fungus, one week after P application was also extracted. The cDNA synthesis was performed using RNA pools from roots and leaves and the 1:50 dilution was chosen as the best. qPCR reactions was performed using ubiquitin as a constitutive gene for normalization of results. The contig 1001 showed no differences in expression levels for application of P or not in roots and not to presence or absence of the fungus. The singlet NS1 was more expressed in roots of plants with P deficit and no mycorrhiza and in leaves of mycorrhizal plants with P application after one week. The contigs 249-1263 showed higher expression in roots of plants with P application, but higher in non-inoculated leaves and the difference was not significant. The contig 123 showed no expression in leaves but in roots showed the highest expression in mycorrhizal plants with P application.

Excluído:

Formatado: Recuo: Primeira
linha: 1,25 cm

Keywords: Phosphorus. Transporters. Coffee. Mycorryzae.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1			
1	INTRODUÇÃO GERAL.....	13	
	REFERÊNCIAS.....	18	
CAPITULO 2 Avaliação da Associação de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) com mudas de café (Coffea arabica L.)....		21	
1	INTRODUÇÃO.....	24	
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	26	
2.1	<i>Coffea arabica</i>	26	
2.2	Micorrizas.....	26	
2.2.1	Micorrizas Arbusculares.....	27	
2.3	Nutrição em plantas micorrizadas.....	30	
2.4	Outros efeitos da micorriza.....	31	
2.5	Efeitos da associação sobre patógenos.....	32	
2.6	Aplicações tecnológicas.....	33	
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33	
3.1	Material vegetal.....	33	
3.2	Coloração das raízes para determinação da taxa de colonização.....	36	
3.3	Extração de esporos.....	38	
3.4	Análises estatísticas.....	39	
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39	
4.1	Tensidade de esporos	39	
4.2	Colonização de raízes.....	41	
4.3	Peso foliar.....	42	
4.4	Área foliar e matéria seca.....	43	
5	CONCLUSÕES.....	46	
	REFERÊNCIAS.....	48	

Tabela formatada

Excluído: 4

Excluído: 9

Formatado: Espaçamento entre linhas: Múltiplos 1,15 li

Excluído: M...C ... [1]

Excluído: 5

Excluído: 0

Excluído: 7

Excluído: á

Excluído: 7

Excluído: 7

Excluído: 8

Excluído: 1

Excluído: 2

Excluído: 3

Excluído: 4

Excluído: 5

Excluído: 5

Excluído: 3.2 ... [2]

Excluído: 3

Excluído: 6

Excluído: 4... ... [3]

Excluído: 5... ... [4]

Excluído: 4...1 ... [5]

Excluído: 2

Excluído: 4

Excluído: 5

Excluído: 9

Excluído: 50

	CAPÍTULO 3 Identificação de genes que codificam proteínas transportadores de fósforo em café (<i>Coffea</i> spp.)	55	
1	INTRODUÇÃO.....	58	Excluído: 9
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	61	Excluído: 3
2.1	Mecanismos de utilização e absorção de fósforo em plantas.....	61	Excluído: 3
2.2	Famílias de genes transportadores de fosfato.....	62	Excluído: 4
2.3	Identificação de genes.....	67	Excluído: 9
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	67	Excluído: 70
3.1	Identificação de genes que codificam transportadores de Pi, da família PHT1 em café.....	67	Excluído: 7
3.2	Caracterização da cópia genômica.....	68	Excluído: 0
3.3	Caracterização da região promotora.....	68	Excluído: 70
3.4	Filogenia.....	68	Excluído: 7
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	69	Excluído: 1
5	CONCLUSÕES.....	78	Excluído: 72
	REFERÊNCIAS.....	79	Excluído: 81
	CAPITULO 4 Expressão de genes PHT1 de café por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR)		Excluído: 82
	PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	85	Excluído: 7
1	INTRODUÇÃO.....	88	Excluído: 90
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	89	Excluído: Ê
2.1	Expressão de genes transportadores de Pi em diferentes espécies.....	89	Excluído: 92
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	94	Excluído: 92
3.1	Extração do RNA.....	94	Excluído: 7
3.2	Tratamento com DNAase.....	95	Excluído: 7
3.3	Síntese de cDNA.....	97	Excluído: 8
3.4	PCR quantitativo (qPCR).....	97	Excluído: 100
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	100	Excluído: 100
			Excluído: 3

4.1 Análises dos resultados de q PCR para genes de café da família

PHT1..... 100

5 CONCLUSÕES..... 100

REFERÊNCIAS..... 107

ANEXO..... 111

Excluído: 3

Excluído: 9

Excluído: 1

Excluído: ¶

Formatado: FABIANE, À esquerda, Recuo: Primeira linha: 0 cm

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

A cultura do café é de extrema importância para a economia brasileira e também para a de diversos países da América Latina, sendo que o gênero *Coffea*, pertence à família Rubiaceae, que agrupa 103 espécies (DAVIS et al., 2006), distribuídas em três seções (CHEVALIER, 1942), caracterizadas pela abrangência geográfica. Sua diversidade é considerada bastante significativa, porém somente *C. arabica* e *C. canephora* são comercializadas no mundo. A espécie *C. arabica* é um alotetraploide com $2n=4x=44$ cromossomos e autógama com cerca de 10% de polinização cruzada (CARVALHO; MÔNACO, 1964) de origem do sudoeste da Etiópia, sudeste do Sudão e norte do Quênia. Sua base genética é estreita (CARVALHO, 1993) e as cultivares conhecidas são derivadas de Typica e Bourbon (ANTHONY, 1992). No Brasil, o estado de Minas Gerais possui a maior área plantada (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2009), fato este devido à região mineira ser montanhosa e de clima mais ameno e, portanto adequada para seu cultivo.

Excluído: ê

A espécie *C. canephora* é diploide $2n=2x=22$ cromossomos e é alógama, apresentando incompatibilidade gametofítica (CONAGIN; MENDES, 1961). Possui uma ampla variabilidade genética e é originária de uma região que se estende da Guiné ao Congo, da costa oeste à região central do continente africano. No Brasil, o estado com maior plantio de *C. canephora* é o estado do Espírito Santo (CONAB, 2009), devido à adaptação dessa espécie a regiões litorâneas.

Excluído: por

O posto de maior produtor de café do mundo é ocupado pelo Brasil, e logo em seguida, em 2º lugar, está o Vietnã e em 3º, a Colômbia. O Brasil ocupa também a posição de 2º maior consumidor de café do mundo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ - ABIC, 2010).

A utilização de fertilizantes é responsável por 80% no consumo das reservas de fósforo (TANGSUBKUL, 2005), pois esses fertilizantes fosfatados são amplamente utilizados na agricultura para garantir a produtividade e a disponibilidade de Pi. Alguns autores estimam que em cem anos as reservas de rochas de fosfato no mundo estarão esgotadas (DRIVER, 1998; STEVENSON; COLE, 1999).

Uma alternativa para se utilizar melhor o P na cultura do cafeeiro é a utilização de associação com fungos micorrízicos (FMAs) que por meio de suas hifas conseguem captar Pi no solo e translocar para a planta. Existem diversos gêneros que fazem associação com o café, dentre os quais se encontram *Glomus*, *Acaulospora*, *Scutellospora*, *Gigaspora* e outros (MULETA et al., 2007).

Excluído:

A ocorrência de diferentes gêneros e espécies de FMAs em solos e raízes de cafeeiro varia de acordo com vários fatores, tais como as condições edafoclimáticas e as práticas de cultura (ANDRADE et al., 2009). A quantidade de precipitação pode variar drasticamente em alguns países e essas mudanças podem influenciar na colonização, como foi observado no Brasil em plantações de café, com baixas taxas de colonização nas secas e um aumento no início do período chuvoso (SAGGIN-JUNIOR; SIQUEIRA, 1996).

A troca de nutrientes é uma característica essencial para a ocorrência de simbiose entre FMAs e as plantas. Os fungos micorrízicos obtêm carbono da planta hospedeira enquanto assistem as plantas na aquisição de fósforo (como fosfato) do solo (BOLAN, 1991). Na simbiose de FMAs, os fungos fornecem Pi às raízes por meio de hifas especializadas chamadas arbúsculos.

Excluído: i

Estudos recentes indicam que a simbiose micorrízica induz a expressão de vários genes da família Pht1 pertencente à superfamília MFS (Major Facilitator Superfamily), em diferentes espécies vegetais (CHEN et al., 2008; NAGY et al., 2005). Além disso, a disponibilidade de Pi também afeta a expressão gênica de transportadores Pht1, sendo que os transportadores de baixa

afinidade são expressos em condições elevadas de P e os de alta afinidade, onde se incluem os induzidos por micorriza, normalmente expressos na deficiência do nutriente (JAVOT et al., 2007).

Estudos filogenéticos de genes transportadores de P de alta afinidade Pht1, propõem uma subdivisão em 4 subfamílias, sendo que os genes da subfamília I são expressos especificamente na presença FMAs. Além disso, um trabalho com o gene MtPT4 (Pht1-Subfamília I), de *Medicago truncatula*, concluiu que esse transportador é essencial para a aquisição do Pi fornecido pelo FMA *Glomus vesiforme*. Nesse mesmo trabalho, de maneira surpreendente, verificou-se que a função do transportador MtPT4 é crucial para a ocorrência da simbiose, pois a análise de plantas transgênicas com perda de função do MtPT4, mostraram que houve morte prematura dos arbúsculos, baixa proliferação do fungo dentro das raízes, resultando no término da simbiose. Dessa forma, os autores concluíram que o transporte de Pi não é somente um benefício para a planta mas também um pré-requisito para a ocorrência de simbiose (JAVOT et al., 2007).

Excluído: ô

Sequenciamento em larga escala de cDNAs para a produção de ESTs (*Expressed Sequence Tags*), também conhecidas como Etiquetas de Sequências Expressas, seguido de comparações das sequências com bancos de dados, tornou-se o método de escolha para análises genômicas, devido à relação custo-benefício, tornando-se o fragmento de mais rápido crescimento das bases de dados de DNA pública. Atualmente, existem quase 43 milhões de ESTs na coleção NCBI público e o maior conjunto de ESTs de plantas vem da espécie modelo *Arabidopsis thaliana* e de *Oryza sativa*. No entanto, uma grande variedade de sequências de EST de outras espécies vegetais, incluindo café, têm sido depositadas no banco de dados dbEST.

Formatado: Fonte: Itálico

Para um melhor entendimento dos genes e de outros mecanismos do café, o Projeto Genoma Café veio possibilitar a construção de um banco de

dados com mais de 33.000 genes distintos, a partir de 250 mil ESTs de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa*. Essa Base de Dados fornece informações para estudos de identificação e caracterização de genes que podem auxiliar no melhoramento genético do cafeeiro (VIEIRA et al., 2006). Além disso, as novas tecnologias de sequenciamento têm proporcionado maior rapidez e menor custo na geração de sequência e novos projetos de sequenciamento genômico estrutural foram iniciados recentemente, incluindo o do café (LASHERMES; ANDRADE; ETIENNE, 2008).

Com base no citado, no Capítulo 1, objetivou-se mostrar um (o) estudo da interação micorrízica com o café, avaliando, seis tratamentos, em que são utilizados quatro gêneros de fungos, *Glomus*, *Acaulospora*, *Scutellospora*, *Gigaspora*, além de uma mistura desses fungos e um controle não inoculado. Foram avaliados parâmetros tais como número de esporos, porcentagem de colonização (que pode indicar uma melhor interação com os FMAs), matéria seca, peso foliar e área foliar.

Excluído: c

Excluído: -se

Excluído: dentre os quais

No Capítulo 2, fez-se uma análise *in silico* para identificação e caracterização de genes candidatos de cafeeiro, a transportadores da família Pht1, induzidos ou não por micorriza. As buscas foram realizadas na Base de Dados do Genoma Café (<https://alanine.cenargen.embrapa.br/FrancaBrTk>) por meio de análises de Blastp e tBlastn, com a sequência de MtPT4 de *Medicago truncatula* e de um domínio conservado característico da família Pht1 GGDYPLSATIxSE (KARANDASHOV; BUCHER, 2005). Foram realizadas também, buscas por meio da palavra-chave “phosphate transporter” e com isso foram encontrados quatro contigs e um singlet. Contigs, 123, 1263, 249, 100 e o singlet NS1. Essas sequências foram analisadas e a cópia genômica foi obtida para estudos filogenéticos.

Excluído: O

Excluído: c

Excluído: objetivou

No Capítulo 3, descreve-se estudos de expressão por PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR), dos genes identificados nas análises *in silico*. Foram

Excluído: O

Excluído: c

Excluído: ,

realizadas reações de qPCR com primers específicos, desenhados com base nas sequências dos genes candidatos previamente identificados, além do gene constitutivo, ubiquitina. Nessas reações, a expressão gênica foi analisada utilizando-se cDNA proveniente de *C. arabica* nas condições de aplicação de P e sem aplicação de P, com a mistura de fungos e o controle não inoculado.

Excluído: á

As técnicas utilizadas neste trabalho foram eficientes e possibilitaram a identificação e caracterização de genes candidatos envolvidos no transporte de Pi da família Pht1 de transportadores em café.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, S. A. L. et al. Arbuscular mycorrhizal association in coffee. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 147, n. 2, p. 1-11, Apr. 2009.
- ANTHONY, F. **Les ressources génétiques des caféiers**: collecte, gestion d'un conservatoire et evaluation de la diversité génétique. Montpellier: Orstom, 1992. 320 p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ. **A história do café**: origem e trajetória. Disponível em: <http://www.abic.com.br/scafe_historia.html>. Acesso em: 10 jan. 2010.
- BOLAN, N. S. A critical-review on the role of mycorrhiza fungi in the uptake of phosphorus by plants. **Plant & Soil**, The Hague, v. 134, n. 2, p. 189-207, July 1991.
- CARVALHO, A. **Histórico do desenvolvimento do cultivo do café do Brasil**. Campinas: IAC, 1993. 7 p.
- CARVALHO, A.; MÔNACO, L. C. Natural crosspollitanation in C. Arabica. In: INTERNATIONAL HORTICULTURAL CONGRESS, 16., 1964, Brussels. **Proceedings...** Brussels: European Seed Association, 1964. p. 447-449.
- CHEN, A. et al. Conservation and divergence of both phosphate- and mycorrhiza-regulated physiological responses and expression patterns of phosphate transporters in solanaceous species. **New Phytologist**, Cambridge, v. 173, n. 4, p. 817-831, Dec. 2007.
- CHEVALIER, A. **Les caféiers du globe**: iconographie des caféiers sauvages et cultivés et des Rubiacées prises pour des caféiers. Paris: P. Chevalier, 1942. 36 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira café, safra 2009**: quarta estimativa. Brasília, 2009. 19 p.

CONAGIN, C. H. T. M.; MENDES, A. J. T. Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de Coffea: auto-incompatibilidade em Coffea canephora Pierre ex Froehner. **Bragantia**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 787-804, 1961.

DAVIS, A. P. et al. An annotated taxonomic conspectus of the genus Coffea (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 152, n. 4, p. 465-512, Dec. 2006.

DRIVER, J. Phosphates recovery for recycling from sewage and animal wastes. **Phosphorus Potassium**, London, n. 216, p. 17-21, July/Aug. 1998.

JAVOT, H. et al. A medicago truncatula phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 5, p. 1720-1725, Jan. 2007.

KARANDASHOV, V.; BUCHER, M. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. **Trends Plant Science**, London, v. 10, n. 1, p. 22-29, Feb. 2005.

LASHERMES, P.; ANDRADE, A. C.; ETIENNE, H. Genomics of coffee, one of the world's largest traded commodities. In: MOORE, P. H.; MILING, R. (Ed.). **Genomics of tropical crop plants**. London: Springer, 2008. p. 203-226.

MULETA, D. et al. Composition of coffee shade tree species and density of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) spores in Bonga natural coffee forest, southwestern Ethiopia. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 241, n. 1/3, p. 145-154, Mar. 2007.

NAGY, R. et al. Differential regulation of five Pht1 phosphate transporters from Maize (*Zea mays*). **Plant Biology**, Stuttgart, v. 8, n. 2, p. 186-197, Feb. 2005.

SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SIQUEIRA, J. O. Micorrizas arbusculares em cafeeiro. In: SIQUEIRA, J. O. **Avanços em fundamentos e aplicação de micorriza**. Lavras: UFLA, 1996. p. 203-254.

STEVENSON, F. J.; COLE, M. A. **Cycles of soil**: carbon, nitrogen, phosphorus, sulphur, micronutrients. 2nd ed. New York: J. Wiley, 1999. 379 p.

TANGSUBKUL, N. Incorporating phosphorus management considerations into wastewater management practices. **Environmental Science and Policy**, Exeter, v. 8, n. 1, p. 1-15, Feb. 2005.

VIEIRA, L. G. E. et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 95-108, Mar. 2006.

CAPÍTULO 2

Avaliação da Associação de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) com

mudas de café (*Coffea arabica* L.)

Excluído: M

Excluído: C

Formatado: À esquerda

RESUMO

Plantas micorrizadas muitas vezes apresentam um melhor crescimento em relação a plantas não micorrizadas. Este estudo teve como objetivo a avaliação de diferentes gêneros de fungos micorrízicos arbusculares em mudas de café sem aplicação de P e 5 horas após aplicação de P. Foram analisados os parâmetros, porcentagem de esporos no solo, taxa de colonização de raízes, peso foliar, área foliar e matéria seca de mudas inoculadas com *Scutellospora* sp, *Glomus* sp FDS1, *Acaulospora*, *Gigaspora*, uma mistura desses fungos e um controle não inoculado. Foi observado diferença entre os gêneros de fungos, mas não entre os diferentes tempos de aplicação de P. A mistura de fungos foi superior estatisticamente em todas as análises com exceção do número de esporos indicando para o tratamento com o *mix* uma maior alocação de nutrientes e acúmulo de biomassa podendo ser interferência do pH do solo sobre os diferentes gêneros de fungos influenciando neste acúmulo.

Excluído:

Formatado: Recuo: Primeira linha: 1,25 cm

Formatado: Fonte: Itálico

Palavras-chave: Colonização. Fungos. Plantas. pH do solo. Nutrientes.

Excluído: ¶

Formatado: A esquerda

ABSTRACT

Mycorrhizal plants often show better growth over plants not inoculated. This study aimed to evaluate different genres of mycorrhizal fungi on coffee catuaí plants without P application and 5 hours after application of P. Were analyzed the parameters, percentage of soil spores, rate of roots colonization, leaf weight, leaf area and dry weight of seedlings inoculated with *Scutellospora* sp, *Glomus* sp FDS1, *Acaulospora*, *Gigaspora*, a mixture of fungi and an uninoculated control. Difference was observed among the genera of fungi, but not between different times of application of P. The mixture of fungi was statistically superior in all tests except the number of spores indicating to mix the treatment with a higher allocation of nutrients and biomass accumulation could be interference of soil pH on the different genera of fungi influencing this accumulation.

Keywords: Colonization. Fungi. Plants. Soil Ph. Nutrients.

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Coffea arabica* L. é pertencente à família Rubiaceae, tendo sua origem nos bosques das regiões montanhosas do centro-leste africano. É uma planta perene de porte arbustivo ou arbóreo com folhas persistentes e flores hermafroditas (LASHERMES et al., 1999).

O mercado mundial de café movimenta anualmente bilhões de dólares, situando essa cultura como uma das mais importantes *commodities* agrícolas e despertando cada vez mais o interesse dos agricultores em aumentar a produtividade e reduzir os custos de produção (CHAVES FILHO, 2010).

Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de café, sendo responsável por 30% do mercado internacional de café, volume equivalente à soma da produção dos outros seis maiores países produtores. É também o segundo mercado consumidor, atrás somente dos Estados Unidos. As áreas cafeeiras estão concentradas no centro-sul do país, onde se destacam quatro estados produtores: Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo e Paraná. A região Nordeste também tem plantações na Bahia, e da região Norte pode-se destacar Rondônia (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ - ABIC, 2010).

A produção de café arábica se concentra em Minas Gerais, Paraná, São Paulo, Bahia e parte do Espírito Santo, enquanto o café robusta é plantado principalmente no Espírito Santo e Rondônia. As principais regiões produtoras no Estado de São Paulo são a Mogiana, Alta Paulista e Região de Pirajú. Em Minas Gerais, as principais regiões produtoras são: Cerrado Mineiro, Sul de Minas, Matas de Minas e Jequitinhonha. A altitude média do Cerrado Mineiro é de 800 metros e dentre o café arábica cultivado, a predominância é de plantas das variedades Mundo Novo e Catuaí. O Sul de Minas também produz apenas café arábica e a altitude média é de aproximadamente 950 metros. As variedades

Formatado: Fonte: Itálico

Excluído: c

mais cultivadas são o Catuaí e o Mundo Novo, mas também há lavouras das variedades Icatu, Obatã e Catuaí Rubi. As regiões das Matas de Minas e do Jequitinhonha estão a uma altitude média de 650 metros e possuem lavouras de arábica das variedades Catuaí (80%), Mundo Novo, entre outras (ABIC, 2010).

Os dados sobre associações com fungos micorrízicos arbusculares em café são bastante escassas, apesar da importância econômica dessa cultura. As micorrizas são as espécies simbióticas mais comuns na terra sendo a micorriza arbuscular o tipo mais frequente, ocorrendo em 80% das espécies de plantas em todos os ecossistemas (STRACK et al., 2003). Há mais de 150 espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), que pertencem ao filo Glomeromycota (SCHÜBLER; SCHWARZOTT; WALKER, 2001). O benefício principal para as plantas é um aumento na absorção de nutrientes, particularmente fósforo. Esse efeito é uma consequência da maior exploração do volume do solo pelas raízes por meio de hifas extra-radiculares dos fungos micorrízicos arbusculares (SCHENEIGER; JAKOBSEN, 2000). Existem evidências também de efeitos positivos sobre plantas em condições de estresse hídrico (AUGÉ, 2001) e na proteção das plantas contra agentes patogênicos (VAAST; CASWELL-CHEN; BLEDSOE, 1998).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da associação micorrízica com o café e também da aplicação de fósforo nessa associação.

Excluído:

Excluído:

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Coffea arabica*

O cafeeiro (*Coffea sp.*) é um arbusto da família Rubiaceae e do gênero *Coffea*, sendo todas as espécies conhecidas, com exceção de *Coffea arabica*, diploides ($2n=2x=22$ cromossomos). *Coffea arabica L.* ($2n=4x=44$), a única espécie poliploide no gênero *Coffea*, é um alotetraploide contendo dois subgenomas diploides, e cuja origem vem de duas diferentes espécies diploides, *C. canephora* e *C. eugenioides* (LASHERMES et al., 1999).

Excluído: são

Das espécies cultivadas, *Coffea arabica L.* e *Coffea canephora L.* são as mais importantes economicamente. Devido a essa importância econômica, alguns estudos acerca da associação simbiótica do café com micorrizas têm sido realizados. Esses estudos têm por objetivo melhorar a nutrição das plantas enquanto jovens permitindo que fiquem prontas e mais fortes para o transplante para o campo e até mesmo na nutrição de plantas adultas, pois os efeitos dos FMs no desenvolvimento da planta diminuem com a idade da cultura (SIQUEIRA et al., 1998).

Excluído: ,

2.2 Micorrizas

Os micro-organismos são os seres mais primitivos do planeta e adquiriram ao longo do processo evolutivo, características e adaptabilidade para coexistirem com outros seres vivos. As simbioses entre plantas e micro-organismos heterotróficos, como as micorrizas, que são associações entre fungos e raízes, se destacam. Estudos em raízes fossilizadas evidenciam que as micorrizas surgiram há cerca de 400 milhões de anos, período que coincide com o aparecimento das plantas terrestres (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Excluído: a

Apesar de suas origens tão antigas, essas associações só foram observadas com detalhes no início do século XIX, em 1842, quando Nágeli fez a primeira descrição da associação fungo-raiz, provavelmente de uma micorriza arbuscular. Essas associações foram reconhecidas e tratadas cientificamente no final daquele século. Em 1885, o alemão Bernard Frank, um fisiologista de plantas distinguiu entre ecto e endotróficas e empregou pela primeira vez o termo “mycorrhiza” do grego (Myco=fungo, e rhiza=raiz). Frank comprovou experimentalmente a natureza mutualística das micorrizas afirmando-se tratar de um órgão morfológicamente característico e com dependência fisiológica íntima e recíproca (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A separação em grupos ou tipos de micorrizas pode variar, dependendo do autor ou do enfoque dado, mas a tendência atual é a categorização em sete grupos distintos, dentre eles os fungos micorrízicos arbusculares.

2.2.1 Micorrizas arbusculares

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) pertencem ao Filo Glomeromycota, Classe Glomeromycetes e formam simbiose mutualística com a maioria das famílias de plantas. Nessa simbiose, a planta fornece energia ao fungo via fotossíntese e o fungo, por sua vez, provê à planta uma série de serviços. A absorção de nutrientes obtidos de áreas localizadas além da zona de depleção da raiz é o principal benefício, além da translocação e disponibilização desses nutrientes para células do córtex das raízes das plantas quando a associação já está estabelecida, conforme pode ser observado na Figura 1 (BOLAN, 1991).

Excluído: a

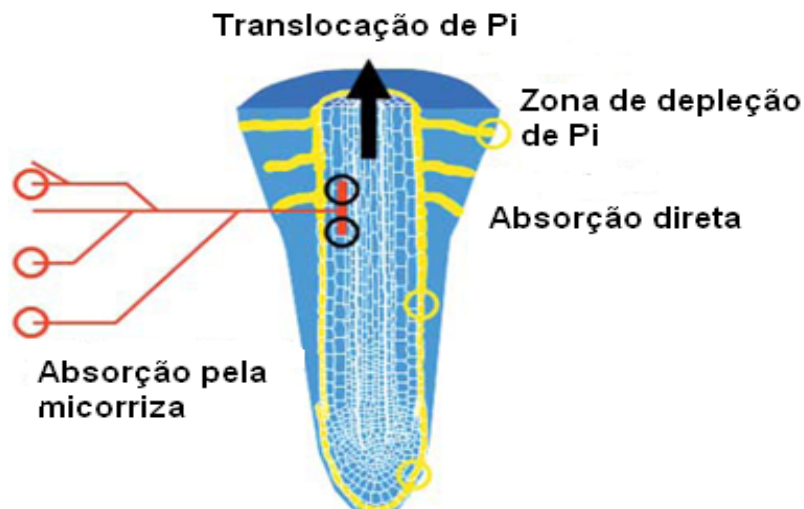


Figura 1 Zona de depleção da raiz em azul, absorção direta pela superfície da raiz e pelos absorventes (amarelo) e micorrízica (vermelho) (BOLAN, 1991)

Formatado: Fonte: 10 pt

Formatado: Recuo: A esquerda: 0 cm, Deslocamento: 1,25 cm

Formatado: Fonte: 10 pt

Excluído: e

Além da aquisição de nutrientes, outros benefícios têm sido relatados como o aumento na resistência da planta ao ataque de patógenos do sistema radicular e na capacidade de absorção de água (JEFFRIES et al., 2003; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). As associações micorrízicas contribuem para acumulação do estoque de carbono (RILLIG et al., 2001) e biomassa microbiana (OLSSON; WILHELMSSON, 2000), favorecendo o sequestro de carbono da atmosfera. Favorecem também a formação de agregados e sua estabilidade nos solos, não só pela ação física do micélio, mas por meio da ação de uma glicoproteína denominada glomalina que é produzida por esses fungos.

Estudos sobre a ecologia desse grupo de fungos e sua diversidade de espécies ainda são muito prematuros (FITTER, 2005). A vasta gama de benefícios da simbiose micorrízica depende da interação entre macro e micro simbiontes (BEVER, 2002) e das características ambientais, como

disponibilidade de fósforo e oferta de carbono ao simbiote (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Existem diferenças funcionais entre espécies e em isolados de uma mesma espécie e isso têm sido descoberto graças aos avanços obtidos no campo da filogenia, genética e ecologia desses fungos.

Excluído: e

Estudos mostram a ocorrência natural de FMAs nos solos de plantações de café, bem como a presença de estruturas micorrízicas em raízes de café (COLOZZI-FILHO; CARDOSO, 2000; LOPES et al., 1983; MULETA et al., 2007). Lopes et al. (1983) identificaram 22 espécies de FMAs em solo rizosférico de um café brasileiro. Os gêneros mais frequentes de Fungos Micorrízicos Arbusculares encontrados foram *Acaulospora* e *Glomus* sendo *Acaulospora* superior. Outros gêneros de FMAs, como *Scutellospora*, *Gigaspora* e *Sclerocystis*, também têm sido descritos em diferentes solos de plantações de café (COLOZZI-FILHO; CARDOSO, 2000).

Excluído:

A ocorrência de diferentes gêneros e espécies de FMAs em solos e raízes de cafeeiro varia de acordo com vários fatores, tais como as condições edafoclimáticas e práticas de cultura (ANDRADE et al., 2009).

A idade da planta também pode influenciar na colonização, devido à necessidade de absorção de Pi (SIQUEIRA et al., 1998). Culturas e práticas de gestão de culturas, tais como: calagem, consórcio com leguminosas, agricultura orgânica e monocultivo, entre muitos outros, podem alterar as características físico-químicas e biológicas do solo, portanto, podem influenciar na diversidade e abundância dos FMAs em solos.

Excluído: C

Sistemas agroflorestais são reconhecidos para reduzir a degradação dos solos e aumentar a disponibilidade de nutrientes (YOUNG, 1997). Vantagens adicionais desse sistema são derivadas de uma repressão de pragas do café, como o capim sofá, regulação da temperatura e manutenção da diversidade (DAMATTA, 2004; MUSCHLER, 2001). Cardoso et al. (2003) investigaram a distribuição vertical de esporos de FMAs sobre sistemas agroflorestais

(sombreados) e café de monocultivo (pleno sol). Foi encontrado grande número de esporos nas camadas mais profundas dos sistemas agroflorestais do que em solos de café de monocultura. Cardoso et al. (2003) sugeriram que a maior concentração de esporos de FMAs foi relacionada à maior ocorrência de micorrizas nessas profundidades do solo, que pode ser importante para aumentar a disponibilidade de Pi e para melhorar a eficiência da ciclagem de Pi nesses sistemas.

2.3 Nutrição em plantas micorrizadas

Melhorias na nutrição mineral das plantas estão sendo relacionadas principalmente à absorção pelas hifas extra-radulares de regiões não rizosféricas do solo, proporcionando o transporte de nutrientes para a raiz das plantas (SCHWEIGE; JAKOBSEN, 2000). Depois do N, P é o macronutriente mais limitante para o crescimento da planta, [quando em falta](#), sendo necessárias concentrações em milimolar no ambiente celular. Para cumprir esse requisito, e considerando o P do solo muito escasso ou em formas não absorvíveis, as plantas dependem de vários mecanismos, tais como transportadores de alta afinidade, liberação de fosfatases, sintoma bioquímico comum em resposta ao estresse de P (DUFF; SARATH; PLAXTON, 1994), resposta essa comum entre bactérias, fungos e leveduras (NART, 1992), liberação de ácidos orgânicos e associações com FMAs (REQUENA, 2005), que envolve um percurso regulamentado para o intercâmbio de P entre plantas e fungos simbiotes (POULSEN et al., 2005). O P é, sem dúvida, o elemento de maior enfoque na associação simbiote e isso se reflete na concentração de trabalhos de melhoramento com essa associação visando uma melhor absorção desse macronutriente.

Sanchez et al. (2000) observaram que em três típicos cafés cultivados em solos da Costa Rica com o decréscimo da fertilidade dos solos, a micorrização aumentou a eficiência em termos de crescimento, sendo inversamente proporcional a relação entre a disponibilidade de P e o crescimento da planta pela absorção de Pi pelos FMAs. A dependência das plantas e a eficiência simbiótica são diretamente influenciadas pela disponibilidade de P (SAGGIN-JUNIOR; SIQUEIRA, 1995), fazendo com que o grau adequado de disponibilidade de P no solo, seja um fator muito importante no estabelecimento de associações micorrízicas eficientes.

Excluído: adequado,

2.4 Outros efeitos da micorriza

Além dos efeitos nutricionais positivos, os FMAs podem contribuir também para a resistência à seca e à salinidade e a tolerância a patógenos (ANDRADE et al., 2009). É reconhecido que FMAs podem influenciar o balanço hídrico de plantas desidratadas (AUGÉ, 2001). O aumento na capacitação de água nas raízes de plantas micorrizadas se deve a uma melhoria na condutância(???) do fluxo de água nessas raízes (AUGÉ, 2001), incluindo aumentos no comprimento das raízes e alterações em sua morfologia (DAVIES et al., 1996).

Excluído: tem sido

Recentemente foi demonstrado que a colonização radicular por FMAs aumenta a expressão gênica de proteínas transmembrana(?) que facilitam no gradiente potencial de água, melhorando assim a eficiência das plantas sob condições de seca (PORCEL et al., 2005).

Excluído: sn

Excluído: n

Além dos benefícios fisiológicos causados pela micorrização, outros processos ecológicos têm sido atribuídos por FMAs, incluindo as suas contribuições para a estrutura dos solos (RILLIG; MUMMEY, 2006), que é de relevância para a sustentabilidade de agrossistemas.

A toxicidade dos metais pesados no café, como é o caso em outras espécies de plantas, é a causa do estresse oxidativo (GOMES-JÚNIOR et al., 2006a, 2006b), que pode levar a danos celulares e pode ocorrer prejuízo de função, resultando em crescimento deficiente, alterações bioquímicas prejudiciais diversas e acumulação excessiva de metais nos tecidos. No caso específico do café, pesticidas, fertilizantes ou alterações orgânicas são as mais frequentes fontes externas de metais ou de toxicidade química. Além disso, concentrações de solos com acidez naturalmente elevada e alumínio são frequentes em regiões tropicais e subtropicais.

Excluído: d

Excluído: e

Excluído: ,

2.5 Efeitos da associação sobre patógenos

Fitonematoides como os das galhas (*Meloidogyne* spp.) e lesão das raízes (*Pratilenchus* spp.), são comuns em viveiros e plantações de café. A infecção das plantas de café causadas por nematoides causa redução no crescimento da planta e na produção de grãos, levando a perdas importantes, que vão de 15% a 60% (CAMPOS; LIMA; ALMEIDA, 1985). A inoculação de FMAs pode beneficiar a capacidade da planta em resistir a estresse abiótico conferindo certo grau de tolerância e capacidade de resistir a patógenos (AZCÓN-AGUILAR; BAREA, 1996). As associações de FMAs com raízes de plantas podem aumentar a absorção de P pelas plantas e esses competem pelos sítios de penetração de nutrientes com os patógenos, diminuindo os efeitos deletérios dos patógenos nas raízes (AZCÓN-AGUILAR; BAREA, 1996).

Excluído: um

Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar a proteção causada por FMAs contra diversos patógenos, incluindo o aumento da produção de compostos fenólicos, indução de algum mecanismo de resistência e ativação do sistema de defesa da planta (BENHAMOU et al., 1994; GIANINAZZI-PEARSON et al., 1996). Assim, a inoculação de FMAs em plantas de café em

viveiros pode ser uma prática útil para minimizar os efeitos maléficos da infecção por nematoides (VAAST; CASWELL-CHEN; ZASOSKI, 1998).

2.6 Aplicações tecnológicas

A utilização de FMAs é de especial interesse para a melhoria e eficiente uso de fertilizantes, diminuindo a quantidade necessária para o crescimento adequado das mudas de café, conforme observado por Tristão, Andrade e Silveira (2006), que verificaram o efeito positivo da inoculação de FMAs em mudas de café em casca de Pinus e fibras de coco como substratos.

A inoculação de FMAs altamente eficazes é esperada para melhorar significativamente o estado nutricional de mudas e o seu estabelecimento após o transplante para o campo, como já foi verificado por alguns autores (LOPES et al., 1983; RIVERA et al., 2003; SIQUEIRA et al., 1987). Assim, a inoculação de FMAs pode constituir uma alternativa econômica viável para produção de mudas, diminuindo o uso de fertilizantes e pesticidas, diminuindo o tempo para transplante de campo e produção de mudas mais vigorosas capazes de melhor resistir a estresses ambientais durante o período da aclimação (COSTA et al., 2003).

Dessa maneira, fungos estão ganhando popularidade como biofertilizantes e agentes de controle biológico (SYLVIA, 1999) e também, como indústria de produção de inóculos micorrízicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Excluído: ¶

O experimento foi conduzido com mudas de *Coffea arabica* cultivar catuaí. Após pré-germinação, plântulas de café na fase de orelha de onça foram selecionadas e inoculadas para constituir seis tratamentos: (1) controle não inoculado; (2) *Gigaspora margarita* CNPAB1; (3) *Glomus* sp FDS1; (4) *Scutellospora* sp CNPAB12; (5) *Acaulospora scrobiculata* CNPABxx e (6) inóculo contendo a mistura das 4 estirpes, com 12 repetições. A quantidade de inóculo utilizada foi de duzentos esporos por planta, para cada estirpe de fungo utilizada. Os esporos foram extraídos do substrato contendo as estirpes selecionadas, por meio de peneiramento úmido e inoculados no solo autoclavado no momento do transplântio das mudas para as caixas de isopor. O preparo do substrato e informações sobre as estirpes estão descritas em Souza (2000), Banco Ativo de Germoplasma de Glomales da Embrapa Agrobiologia (CNPAB).

Formatado: Fonte: Não Negrito

Excluído: o

Excluído:

Excluído: ,

O substrato era composto do subsolo retirado de um argisolo e misturado com areia lavada na proporção de 2:1. O substrato recebeu adubação com 5,5 gramas de fosfato de rocha natural de origem marroquina por kg. Para a avaliação da atividade de transportadores de P, foram feitas aplicações de P (KH_2PO_4) em 6 das 12 repetições por tratamento, visando induzir a atividade dos transportadores de P para posterior extração de RNA. Nesse sentido, foram feitas avaliações sem aplicações de P, cinco horas após a aplicação de P e uma semana após a aplicação de P, esta última, servindo como base apenas para porcentagem de colonização das raízes e de esporos no solo.

Excluído: M

Excluído:

Excluído: e

Excluído: o

O experimento com as mudas de café foi estabelecido seguindo um delineamento ao acaso (DIC) e conduzido em casa de vegetação, na Embrapa Agrobiologia-Seropédica-RJ, nos períodos de setembro de 2008 (Inoculação dos fungos) a janeiro de 2009 (Aplicações de fósforo e coleta).



Figura 2 Mudanças de café cultivar catuaí em bandejas de isopor em casa de vegetação da EMBRAPA AGROBIOLOGIA-Seropédica-RJ

Em janeiro de 2009, as plantas foram coletadas e a parte aérea foi separada das raízes. Imediatamente amostras de folhas e raízes foram coletadas para extração de RNA. Essas amostras foram logo congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente acondicionadas em freezer a -80°C até serem processadas.

Inicialmente, o substrato de cada muda foi coletado individualmente para avaliação do número de esporos e as raízes foram lavadas em água corrente antes de serem amostradas. Foram coletadas raízes para determinação da taxa de colonização micorrízica e para extração de RNA.

Excluído: ¶
¶

Formatado: Fonte: 10 pt

Formatado: Recuo: A
esquerda: 0 cm,
Deslocamento: 1,25 cm

Excluído: J

Excluído: ,

Excluído: imediatamente

Em seguida, as folhas frescas foram utilizadas para determinação da área foliar através do aparelho LICOR Model 3100 Área Meter (Lincoln, Nebraska U.S.A). Posteriormente, o material da parte aérea e raízes foi seco em estufa com circulação de ar forçado a 65°C até peso constante. A matéria seca das folhas foi obtida por pesagem.

3.2 Coloração das raízes para determinação da taxa de colonização

Para as avaliações da taxa de colonização micorrízica foi utilizado aproximadamente 1g de raiz. As raízes foram colocadas em solução de KOH 10% “overnight” à temperatura ambiente e no dia seguinte aquecidas a 90°C por 30 minutos.

Excluído: a



Formatado: Recuo: Primeira linha: 2 cm

Figura 3 Raízes finas de café imersas em HCl para clarificação

Formatado: Fonte: 10 pt

Após essa etapa, as raízes foram lavadas em água corrente para eliminação do excesso de KOH e colocadas no mesmo recipiente com solução de HCl 1%, à temperatura ambiente por 1 hora (Figura 3).

Posteriormente, a solução de HCl foi descartada e as raízes foram coradas em solução ácida de Glicerol com Azul de Metila 0,01% (aproximadamente 20 mL), e aquecidas a 60°C por 30 minutos. Em seguida, a solução ácida de glicerol com azul de metila foi descartada em um bécher e armazenada em frasco separado. As raízes foram lavadas em água corrente e armazenadas em solução de Glicerol ácido sem corante até serem avaliadas. Todo procedimento de clarificação e coloração das raízes foi realizado seguindo protocolo da Embrapa Agrobiologia.

As estruturas fúngicas foram observadas com lupa e contadas pelo método de Gridline (Figura 4), esse método consiste na contagem das estruturas fúngicas nas interseções das linhas.

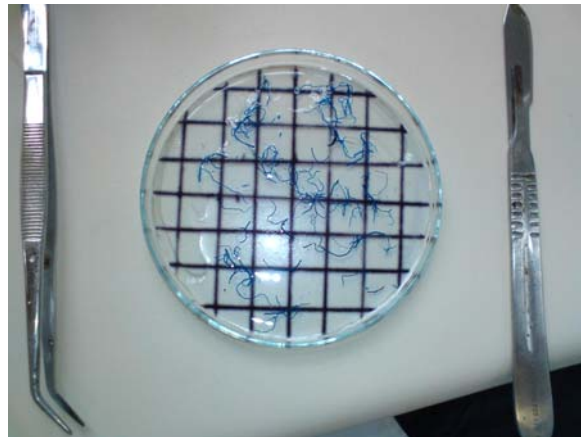


Figura 4 Raízes coradas e preparadas para a análise de taxa de colonização pelo método de Gridline

Excluído: r

Formatado: Fonte: 10 pt

Formatado: Recuo: A
esquerda: 0 cm,
Deslocamento: 1,25 cm

3.3 Extração de esporos

Excluído: 4

Como quantidade de esporos no solo não varia significativamente em uma semana, apenas foi analisado o solo das plantas que tiveram as raízes coletadas uma semana após a aplicação do P. Foi seguido protocolo de acordo com Gerdemann e Nicolson (1963) e Jenkins (1964).

As amostras de solo foram colocadas (100 g) em recipiente para imersão do solo em água, em seguida, foi feita uma suspensão por alguns segundos, seguido de decantação. A água onde o solo foi lavado foi passada por um conjunto de peneiras de 425 μm , sobreposta a uma de 53 μm .

Três lavagens do solo foram realizadas para cada amostra. O solo retido na peneira de 53 μm foi colocado em tubo de centrifuga de 50 mL, lavando-se com água destilada até que o volume fosse completado para 40 mL. Em seguida os esporos foram separados das partículas de solo em uma série 2 centrifugações. A 1ª centrifugação foi realizada com água a 3000 rpm por 4 minutos. Após a centrifugação, a água foi retirada e colocada uma solução com sacarose 60%. Os tubos contendo as amostras foram homogeneizados manualmente até que o solo se desprendesse das paredes e do fundo do mesmo, seguindo uma centrifugação a 1.000 rpm por 2 minutos.

O sobrenadante foi colocado em peneira de 53 μm e transferido para placas com canaletas para a contagem e identificação dos esporos (Figura 5).



Figura 5 Esporos de *Gigaspora margarita* observados em lupa após o processo de extração

Formatado: Fonte: 10 pt

Formatado: Recuo: A
esquerda: 0 cm,
Deslocamento: 1,25 cm

Excluído: 5

3.4. Análises estatísticas

Foi utilizado o programa SISVAR 4.3, da Universidade Federal de Lavras, para a realização das análises de variância dos dados não transformados e dos testes para comparação dos contrastes entre médias. As médias foram comparadas pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Densidade de esporos

A avaliação da densidade de esporos foi realizada nas amostras coletadas ao final do experimento visando comparar o estabelecimento das

estirpes. Os resultados obtidos na taxa de esporulação dos diferentes FMAs utilizados neste trabalho podem ser observados na Figura 6.

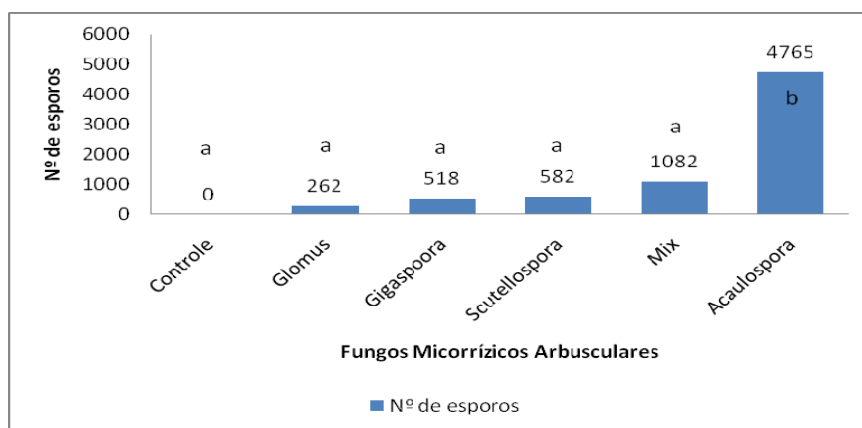


Figura 6 Número de esporos/100 g de solo de diferentes Fungos Micorrízicos Arbusculares avaliados conforme metodologia descrita por Gerdemann e Nicolson (1963) e Jenkins (1964). As letras iguais indicam que não houve diferença significativa a 5% de probabilidade pelo Teste Scott-Knott.

Os resultados da Figura 6 indicam que *Acaulospora* foi o gênero que mais esporulou sendo estatisticamente superior aos demais fungos estudados (Observar o quadro de análise de variância na Tabela 4 dos anexos). O fato de *Acaulospora* ter tido um alto número de esporos no solo já foi observado anteriormente, reforçando que espécies desse gênero possuem características intrínsecas de produção de grande número de esporos e ou alta adaptabilidade a solos com baixo pH, como sugerido por Siqueira, Colozzi-Filho e Oliveira (1989). Indicações de alta adaptabilidade desse gênero ao ecossistema cafeeiro já haviam sido obtidas por Lopes et al. (1983) e Siqueira, Colozzi-Filho e Oliveira (1989).

Formatado: Fonte: 10 pt

Formatado: Recuo: À esquerda: 0 cm, Deslocamento: 1,5 cm

Formatado: Fonte: 10 pt

Formatado: Recuo: À esquerda: 0 cm, Deslocamento: 1,5 cm, Espaçamento entre linhas: 1,5 linha

Excluído: ,

4.2 Colonização de raízes

Avaliou-se a porcentagem de colonização de raízes em duas épocas: uma imediatamente após a aplicação de P e a outra uma semana após a aplicação de P. O gráfico da Figura 7 foi obtido por meio da média dos intervalos de tempos de aplicação de P, pois esses intervalos de tempo não diferiram estatisticamente.

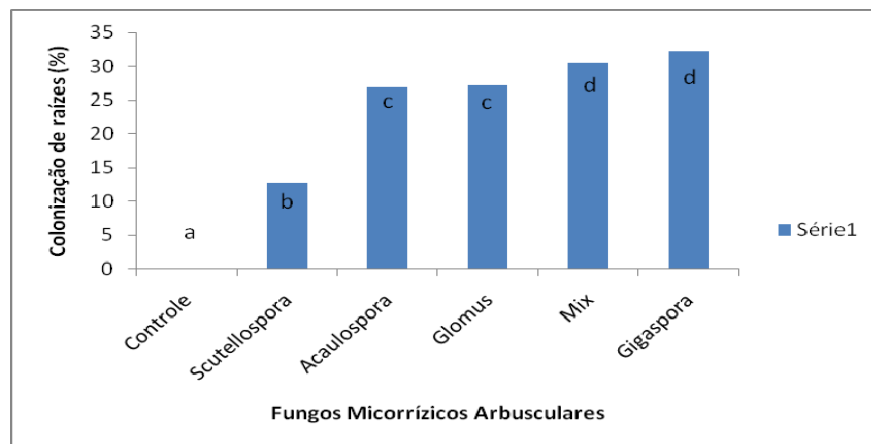


Figura 7 Porcentagem de colonização de raízes de cafeeiro inoculado com diferentes gêneros de Fungos Micorrízicos Arbusculares. As letras indicam que houve diferença significativa a 5% de probabilidade pelo Teste Scott-Knott.

Gigaspora foi estatisticamente igual ao *mix* de fungos podendo ser essa uma evidência da colonização superior por *Gigaspora* também no *mix*. *Glomus* e *Acaulospora* também foram equivalentes não superando a mistura e a *Gigaspora*, mas superando a *Scutellospora* que foi superior ao controle, sendo essas plantas não inoculadas, por isso não apresentaram colonização (Observar o quadro de análise de variância na Tabela 5 dos anexos).

Excluído: ,

Excluído: (1)

Formatado: À direita, Recuo: Deslocamento: 1,4 cm

Formatado: Fonte: 10 pt

Formatado: Recuo: À esquerda: -0,15 cm, Deslocamento: 1,4 cm

Excluído: .

Formatado: Fonte: 10 pt

Formatado: Espaçamento entre linhas: 1,5 linha

Formatado: Recuo: Primeira linha: 1,25 cm

Formatado: Fonte: Itálico

Formatado: Fonte: Itálico

A porcentagem de colonização das raízes está frequentemente relacionada com o grau de afinidade de determinados Fungos Micorrízicos Arbusculares com a espécie vegetal. As características edafoclimáticas e também as propriedades físicas do solo, podem ser alteradas por práticas culturais influenciando na diversidade e na colonização (SIQUEIRA et al., 1987).

Excluído: , que

Em solos com pH > 6,5 o gênero *Gigaspora* é menos frequente (SIQUEIRA; COLOZZI-FILHO; OLIVEIRA, 1989). Lopes et al. (1983) concluíram que em solos com pH variando de 4,7 a 6,9 não houve relação dessa variável com a ocorrência de *Acaulospora* e que espécies de *Glomus* são mais frequentes em solos com pH < 5,0. O pH do solo não foi aferido, mas esses resultados podem indicar uma diferença na colonização devido a esse fator, indicando uma faixa de pH menor que 6,5, mas não inferior a 5,0 que pode estar indicando esta diferença na taxa de colonização. Esses quatro gêneros são encontrados em florestas de café na Etiópia, local de origem do café, com *Glomus* sendo o gênero dominante, seguido por *Gigaspora*, *Acaulospora*, *Entrophospora* e *Scutellospora* (MULETA et al., 2007). Isso pode indicar uma especificidade entre planta e simbiote. Essa especificidade poderia ser afetada, já que *Glomus* não foi superior a *Gigaspora*, e esse fator pode ser o pH já que *Glomus* se equivale a *Acaulospora* indicando assim uma faixa de pH desse solo favorável a *Gigaspora*.

Excluído: n

4.3 Peso foliar

A Figura 8 mostra o acúmulo de matéria seca foliar entre os diferentes tratamentos, sendo mostradas as médias dos intervalos de tempo sem aplicação de P e 5 horas após a aplicação de P, devido ao fato deles não serem diferentes estatisticamente.

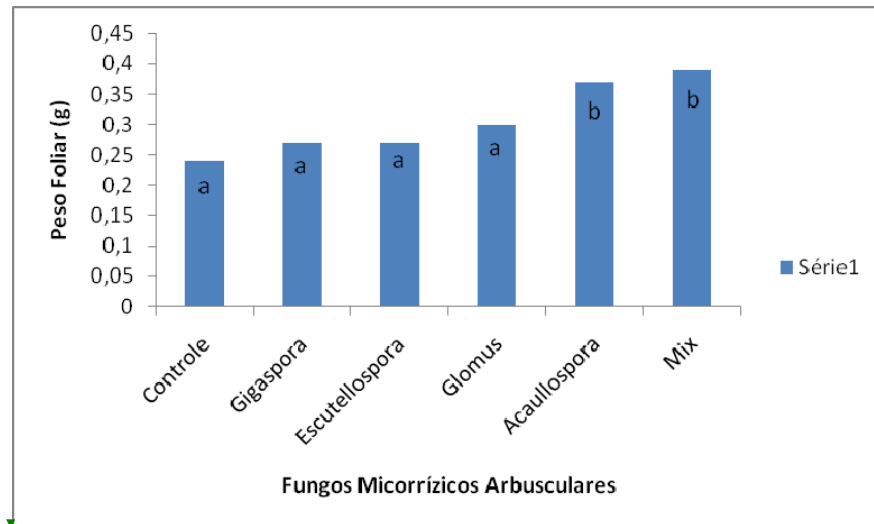


Figura 8 Matéria seca foliar (g) de mudas de café inoculadas com diferentes gêneros de Fungos Micorrízicos Arbusculares. As letras indicam que houve diferença significativa a 5% de probabilidade pelo Teste Scott-Knott

Pode ser observado que o tratamento com *mix* foi estatisticamente semelhante ao tratamento com *Acaulospora* e foram superiores aos demais tratamentos (Observar o quadro de análise de variância na Tabela 2 dos anexos). Isto pode ser indício de um maior acúmulo de biomassa. Stümer (1998) verificou aumento de biomassa de plantas com isolados fúngicos em soja, e Heijden et al. (1998) também verificaram esse aumento em espécies de pradarias. Todos esses quesitos estão muito relacionados: peso foliar, área foliar, matéria seca e área foliar específica, todos podendo ser assim, um reflexo de aumento de biomassa devido a uma melhor alocação de água e nutrientes.

4.4 Área foliar e matéria seca

Excluído: ¶

Formatado: Fonte: 10 pt

Excluído: e

Formatado: Fonte: 10 pt

Formatado: Recuo: A esquerda: 0 cm, Deslocamento: 1,25 cm

Excluído: ¶

Formatado: Espaçamento entre linhas: 1,5 linha

Formatado: A esquerda, Recuo: A esquerda: 0 cm

Formatado: Fonte: Itálico

Excluído: ,

As Figuras 9 e 10 apresentam gráficos com as médias dos intervalos de tempo de aplicação de P, sem P e 5 horas após a aplicação de P, já que eles não diferiram estatisticamente. O quadro de análise de variância está apresentado nas Tabelas 1 e 3 (anexos).

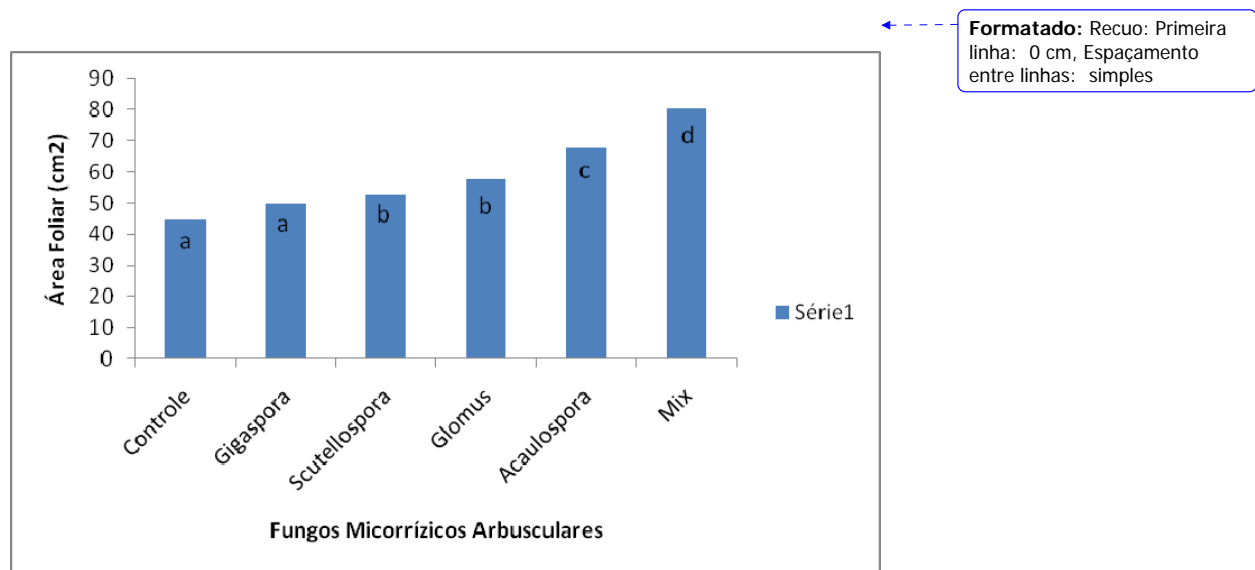


Figura 9 Área foliar (cm²) de mudas de café sob a influência de diferentes gêneros de Fungos Micorrízicos Arbusculares. As letras indicam que houve diferença significativa a 5% de probabilidade pelo Teste Scott-Knott

O tratamento com o *mix* proporcionou o melhor resultado de área foliar, sendo que este parâmetro pode ter sido influenciado nesse tratamento pelos diversos tipos de fungo. Desta forma, quando um isolado não era efetivo para auxiliar na absorção de água e nutrientes, outro isolado poderia estar executando essa função. *Acaulospora* ficou em segundo seguido de *Glomus* e *Scutellospora* que foram estatisticamente equivalentes e superiores a *Gigaspora* e ao controle, que também foram equivalentes entre si. A medida de área foliar pode estar associada à questão de absorção de nutrientes juntamente com a matéria seca.

Isso nos permite dizer que não houve interação entre a taxa de colonização, que foi maior em *Gigaspora*, e a área foliar. *Gigaspora* foi mais eficiente na colonização, mas obteve resultados de área foliar parecidos com o controle que não foi inoculado.

Alterações na fisiologia das folhas e em propriedades intrínsecas hidráulicas ou bioquímicas (AUGÉ, 2001) podem ocorrer devido a estresse hídrico e a outros fatores. Isso nos permite inferir que *Acaulospora* pode ser mais eficiente no transporte de água e nutrientes do que os outros gêneros de fungo.

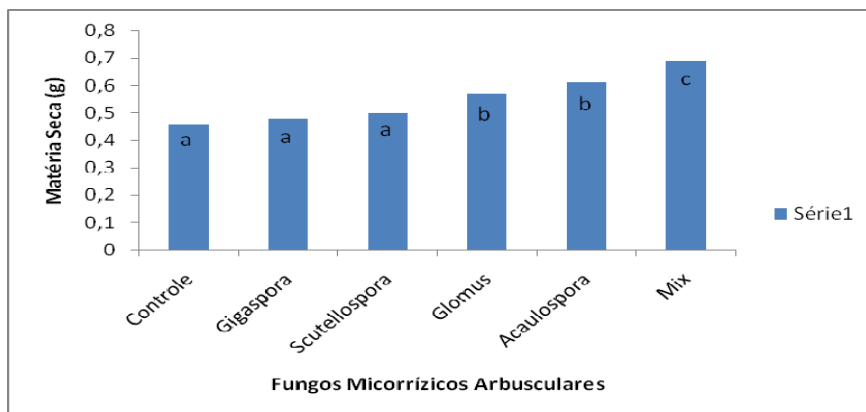


Figura 10 Matéria Seca (g) da parte aérea sob influência de diferentes gêneros de Fungos Micorrízicos Arbusculares. As letras indicam que houve diferença significativa a 5% de probabilidade pelo Teste Scott-Knott

Igualmente como encontrado para área foliar o *mix* foi superior aos outros tratamentos, demonstrando que mesmo um gênero não sendo eficiente outro poderá ser, ou até mesmo pode haver competição desses pela colonização da planta.

Excluído: ,

Formatado: Recuo: À esquerda: 0 cm, Deslocamento: 1,5 cm

Formatado: Fonte: 10 pt

Formatado: Recuo: À esquerda: 0 cm, Deslocamento: 1,4 cm

Excluído: *M*

Formatado: Fonte: Itálico

Acaupospora foi equivalente ao *Glomus* o que não foi observado para área foliar e *Scutellospora* e *Gigaspora* foram equivalentes ao controle. Todos esses resultados ainda podem estar sob influência de fatores nutricionais, como observado por Vaast e Zasoski (1992) e hídricos observados por Augé (2001).

Essa diferença entre os tratamentos pode ser explicada por uma maior eficiência no transporte de nutrientes, tendo como exemplo o P, que já foi verificado por Heijden et al. (1998) num acúmulo de biomassa em espécies de pradarias calcáreas em isolados sozinhos ou em conjunto (mix). Streitwolf-Engel et al. (1997) observaram que um isolado de *Glomus* aumentou o número de folhas, ramificações do estolão e o comprimento total dos estolões de *Prunella vulgaris*. Stüner (1998) analisou a eficiência de isolados fúngicos de comunidades distintas e demonstrou que em pelo menos uma o acúmulo de biomassa e área vegetal aumentou em soja.

Como discutido em outros tópicos, o *mix* pode associar as capacidades distintas dos diferentes gêneros obtendo assim, melhores resultados.

Formatado: Fonte: Itálico

5 CONCLUSÕES

Os resultados indicaram uma melhor performance das plantas micorrizadas com a mistura de fungos, mesmo havendo também diferenças entre os gêneros de FMAs, quando inoculados isoladamente. Para área foliar, peso foliar e matéria seca, que normalmente estão relacionados com uma melhor absorção de água e nutrientes, as plantas micorrizadas com a mistura de fungos foram superiores a todos os outros tratamentos, indicando um melhor maquinário nessas plantas para esta absorção. Os tempos de aplicação de P não influenciaram nos resultados devido ao baixo intervalo dessas aplicações, diferindo assim, apenas os tratamentos com os diferentes gêneros de fungos micorrízicos arbusculares.

Excluído: a

Isso é importante para um posterior estudo de inóculos para mudas de plantas de café, propiciando um uso mais racional dos recursos de nutrição das plantas e também deixando-as mais propícias para um transplante para o campo.

Excluído: n

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, S. A. L. et al. Arbuscular mycorrhizal association in coffee. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 147, n. 2, p. 1-11, Apr. 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ. **A história do café: origem e trajetória**. Disponível em: <http://www.abic.com.br/scafe_historia.html>. Acesso em: 10 jan. 2010.
- AUGÉ, R. M. Water relations, drought and vesiculararbuscular mycorrhizal symbiosis. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 11, n. 1, p. 3-42, Jan. 2001.
- AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J. M. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens: an overview of the mechanisms involved. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 6, n. 6, p. 457-464, Feb. 1996.
- BENHAMOU, N. et al. Resistance response of mycorrhizal Ri T-DNA transformed carrot roots to infection by *Fusarium oxysporum* f sp. *chrysanthemi*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n. 9, p. 958-968, Sept. 1994.
- BEVER, J. D. Negative feedback within a mutualism: host-specific growth of mycorrhiza fungi reduces plants benefit. **Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences**, London, v. 269, n. 1509, p. 2595-2601, Dec. 2002.
- BOLAN, N. S. A critical-review on the role of mycorrhiza fungi in the uptake of phosphorus by plants. **Plant & Soil**, The Hague, v. 134, n. 2, p. 189-207, July 1991.
- CAMPOS, V.; LIMA, R. D.; ALMEIDA, V. F. Nematóides parasitas do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 26, p. 50-58, 1985.

CARDOSO, I. M. et al. Distribution of mycorrhizal fungal spores in soils under agroforestry and monocultural coffee systems in Brazil. **Agroforestry Systems**, Heidelberg, v. 58, n. 1, p. 33-43, May 2003.

CHAVES FILHO, J. T. **Novos paradigmas na fisiologia do cafeeiro.**

Disponível em: <<http://www2.ucg.br/flash/artigos/070904cafe2.html>>. Acesso em: 10 jan. 2010.

COLOZZI-FILHO, A.; CARDOSO, E. J. B. N. Detecção de fungos micorrízicos arbusculares em raízes de cafeeiro e de crotalaria cultivada na entrelinha.

Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 35, n. 10, p. 2033-2042, out. 2000.

COSTA, C. M. C. et al. Inoculum density of arbuscular mycorrhizal fungi needed to promote growth of *Hancornia speciosa* Gomes seedlings. **Fruits**, Paris, v. 58, n. 5, p. 247-254, Sept./Oct. 2003.

DAMATTA, F. M. Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 86, n. 2/3, p. 99-114, Mar. 2004.

DAVIES, F. T. et al. Non-nutritional stress acclimation of mycorrhizal woody plants exposed to drought. **Tree Physiology**, Victoria, v. 16, n. 11/12, p. 985-993, Dec. 1996.

DUFF, S. M. G.; SARATH, G.; PLAXTON, W. C. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. **Physiology Plantum**, Oxford, v. 90, n. 4, p. 791-800, Apr. 1994.

FITTER, A. H. Darkness visible: reflections on underground ecology. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 93, n. 2, p. 231-243, Apr. 2005.

GERDMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 46, n. 2, p. 235-244, June 1963.

GIANINAZZI-PEARSON, V. et al. Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Cambridge, v. 133, n. 1, p. 45-57, Apr. 1996.

GOMES-JUNIOR, R. A. et al. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, n. 8, p. 1330-1337, Nov. 2006a.

_____. Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 44, n. 5/6, p. 420-429, May/June 2006b.

HEIJDEN, M. G. A. van der et al. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. **Nature**, London, v. 396, n. 4056, p. 69-72, Nov. 1998.

JEFFRIES, P. et al. The contribution of arbuscular mycorrhiza fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. **Biology & Fertility of Soils**, Berlin, v. 37, n. 1, p. 1-16, Jan. 2003.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 48, n. 1, p. 692-696, Dec. 1964.

LASHERMES, P. et al. Molecular characterization an origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular and General Genetics**, London, v. 261, n. 1, p. 259-266, Jan. 1999.

LOPES, E. S. et al. Occurrence and distribution of vesiculararbuscular mycorrhizal fungi in coffee (*Coffea arabica* L.) plantations in central São Paulo State, Brazil. **Turrialba**, San José, v. 33, n. 4, p. 417-422, 1983.

MOREIRA, F. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 626 p.

MULETA, D. et al. Composition of coffee shade tree species and density of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) spores in Bonga natural coffee forest, southwestern Ethiopia. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 241, n. 1/3, p. 145-154, Mar. 2007.

MUSCHLER, R. G. Shade improves coffee quality in a sub-optimal coffee zone of Costa Rica. **Agroforestry Systems**, Heidelberg, v. 51, n. 2, p. 131-139, Jan. 2001.

NART, L. A ubiquitous stress factor for photosynthesis, photosynthetic plant tissue by ADP glucose pyrophosphorylase. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 158, n. 11, p. 287-289, Nov. 1992.

OLSSON, P. A.; WILHELMSSON, P. The growth of external AM fungal mycelium in sand dunes and in experimental systems. **Plant & Soil**, The Hague, v. 226, n. 2, p. 161-169, Nov. 2000.

PORCEL, R. et al. Impairment of NtAQP1 gene expression in tobacco plants does not affect root colonisation pattern by arbuscular mycorrhizal fungi but decreases their symbiotic efficiency under drought. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 15, n. 6, p. 417-423, Sept. 2005.

POULSEN, K. H. et al. Physiological and molecular evidence for Pi uptake via the symbiotic pathway in a reduced mycorrhizal colonization mutant in tomato associated with a compatible fungus. **New Phytologist**, Cambridge, v. 168, n. 2, p. 445-453, Aug. 2005.

REQUENA, N. Measuring quality of service: phosphate 'a` la carte' by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Cambridge, v. 168, n. 2, p. 268-271, Nov. 2005.

Excluído: ¶

RILLIG, M. C. et al. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. **Plant & Soil**, The Hague, v. 233, n. 12, p. 167-177, Dec. 2001.

RILLIG, M. C.; MUMMEY, D. L. Mycorrhizas and soil structure. **New Phytologist**, Cambridge, v. 171, n. 1, p. 41-53, Jan. 2006.

RIVERA, R. F. et al. **El manejo efectivo de la simbiosis micorrizica, una vía hacia la agricultura sostenible**: estudio de caso. Ciudad de La Habana: INCA, 2003. 166 p.

SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SIQUEIRA, J. O. Avaliação da deficiência simbiótica de fungos endomicorrízicos para o cafeeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 19, n. 4, p. 221-228, out./dez. 1995.

SANCHEZ, C. et al. Efecto de 15 cepas de hongos micorrizógenos (HMA) sobre la producción de posturas de cafetos en tres tipos de suelos del macizo montañoso Guamuhaya. In: SIMPOSIO LATINOAMERICANO DE CAFICULTURA, 19., 2000, San José. **Anales...** San José: ICAFE, 2000. p. 287-331.

SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 12, p. 1413-1421, Dec. 2001.

SCHWEIGER, P.; JAKOBSEN, I. Laboratory and field methods for measurement of hyphal uptake of nutrients in soil. **Plant & Soil**, The Hague, v. 226, n. 2, p. 237-244, Nov. 2000.

SIQUEIRA, J. O.; COLOZZI-FILHO, A.; OLIVEIRA, E. Ocorrência de micorrizas vesicular-arbusculares em agro e ecossistemas do estado de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 12, p. 1499-1506, dez. 1989.

SIQUEIRA, J. O. et al. Arbuscular mycorrhizal inoculation and superphosphate application influence plant development and yield of coffee in Brazil. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 7, n. 6, p. 293-300, May 1998.

_____. Micorrizas vesicular-arbusculares em mudas de cafeeiro produzidas no sul do Estado de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 31-38, jan. 1987.

SOUZA, F. A. de. **Banco ativo de Glomales da Embrapa Agrobiologia:** catalogação e introdução de novos isolados desde 1995. Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia, 2000. 40 p. (Documentos, 123).

STRACK, D. et al. Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical and molecular aspects. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 29, n. 9, p. 1955-1979, Sept. 2003.

STREITWOLF-ENGEL, R. et al. Clonal growth traits of two prunella species are determined by co-occurring arbuscular mycorrhizal fungi from a calcareous grassland. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 85, n. 11, p. 181-191, Nov. 1997.

STÜNER, S. L. **Characterization of diversity of fungi forming arbuscular endomycorrhizae in selected plant communities.** 1998. 94 p. Thesis (Ph.D. in Philosophy in Developmental Biology) - West Virginia University, Morgantown, 1998.

SYLVIA, D. M. Fundamentals and applications of arbuscular mycorrhizae: a 'biofertilizer' perspective. In: SIQUEIRA, J. O. et al. (Ed.). **Soil fertility, biology, and plant nutrition interrelationships.** Viçosa, MG: SBCS; Lavras: UFLA/DCS, 1999. p. 705-723.

TRISTÃO, F. S. M.; ANDRADE, S. A. L.; SILVEIRA, A. P. D. Arbuscular mycorrhizal fungi on the development of coffee plantlets using different organic substrates. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 4, p. 649-658, 2006.

VAAST, P.; CASWELL-CHEN, E. P.; ZASOSKI, R. J. Influences of a root-lesion nematode, *Pratylenchus coffeae*, and two arbuscular mycorrhizal fungi,

Excluído: ¶
¶

Acaulospora mellea and Glomus clarum on coffee (*Coffea arabica* L.). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 26, n. 2, p. 130-135, Dec. 1998.

VAAST, P.; ZASOSKI, R. J. Effects of mycorrhizae and nitrogen sources on rhizosphere soil characteristics, growth and nutrient acquisition of coffee seedlings (*Coffea arabica* L.). **Plant & Soil**, The Hague, v. 147, n. 1, p. 31-39, Nov. 1992.

YOUNG, A. **Agroforestry for soil management**. Wallingford: CAB International, 1997. 320 p.

CAPÍTULO 3

Identificação de genes que codificam proteínas transportadoras de fósforo em café (*Coffea* spp.)

- Excluído: G
- Excluído: C
- Excluído: P
- Excluído: T
- Excluído: F
- Excluído: C

- Excluído: ¶
¶
¶
- Formatado: À esquerda

RESUMO

As limitações das reservas naturais de fósforo preocupam e fazem com que alternativas como associações com micorrizas sejam estudadas. A ligação entre essas associações com espécies vegetais pode trazer benefícios como ativação de genes transportadores de P da família Pht1. Análises *in silico* podem ser utilizadas com sucesso para identificação e caracterização desses genes. Foram realizadas buscas por meio de palavras-chave (*Phosphate transport*) e análises de tBlastn com a sequência de MtPT4 (*M. truncatula*) e com a sequência do domínio conservado Pht1(LCFFRFWLGF~~GIGGDYPLSATIMSEY~~ ANK) no banco de dados do CAFEST, gerado pelo projeto Genoma Brasileiro do Café. Esses *reads* são oriundos de bibliotecas de ESTs de *Coffea* spp. e, por meio do PLACE foi feita uma análise da região promotora, sendo identificadas regiões conservadas para indução de associação e de transporte de Pi. Utilizando-se um banco de dados com resultados preliminares de sequências genômicas do cafeeiro, foram realizadas análises de *blastn*, visando-se a identificação da cópia genômica dos contigs de EST, identificados (Contig 123, Contig 249-1263, Contig 1001 e Singlet NS1). Foi realizado um alinhamento pelo ClustalW e todos os *contigs* de ESTs foram identificados como membros da família Pht1.

Excluído:

Formatado: Fonte: Itálico

Excluído: *reads*

Formatado: Fonte: Itálico

Formatado: Fonte: Itálico

Formatado: Fonte: Itálico

Palavras-chave: Fósforo. Associações. Transportadores. Genes. TBlastn.

Excluído:

Formatado: Inglês (EUA)

ABSTRACT

The limitations of phosphorus natural reserves concerns and make alternatives such as associations with mycorrhizae to be studied. The link between these associations with plant species may have benefits such as activation of P genes transporters of Pht1 family. *In silico* analysis can be successfully used for identification and characterization of these genes. Searches were carried out by means of keywords (Phosphate transport) and tBlastn analysis with the sequence of MtPT4 (*M. truncatula*) and with the sequence of conserved domain Pht1 (LCFFRFWLGFYGIGGDYPLSATIMSEYANK) in the CAFEST database generated by the Brazilian Coffee Genome Project. These reads were from EST libraries of *Coffea spp.* and, through PLACE an analysis of promoter region was carried out and allowed the identification of conserved regions probably able to induce association and transport of Pi. Using a database with preliminary results of coffee genomic sequences, Blastn analysis were realized aiming to characterize the genomic copy of the EST contigs, identified (Contig 123, Contig 249-1263, Contig 1001 and NS1 Singlet). An alignment was performed by ClustalW and all contigs of ESTs were identified as Pht1 family members.

Keywords: Phosphorus. Associations. Transporters. Genes. ESTs.

1 INTRODUÇÃO

Devido às limitações das reservas naturais e condições de nutrição das culturas no Brasil, dentre elas o café, a abordagem da escassez de fósforo vem sendo amplamente discutida. O fósforo é um nutriente finito, insubstituível e indispensável à vida. Alguns autores estimam que em cem anos as reservas de rochas de fosfato do mundo estarão esgotadas e devido a isso, estudos para um melhor uso desse recurso estão sendo realizados.

Excluído: n

Uma das estratégias para amenizar o problema da nutrição do fósforo (P) pelas plantas seria a identificação dos componentes regulatórios envolvidos na sinalização de Pi, e sua utilização no desenvolvimento de cultivares mais eficientes na remoção de fósforo do solo e na sua utilização, contornando o problema de défice nutricional (ABEL; TICCONI; DELATORRE, 2002).

Excluído: it

Outra alternativa para melhorar o uso de Pi nos cultivos vegetais é a utilização de associação com fungos micorrízicos (FMAs), que por meio de suas hifas conseguem captar Pi no solo e translocar para a planta. Existem diversos gêneros que fazem associações com o café, dentre os quais se encontram *Glomus*, *Acaulospora*, *Scutellospora*, *Gigaspora* e outros (MULETA et al., 2007).

Excluído: -se

A troca de nutrientes é uma característica essencial para a ocorrência de simbiose entre FMAs e as plantas. Os fungos micorrízicos obtêm carbono da planta hospedeira enquanto assistem as plantas na aquisição de fósforo (como fosfato) do solo (BOLAN, 1991). Na simbiose de FMAs, os fungos fornecem Pi às raízes por meio de hifas especializadas chamadas arbúsculos.

Os mecanimos moleculares envolvidos na transferência de carbono e fósforo nas associações micorrízicas são desconhecidos, assim como os mecanismos pelos quais as plantas respondem à simbiose em função do seu estado nutricional. Entretanto, a principal barreira para qualquer evento de

transporte é a membrana plasmática e por isso o transporte da maioria dos compostos através da membrana é mediado por proteínas integrais com funções de transporte especializado (ANDRADE et al., 1999). Estudos recentes indicam que a associação de FMAs induz a expressão de vários genes da família Pht1 pertencente à superfamília MFS (*Major Facilitator Superfamily*), em diferentes espécies vegetais (CHEN et al., 2007; NAGY et al., 2005).

Formatado: Fonte: Itálico

Transportadores da superfamília (MFS) são amplamente conhecidos por facilitarem o carreamento de nutrientes na planta sendo alvo de diversos trabalhos. O Pht1, transportador de membrana, Pht2, transportador de cloroplasto e Pht3 transportador de mitocôndrias são famílias desta superfamília. Esses transportadores são do sistema de transporte ativo secundário e transportam solutos utilizando o cotransporte de prótons (H⁺), via um gradiente eletroquímico de membrana gerado com o uso de ATP para o transporte de Pi.

Dentro da família Pht1 existem transportadores de alta afinidade, baixa afinidade e também os induzidos por micorriza que na presença da associação são altamente expressos. Além disso, a disponibilidade de Pi também afeta a expressão gênica de transportadores Pht1, sendo que os transportadores de baixa afinidade são expressos em condições elevadas de P e os de alta afinidade, onde se incluem os induzidos por micorriza, normalmente expressos na deficiência do nutriente (JAVOT; PUMPLIN; HARRISON, 2007).

Estudos filogenéticos de genes transportadores Pht1, propõem uma subdivisão em 4 subfamílias, sendo que os genes da subfamília I são expressos especificamente na presença FMAs. Além disso, um trabalho com o gene MtPT4 (Pht1-Subfamília I), de *Medicago truncatula*, concluiu que esse transportador é essencial para a aquisição do Pi fornecido pelo FMA *Glomus vesiforme*. Nesse mesmo trabalho, de maneira surpreendente, verificou-se que a função do transportador MtPT4 é crucial para a ocorrência da simbiose, pois a análise de plantas transgênicas com perda de função do MtPT4, mostraram que

Excluído: ô

houve morte prematura dos arbúsculos, baixa proliferação do fungo dentro das raízes, resultando no término da simbiose. Dessa forma, os autores concluíram que o transporte de Pi não é somente um benefício para a planta mas também um pré-requisito para a ocorrência de simbiose (JAVOT; PUMPLIN; HARRISON, 2007).

Excluído:

Para um melhor entendimento dos genes e de outros mecanismos fisiológicos do café, o Projeto Genoma Café veio possibilitar a construção de um banco de dados Unigene com mais de 33.000 genes distintos, a partir de 250 mil ESTs de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa*. Essa Base de Dados fornece informações para estudos de identificação e caracterização de genes que podem auxiliar no melhoramento genético do cafeeiro (VIEIRA et al., 2006). Além disso, as novas tecnologias de sequenciamento têm proporcionado maior rapidez e menor custo na geração de sequências e novos projetos de sequenciamento genômico estrutural estão em andamento, incluindo o do café (LASHERMES; ANDRADE; ETIENNE, 2008).

Excluído: á

A existência de um banco de dados sobre o genoma do café permite a realização de estudos moleculares das interações simbióticas entre plantas e micro-organismos. Dentre as interações simbióticas formadas pelo café, as micorrizas arbusculares (MAs) possuem importância destacada pois podem aumentar a absorção de Pi de solos distróficos.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi o de realizar uma busca na Base de Dados do Genoma Café visando a identificação de genes com alta similaridade a transportadores de Pi, da família Pht1, previamente descritos e caracterizados em outras espécies vegetais. Posteriormente, foi realizada uma comparação entre as sequências protéicas dos genes transportadores de Pi encontrados no café com outros genes transportadores de Pi já caracterizados em outras espécies vegetais.

Excluído: -se

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Mecanismos de utilização e absorção de fósforo em plantas

O fósforo (P) é um macronutriente absorvido principalmente na forma de P inorgânico (Pi), a partir da sua forma primária $H_2PO_4^-$, extremamente insolúvel em muitos solos devido à reação com outros minerais (ABEL; TICCONI; DELATORRE, 2002).

Investigações fisiológicas revelaram a existência de dois mecanismos de absorção de Pi, um de baixa afinidade, expresso constitutivamente na disponibilidade de Pi (50 - 800 μM), e outro de alta afinidade, induzido em baixas concentrações de Pi (1-10 μM), otimizando e aumentando a absorção de Pi nas raízes (RAGHOTHAMA, 1999).

A capacidade de aquisição de P do solo pela planta baseia-se na superior habilidade para capturar Pi do solo. Essa se dá, entre outras razões, pela alteração na morfologia ou arquitetura da raiz, aumentando a proporção de superfície da raiz, consequentemente, aumentando a exploração do solo. A absorção de P pelas plantas é proporcional à densidade das raízes. Isso reflete em aumento da proporção raiz-parte aérea, no número de raízes laterais e no número e tamanho dos pelos radiculares (KOCHIAN et al., 2004).

Excluído: e o volume de solo,

Em condições fisiológicas normais, existe um requerimento energético grande para o transporte de Pi do solo para a planta, que se dá através da membrana plasmática devido à alta concentração de Pi no citoplasma e ao potencial negativo da membrana característico das células vegetais.

Excluído: e

Dessa forma, a absorção de Pi do solo pelas plantas ocorre por meio de um processo de cotransporte com próton (H^+), via um gradiente eletroquímico de membrana gerado com o consumo de ATP (SAKANO, 1990). Análises cinéticas propõem dois mecanismos de absorção de Pi, compostos por dois

sistemas cineticamente diferentes de absorção: transporte de alta afinidade e de baixa afinidade (FURIHATA; SUZUKI; SAKURAI, 1992; SCHACHTMAN; REID; ALING, 1998) ou baixa (μM) e alta (mM) concentração de Pi no meio externo, respectivamente.

Excluído:

Em solos com deficiência de Pi, o sistema de transporte de alta afinidade é bastante funcional nas raízes (AONO et al., 2001). Transportadores de alta afinidade são proteínas integrais de membrana que translocam Pi do meio contendo concentrações μM para o citoplasma (CHEN et al., 2008; RAGHOTHAMA, 1999).

Excluído:

2.2 Famílias de genes transportadores de fosfato

As plantas possivelmente exploram dois sistemas de transportadores de P, sendo um de baixa afinidade e outro de alta afinidade (ALMEIDA, 2002).

Genes transportadores de Pi são codificados por uma grande família de genes no genoma, esses genes são chamados de PHT (*Phosphate High Transporters*). Em *Arabidopsis*, oito de nove transportadores de Pi são expressos na raiz (MUDGE et al., 2002).

A seguir serão discutidas as principais características a respeito dos genes transportadores de baixa e alta afinidade.

De forma geral, até o presente, pouco se sabe sobre a natureza e a função dos transportadores de baixa afinidade (RAGHOTHAMA, 1999).

Um transportador de baixa afinidade, que possui similaridade de sequência com transportadores de Pi dependente de sódio de *Saccharomyces cerevisiae* e *Neurospora crassa* foi identificado em *Arabidopsis* (ALMEIDA, 2002; DARAM et al., 1999). Esse gene Pht2;1 está presente em apenas uma cópia no genoma de *Arabidopsis*, e codifica uma proteína de 12 domínios conservados, separados por uma sequência peptídica hidrofílica entre os domínios 8 e 9. Possui ainda, duas sequências consenso de 8 e 9 aminoácidos

nas extremidades amino e carboxílicas, respectivamente, altamente conservada entre bactérias, fungos, plantas e animais. O gene Pht2;1 é expresso nas folhas independente do status de Pi na parte aérea da planta e na raiz, provalmente envolvido no transporte de Pi nesses órgãos (ALMEIDA, 2002; DARAM et al., 1999).

Excluído: o

O isolamento de genes de plantas que codificam transportadores de fosfato (TP), similares aos encontrados em leveduras e fungos, deu origem à família Pht-1 de transportadores de fosfato que atuam na absorção, transporte e reciclagem de Pi na planta (ALMEIDA, 2007).

Os transportadores de fosfato de alta afinidade de plantas possuem maior similaridade de sequência com esses transportadores de levedura e *N. crassa*, associados ao cotransporte de prótons e foram identificados principalmente a partir de raízes de diversas dicotiledôneas (HARRISON; DEWBRE; LIU, 2002).

Nesse sentido, a finalização do sequenciamento do genoma da *Arabidopsis* permitiu a identificação de nove genes com provável função de transportadores de fosfato de alta afinidade, denominados de Pht1-1 a Pht1-9 (MUDGE et al., 2002).

A dinâmica do transporte de fosfato em plantas demonstrou que o status de P na planta desencadeia a regulação de expressão de membros da família Pht-1 envolvidos na aquisição de Pi pelas raízes (KARANDASHOV; BUCHER, 2005).

Outras pesquisas em plantas, como tomateiro, batata, fumo, arroz, *Hordeum vulgare*, *Betula pendula*, *Medicago truncatula*, milho, vêm mostrando que transportadores de fosfato radiculares possuem respostas similares aos genes Pht-1;1 e Pht-1;2 de *Arabidopsis* (ALMEIDA, 2007; SMITH, 2002), ou apresentam expressão constitutiva ou induzida pela deficiência de Pi, ou ainda serem induzidos pelo efeito da simbiose com

micorriza arbusculares (ALMEIDA, 2007). Em arroz, no mínimo 10 dos transportadores Pht-1 são expressos na raiz (PASZKOWSKI et al., 2002).

A partir do complemento funcional de mutantes de leveduras deficientes para o transporte de Pi, surgiu a oportunidade para o isolamento e caracterização de novos transportadores de fosfato (TP) de diversas plantas (ALMEIDA, 2007): *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum*, *Catharanthus roseus*, *Lycopersicon esculentum*, *Medicago truncatula*, *Hordeum vulgare*, *Saccharum* spp., *Oryza sativa* e no presente trabalho, o café.

Muitos genes envolvidos na resposta à deficiência de Pi têm sido clonados, e demonstram a importância do controle transcricional e pós-transcricional, como exemplo de fatores de transcrição e micro RNAs. Em plantas, o sistema regulatório para a deficiência de Pi é complexo e começa a ser elucidado. Há evidência de uma complexa resposta transcricional, envolvimento de transdução de hormônios no controle e resposta de deficiência de Pi e a existência de uma regulação dependente do status de Pi local e sinais de longa-distância (DELATORRE et al., 2004).

Os transportadores de fosfato de alta afinidade já clonados e caracterizados consistem de proteínas integrais de membrana do tipo *multipass*, compostas por doze domínios transmembranares separados em dois grupos de seis, por meio de uma região peptídica hidrofílica. Essas são características específicas de proteínas transportadoras de açúcares, íons, antibióticos e aminoácidos (HENDERSON, 1993).

Em *M. truncatula* e batata, foram claramente demonstrados que MtPT1/MtPT2 e StPT1/StPT2 não estão envolvidos no transporte de fosfato mediado por simbiose com micorrizas arbusculares (FMAs), uma vez que esses transportadores são desativados rapidamente com o desenvolvimento da relação simbiótica (CHIOU; LIU; HARRISON, 2001).

Excluído: a

Segundo Delatorre (2002), o gene Pdr-1 parece codificar um componente regulatório da expressão gênica em resposta à limitação de P, uma vez que esse apresenta mais de 20 genes responsivos a Pi com menor expressão; já o gene Pdr-2 parece codificar um componente de alta afinidade da sinalização de Pi externo, devido ao fato de plantas Pdr-2 apresentarem um crescimento radicular lento, condicionado à limitação de P, havendo inibição da divisão celular no meristema primário radicular (TICCONI et al., 2004).

Em Arabidopsis, o gene Pho-1 apresenta taxas normais de absorção de Pi do solo para as raízes, mas tem prejudicada a habilidade de carregar Pi via xilema, sendo deficiente na sua translocação (POIRIER et al., 1991). Já o Pho-2 apresenta possivelmente defeito nos genes que percebem e regulam o status de Pi, pois o acumula em níveis tóxicos na parte aérea, além de apresentar exagerada resposta na arquitetura radicular (WILLIAMSON et al., 2001).

Outro mutante, Pup-1, apresenta problemas em relação ao controle enzimático através de coloração histoquímica, mostrou-se deficiente apenas na secreção de fosfatases ácidas e, em nenhuma outra resposta, à limitação de Pi (TRULL; DEIKMAN, 1998).

Esses estudos evidenciam que boa parte dos transportadores de alta afinidade, membros da família Pht-1 são preferencialmente expressos na raiz, envolvidos na absorção de fosfato da solução do solo. De fato, esses genes foram originalmente isolados de bibliotecas de cDNA provenientes de raízes. Em trabalhos recentes com Arabidopsis, envolvendo outros genes de transportadores de fosfato de alta afinidade, estes demonstraram maior diversidade no padrão de expressão, não restrito a raízes, mas com expressão em diversos tecidos e estágios de desenvolvimento (cotilédones, hidatódios, flores, anteras) (ALMEIDA, 2002).

Excluído: ,

Excluído: se

Até o presente momento, diversos tipos de seleção foram desenvolvidos com o propósito de identificar genes envolvidos na resposta à limitação de Pi (ABEL; TICCONI; DELATORRE, 2002).

O entendimento dos mecanismos moleculares de absorção de fósforo, assim como as suas bases genéticas e sua regulação são de extrema importância para o melhoramento de cultivares visando qualidade e produtividade (MITSUKAWA et al., 1997), principalmente em se tratando de solos tropicais, pobres em fósforo. Entretanto, o padrão de expressão desses genes é variável dentre os diversos membros da família multigênica e entre as espécies vegetais (ALMEIDA, 2002).

Por isso, mostra-se necessário conduzir estudos relacionados com o padrão de expressão de genes transportadores em outras espécies vegetais, tais como o café.

A contribuição das FMAs para a nutrição de fósforo das plantas tem sido documentada como fator de impacto no desenvolvimento e saúde das plantas. Esse fenômeno é de grande valor para o desenvolvimento de agrossistemas sustentáveis, menos exigentes em adubações fosfatadas (ALMEIDA, 2002).

Em raízes de *M. truncatula* micorrizadas genes relacionados com processos de transporte de membrana e transporte de nutrientes, degradação e modificação da parede celular, metabolismo primário e secundário, transdução de sinais e regulação da transcrição, normalmente apresentam expressão induzida, em relação a raízes não-micorrizadas, enquanto que genes relacionados com as respostas de defesa são suprimidos (MASSOUMOU et al., 2007).

Burleigh e Harrison (1997) observaram que o gene MtPt4 é diferencialmente regulado por P e pela colonização micorrízica. MtPt4 é induzido pela baixa disponibilidade de P e suprimido pela adubação fosfatada e pela colonização micorrízica.

Recentemente foi demonstrado que a função do MtPt4 é crítica para a formação das FMAs (KIRIACHEK, 2008). A perda da função desse gene provoca a morte prematura dos arbúsculos e o fungo não é capaz de colonizar a raiz, interrompendo a simbiose. Com esses resultados pode-se concluir que o transporte de P inorgânico é benéfico para a planta, mas também é requerido para o desenvolvimento da simbiose (JAVOT; PUMPLIN; HARRISON, 2007).

2.3 Identificação de genes

Com base nesses conhecimentos é possível identificar membros desta família de facilitadores por meio de buscas realizadas por Blastp ou tBlastn, que buscam sequências similares com o uso de sequências fasta(?) de nucleotídeos ou proteínas, também podem ser realizadas buscas com o uso de palavras-chave como por exemplo “Phosphate transport”, ou as buscas podem ser realizadas através de domínios conservados, que normalmente são encontrados dentro das famílias. Trabalhos evidenciam uma sequência de 29 aminoácidos LCFRFRWLFGIGGDYPLSATIMSEYANK como domínio conservado, além da assinatura clássica da família Pht1, GGDYPLSATIxSE, (KARANDASHOV; BUCHER, 2005).

Excluído:

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Identificação de genes que codificam transportadores de Pi, da família PHT1 em café.

Foram realizadas buscas por meio de palavras chave (*Phosphate transport*) e análises de tBlastn com a sequência de MtPT4 (*M. truncatula*) e com

a sequência do domínio conservado Pht1 (LCFFRFWLGFYGIGGDYPLSATIMS EYANK) no banco de dados do CAFEST, gerado pelo projeto Genoma Brasileiro do Café. Esses reads são oriundos de bibliotecas de ESTs de *Coffea spp.*

Excluído: reads

3.2 Caracterização da cópia genômica

Utilizando-se um banco de dados com resultados preliminares de sequências genômicas do cafeeiro, foram realizadas análises de blastn, visando-se a identificação da cópia genômica dos contigs de EST, identificados conforme descrito acima. Esse banco de dados contém sequências genômicas parciais de shotgun de 12 corridas (Roche 454), da tecnologia de pirosequenciamento (*Roche Titanium technology*) de um genótipo duplo haploide de *C. canephora*. Todas as sequências com alta similaridade às de ESTs foram recuperadas e uma nova montagem foi realizada, com o auxílio do programa SEQMAN (DNASTAR).

Excluído: i

3.3 Caracterização da região promotora

Análises *in silico* da região promotora dos genes Pht1 de café, para a identificação de sequências conservadas foram realizadas utilizando-se a ferramenta PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) (HIGO et al., 1999).

3.4 Filogenia

O alinhamento das sequências protéicas dos transportadores Pht1 de café identificados utilizando-se a metodologia descrita acima, foi realizado pelo programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994) com os parâmetros padrões

(*default*). O dendograma foi gerado a partir do próprio programa de alinhamento (ClustalW).

Formatado: Fonte: Itálico

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Figura 1 apresenta os resultados de análise de tBlastn utilizando-se a sequência do domínio conservado Pht1 (LCFFRFWLGF~~G~~IGGDYPLSATIMSEY ANK) no banco de dados do CAFEST. Pode-se observar que foram encontrados apenas quatro contigs com e-value < -10 . Isso pode ser devido à baixa ocorrência de reads produzidos a partir de bibliotecas de raízes na Base de Dados do Genoma Café.

Excluído: reads

Após a realização das análises de tBlastn e buscas por palavra-chave, na Base de Dados do Genoma Café, foram selecionados cinco potenciais candidatos à transportadores de Pi da família Pht1. O critério utilizado para a seleção desses genes foi a alta similaridade com a sequência protéica do MtPT4, observada nos resultados da análise de tBlastn. Os contigs selecionados foram: Contig 249 (1666 pb), Contig 1001 (2195 pb), Contig 1263 (1411) e o singlet CA00-XX-NS1-006-G03-EF.F (766 pb). Com as sequências consenso desses contigs, foram então realizadas as análises de blastn na base de dados com resultados preliminares de sequências genômicas do cafeeiro, com vistas à obtenção da cópia genômica desses genes. As sequências genômicas apresentando alta similaridade com as sequências consenso dos ESTs foram recuperadas e uma nova montagem foi realizada com essas sequências utilizando-se o aplicativo SEQMAN (DNASTAR). Novas buscas foram realizadas com as sequências das extremidades 5' e 3', para a identificação de novas sequências genômicas com alta similaridade, e assim sucessivamente, constituindo-se um tipo de caminhada genômica para a montagem final.

Excluído:

Excluído:

Query=
(29 letters)

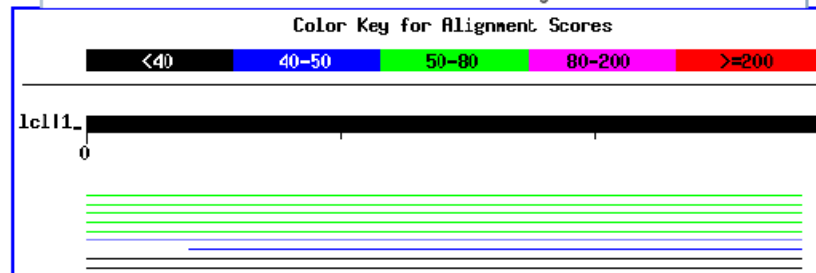
70

Formatado: Fonte: 10 pt

Formatado

Distribution of 10 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse-over to show define and scores. Click to show alignments



Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
FrBrTkCA00-XX-NS1-006-G03-EF.F	67	3e-12
FrBrTkContig7196	67	3e-12
Contig1001	67	3e-12
Contig249	67	3e-12
Contig4793	50	5e-08
FrBrTkContig7853	51	2e-07
FrBrTkCA00-XX-CA1-022-C01-JM.F	42	7e-05
FrBrTkCA00-XX-FR2-028-A10-EQ.F	40	5e-04
Contig9035	35	0.015

Figura 1 Resultados de análise de tBlastn utilizando-se a sequência do domínio conservado Pht1 no banco de dados do CAFEST

Formatado: Fonte: 10 pt

A Figura 2 apresenta um esquema de uma dessas montagens, realizada com o aplicativo SEQMAN. Após a realização das montagens, foi constatado que a sequência do contig 249 apresentava alta similaridade com a sequência do contig 1263. Adicionalmente aos contigs de EST estudados, foi possível também, identificar sequências com alta similaridade à sequência do transportador MtPT4 de *M. truncatula*, por meio de análises de tBlastn na base de dados com resultados preliminares de sequências genômicas do cafeeiro. Essas sequências resultaram na montagem de um novo gene candidato da família Pht1 de transportadores de Pi, e foi nomeado gen123.

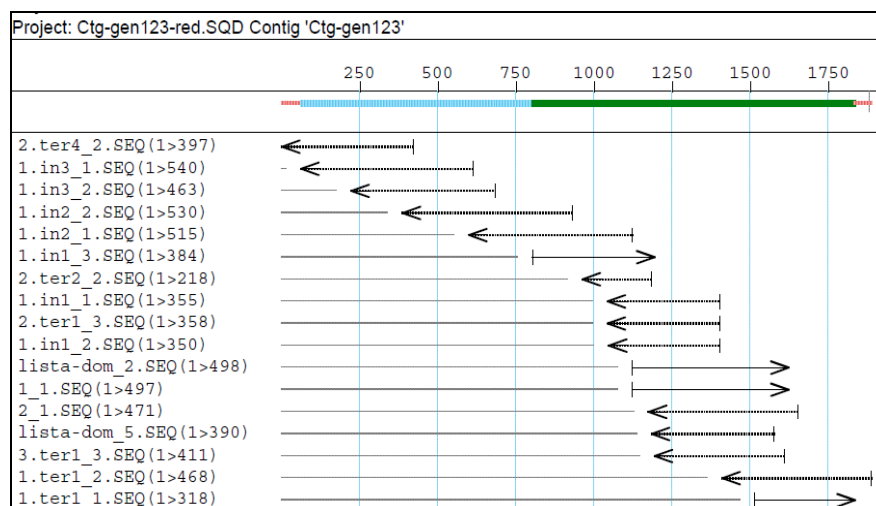


Figura 2 Esquema de montagens da cópia genômica realizadas com o aplicativo SEQMAN (DNASTAR)

Formatado: Fonte: 10 pt

Formatado: Recuo: A esquerda: 0 cm, Deslocamento: 1,5 cm

O resultado final da cópia genômica das sequências consenso dos genes transportadores de Pi da família Pht1, estão apresentados na Figura 3. Surpreendentemente, como pode ser verificado nessa mesma Figura, não foi identificado nenhum intron nas sequências estudadas. Os dados apresentados na

Excluído: ,

Excluído: f

Figura 3 também indicam que foi possível identificar no mínimo 350 pb da região promotora de todos os genes estudados. Nota-se também que, à exceção do gen123, foi possível identificar a sequência completa de todos os genes estudados.

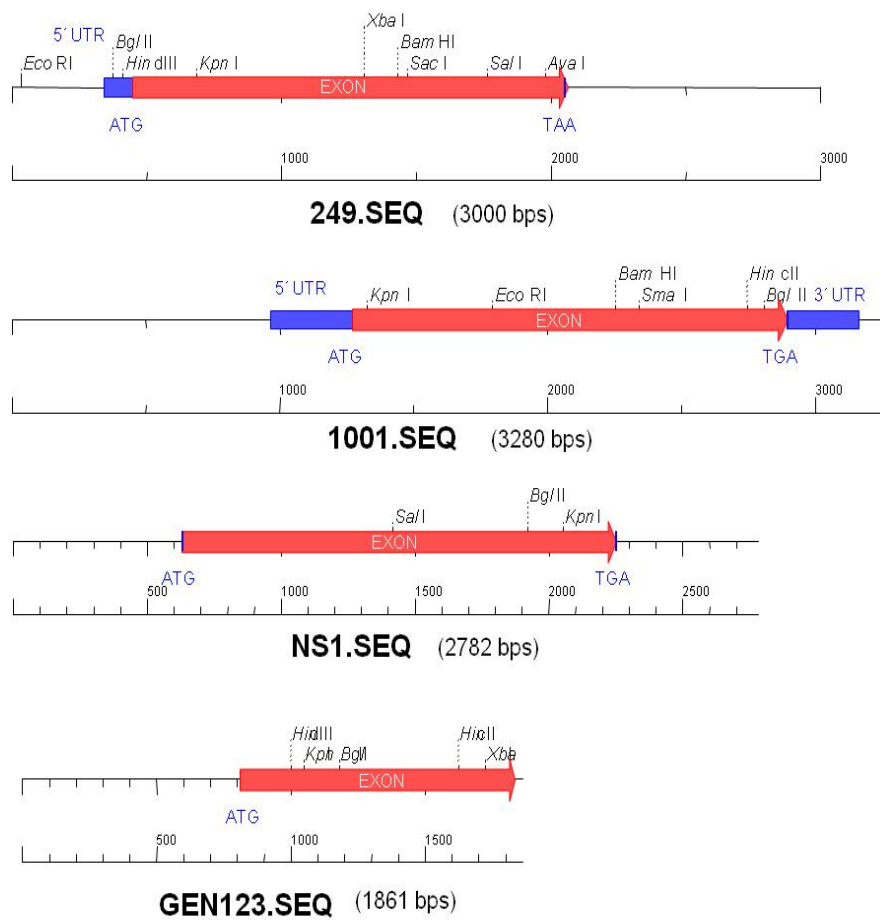


Figura 3 Resultado final da montagem das cópias genômicas

Formatado: Fonte: 10 pt

A Tabela 1 apresenta os resultados de alguns dos blocos de sequências conservadas encontrados, resultantes das análises da região promotora (PLACE) dos genes de café, pertencente à família Pht1 de transportadores de Pi. Pode-se observar que vários blocos de sequências conservadas relacionados a fatores de transcrição envolvidos em simbiose tais como OSE2ROOTNODULE, puderam ser encontrados na região promotora de todos os genes estudados. Além disso, blocos conservados relacionados aos fatores de transcrição MYB (RUBIO et al., 2001) já descritos em outras espécies vegetais como envolvidos no mecanismo de regulação dos genes Pht1, também foram encontrados na região promotora de todos os genes estudados. Pode-se observar também que a sequência consenso de resposta à deficiência de Pi (PIBS) somente foi encontrada na região promotora do gene123.

Tabela 1 Blocos conservados na região promotora e sua frequência em ambas as orientações

Bloco	Sequência	Frequência de ocorrência em ambas orientações			
		249	1001	NS1	Gen123
-10PEHVPSBD	TATTCT	-	-	1(+)	1(-)
ARR1AT	NGATT	6(3+)(3-)	10(4+)(6-)	14(10+)(4-)	-
CIACADIANLELHC	CAANNNNATC	1(-)	1(-)	-	1(-)
MYB2CONSENSUSAT	YAACKG	-	2(-)	-	1(-)
MYBCORE	CNGTTR	-	2(+)	-	1(+)
MYBST1	GGATA	1(+)	2(1+)(1-)	1(+)	2(-)
MYCONSENSUSAT	CANNTG	2(1+)(1-)	2(1+)(1-)	2(1+)(1-)	2(1+)(1-)
NODCON1GM	AAAGAT	-	1(-)	1(-)	1(-)
NODCON2GM	CTCTT	2(1+)(1-)	4(2+)(2-)	3(1+)(2-)	2(1+)(1-)
NTBBF1ARROLB	ACTTTA	-	1(-)	3(2+)(1-)	1(+)
OSE1ROOTNODULE	AAAGAT	-	1(-)	1(-)	1(-)
OSE2ROOTNODULE	CTCTT	2(1+)(1-)	4(2+)(2-)	3(2+)(1-)	2(1+)(1-)
P1BS	GNATATNC	-	-	-	2(1+)(1-)
ROOTMOTIFTAPOX1	ATATT	2(+)	10(7+)(3-)	2(1+)(1-)	7(2+)(5-)
SURECOREATSULTR11	GAGAC	-	-	1(+)	2(+)

As sequências protéicas resultantes dos contigs foram de 541 aa (contig 1001), 538 aa (contig 249), 540 aa (NS1) e a sequência ainda incompleta de 350 aa (gen123). Parte do alinhamento múltiplo realizado por meio do programa CLUSTALW, contendo a região conservada que caracteriza os transportadores de Pi da família Pht1 de café, está apresentado na Figura 4.

```

gi|2570525|LePT2          GVMTTLCTFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFIAAVFAMQGF 179
gi|1420873|StPT2         VVMTTLCTFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFIAAVFAMQGF 177
gi|118153871|SmPT2      GVMASLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFIAAVFAMQGF 176
gi|118153865|CfPT2      GVMATLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFIAAVFAMQGF 177
gi|12657587|NtPT2      GVMATLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFIAAVFAMQGF 175
gi|12657589|NtPT2.1    GVMATLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFIAAVFAMQGF 175
ctg-249                  GVIATLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFIAAVFAMQGF 175
gi|92109220|LjPT3       GVISTLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFIAAVFAMQGF 174
gi|2570523|LePT1       GVMTTLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFIAAVFAMQGF 173
gi|1420871|StPT1       SVMTTLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFIAAVFAMQGF 173
gi|118153842|CfPT1     SVMATLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFIAAVFAMQGF 173
gi|118153859|SmPT1     SVMTTLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFIAAVFAMQGF 173
gi|6177892|NtPT1       GVMTTLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFIAAVFAMQGF 173
gi|12641853|NtPT1.2    SVMTTLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFIAAVFAMQGF 174
ctg-1001                 AVMATLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFIAAVFAMQGF 174
gi|56549222|LePT3      GVIATLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFIAAVFAMQGF 174
gi|17065936|StPT3      GVIATLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFIAAVFAMQGF 174
gi|118153874|CfPT3     GVVATLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFIAAVFAMQGF 174
gi|118153895|SmPT3     GVVATLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFIAAVFAMQGF 174
gi|159141802|NtPT3     GVIATLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFIAAVFAMQGF 174
NS1                      SVMATLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFIAAVFAMQGF 174
gi|37778562|HvPT8      GVMATLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIISEYSNKRSRGSLIAAVFAMEGF 174
gi|60677367|TaPht1-myc GVMATLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIISEYSNKRSRGSLIAAVFAMEGF 174
gi|62529833|LePT4      GVIGTLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKATRGAFIAAVFAMQGV 190
gi|57472162|StPT4      GVIGTLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKATRGAFIAAVFAMQGV 174
gi|118153925|SmPT4     SVIGTLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKATRGAFIAAVFAMQGV 174
gi|118153916|CfPT4     AVIGTLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKSTRGAFIAAVFAMQGV 174
gi|118153939|NtPT4     SVIGTLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKSTRGAFIAAVFAMQGV 174
gi|118153951|SmPT5     VVIGTLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKRTRGAFIAAVFAMQGV 174
gi|62529837|StPT5     VVIGTLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKRTRGAFIAAVFAMQGV 142
gi|118153947|CfPT5     VVIGTLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKRTRGAFIAAVFAMQGV 173
gi|118153959|NtPT5     VVMGTLCTFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKRTRGAFIAAVFAMQGV 174
ctg-123                  SVMGTLCTFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKRTRGAFIAAVFAMQGV 174
gi|23956477|MtPT4      SVMHITLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKRTRGAFIAAVFAMQGV 171
gi|23600477|OsPT11     AVIGTLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYSNKKTRGAFIAAVFAMQGV 180
gi|60677369|ZmPT6      AVIGTLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYSNKKTRGAFIAAVFAMQGV 181
*: :*****.*****:***:** :*:*:*:*:*.*

```

Figura 4 Sequência conservada da família Pht1 obtida pelo alinhamento múltiplo no ClustalW

Pode-se observar nessa Figura 4 que a sequência de aminoácidos LCFRFRWLFGIGGDYPLSATIMSEYANK (CHEN et al., 2007; KARANDASHOV; BUCHER, 2005), é extremamente conservada entre as proteínas de transportadores de Pi da família Pht1, inclusive nas sequências codificadas pelos genes de café identificados neste trabalho.

Excluído: t

Excluído: ,

Na Figura 5, encontra-se o dendograma filogenético obtido a partir do alinhamento múltiplo das sequências protéicas de diferentes transportadores de Pi da família Pht1, obtido por meio do programa ClustalW.

De acordo com a Figura 5 podemos observar que o contig 123 é um candidato a transportador induzido por micorriza. Ele ficou no ramo do dendograma onde estão localizados os transportadores PT4 e PT5 de *Nicotiana*, *Solanum tuberosum*, *Solanum melongena*, *Capsicum frutescens* e *Lycopersicum*. A família Pht1 possui um domínio característico, ou seja, uma sequência de aminoácidos que é extremamente conservada, mas ocorrem diferenças em outras regiões, as quais podem caracterizar as diferenças nas subfamílias.

O dendograma formou vários grupos, colocando os transportadores PT4 e PT5, que são induzidos por micorriza, bem próximos, onde se encontra também o contig 123. Os transportadores induzidos por micorriza de gramíneas, que por serem monocotiledôneas e se diferirem evolutivamente, encontram-se agrupados em outro ramo, porém próximo ao das dicotiledôneas (KARANDASHOV et al., 2004).

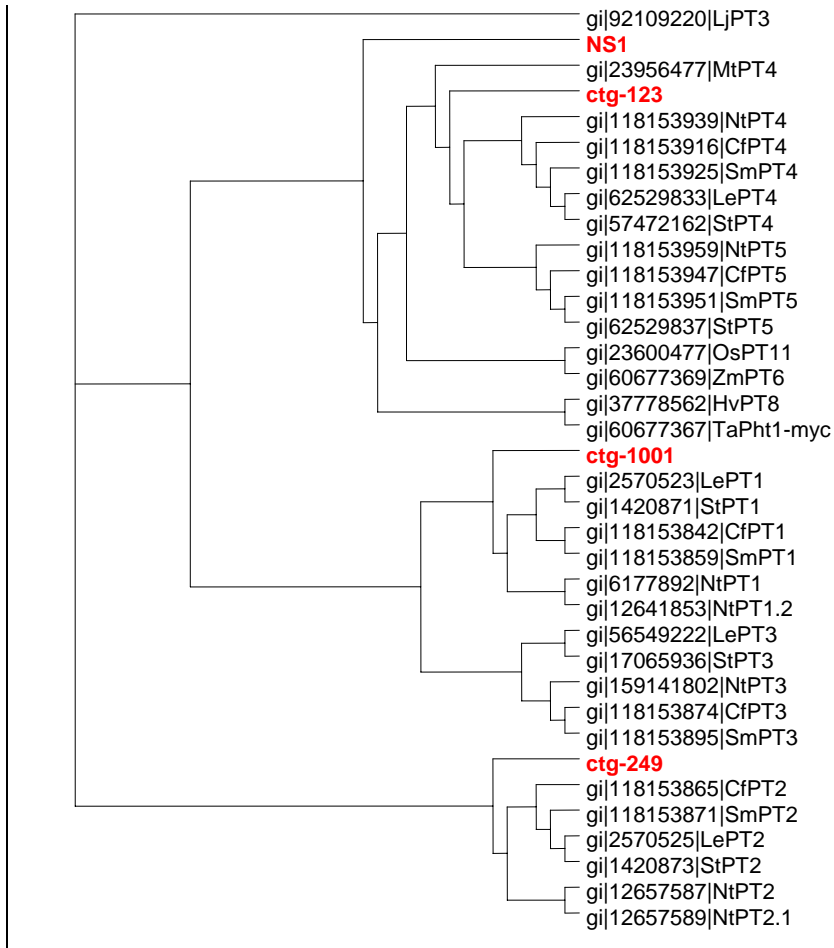


Figura 5 Dendograma com transportadores da família Pht1

Formatado: Fonte: 10 pt

O singlet NS1 encontra-se em ramo isolado do dendograma, próximo aos agrupamentos dos transportadores de micorriza PT4 e também de LjPT3.

O dendograma apresentado na Figura 5, demonstra também, que o contig 1001, foi enquadrado juntamente com transportadores PT1, que podem ser expressos em déficit de P, sendo transportadores de alta afinidade ou alguns em

Excluído: it

condições normais de P, todos em solos não rizosféricos. Esse contig, portanto, pode estar envolvido na capacitação direta de P (DARAM et al., 1998; NAGY et al., 2005).

Os transportadores PT3 também se enquadraram em outro ramo separado, mas alguns desses são induzidos por micorriza. Já o contig 249, ficou próximo aos transportadores PT2 que são parecidos com [os](#) transportadores PT1, sendo expressos na deficiência de P ou em sua abundância.

5 CONCLUSÕES

A estratégia utilizada neste trabalho permitiu a identificação de genes de café apresentando alta similaridade com proteínas transportadoras de Pi da família Pht1, já descritas em outras espécies vegetais.

O resultado das análises das sequências protéicas dos genes de café identificados nos permite concluir que quatro novos membros da família Pht1 de transportadores de Pi foram identificados em café, pois foi constatada a presença do domínio conservado característico da família Pht1 em todas as sequências identificadas.

As análises da região promotora dos genes Pht1 de café, também corroboram com a função no transporte de Pi, pois foram identificados blocos de sequência conservados relacionados ao transporte de Pi, tais como o PIBS que está relacionado à indução gênica em função da deficiência de fósforo.

Excluído: ,

Formatado: Português (Brasil)

REFERÊNCIAS

ABEL, S.; TICCONI, C. A.; DELATORRE, C. A. Phosphate sensing in higher plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 115, n. 1, p. 1-8, Jan. 2002.

ALMEIDA, R. S. **Identificação e caracterização de genes de transportadores de fosfato em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2002. 90 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2002.

_____. **Perfil fisiológico e da expressão de transportadores de fosfato da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) durante a simbiose com micorriza arbuscular**. 2007. 188 p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2007.

ANDRADE, A. C. et al. ABC transporters and their impact on pathogenesis and drug sensitivity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 146, n. 8, p. 221-235, Aug. 1999.

AONO, T. et al. The response of the phosphate uptake system and the organic acid exudation system to phosphate starvation in *Sesbania rostrata*. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 42, n. 11, p. 1253-1264, Nov. 2001.

BOLAN, N. S. A critical-review on the role of mycorrhiza fungi in the uptake of phosphorus by plants. **Plant & Soil**, The Hague, v. 134, n. 2, p. 189-207, July 1991.

BURLEIGH, S. H.; HARRISON, M. J. A novel gene whose expression in *Medicago truncatula* roots is suppressed in response to colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi and to phosphate nutrition. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 34, n. 2, p. 199-208, May 1997.

CHEN, A. et al. Conservation and divergence of both phosphate and mycorrhiza-regulated physiological responses and expression patterns of

phosphate transporters in solanaceous species. **New Phytologist**, Cambridge, v. 173, n. 4, p. 817-831, Dec. 2007.

CHIOU, T. J.; LIU, H.; HARRISON, M. J. The spatial expression patterns of a phosphate transporter (MtPT1) from *Medicago truncatula* indicate a role of phosphate transporter in the root/soil interface. **Plant Journal**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 1-15, Feb. 2001.

DARAM, P. et al. Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato. **Planta**, Berlin, v. 206, n. 2, p. 225-233, Aug. 1998.

_____. PHT2 1 encodes a low-affinity phosphate transporter from *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 11, p. 2153-2166, Nov. 1999.

DELATORRE, C. A. **Phosphate-deficiency response: understanding the signaling pathway**. 2002. 158 p. Thesis (Ph.D. in Philosophy in Plant Biology) - University of California, Davis, 2002.

DELATORRE, C. A. et al. *Arabidopsis pdr2* reveals a phosphate-sensitive checkpoint in root development. **The Plant Journal**, Oxford, v. 37, n. 6, p. 801-814, 2004.

FURIHATA, T.; SUZUKI, M.; SAKURAI, H. Kinetic characterization of two phosphate uptake systems with different affinities in suspension-cultured *Catharanthus roseus* protoplast. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 33, n. 8, p. 1151-1157, Aug. 1992.

HARRISON, M. J.; DEWBRE, G. R.; LIU, J. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 10, p. 2414-2429, Oct. 2002.

HENDERSON, P. J. F. The 12-transmembrane helix transporters. **Current Opinion of Cell Biology**, London, v. 5, n. 4, p. 708-721, 1993.

HIGO, K. et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 297-300, Feb. 1999.

JAVOT, H.; PUMPLIN, N.; HARRISON, M. J. Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 310-322, Mar. 2007.

KARANDASHOV, V.; BUCHER, M. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. **Trends Plant Science**, London, v. 10, n. 1, p. 22-29, 2005.

KARANDASHOV, V. et al. Evolutionary consevation of phosphate transport in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 16, p. 6285-6290, Apr. 2004.

KIRIACHEK, S. G. **Identificação e caracterização de genes com expressão diferencial durante o desenvolvimento de micorrizas arbusculares em cana-de-açúcar**. 2008. 95 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2008.

KOCHIAN, L. V. et al. How do crop plants tolerate acid soils?: mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 459-493, June 2004.

LASHERMES, P.; ANDRADE, A. C.; ETIENNE, H. Genomics of coffee, one of the world's largest traded commodities. In: MOORE, P. H.; MILING, R. (Ed.). **Genomics of tropical crop plants**. London: Springer, 2008. p. 203-226.

MASSOUMOU, M. et al. Medicago truncatula gene responses specific to arbuscular mycorrhiza interactions with different species and genera of Glomeromycota. **Mycorrhiza**, New York, v. 17, n. 3, p. 223-234, May 2007.

MITSUMAKAWA, N. et al. Overexpression of an Arabidopsis thaliana high-affinity phosphate transporter gene in tobacco cultured cells enhances cell growth under phosphate-limited conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, n. 13, p. 7098-7102, June 1997.

MUDGE, S. M. et al. Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of the phosphate transporters in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 341-353, Aug. 2002.

MULETA, D. et al. Composition of coffee shade tree species and density of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) spores in Bonga natural coffee forest, southwestern Ethiopia. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 241, n. 1/3, p. 145-154, Mar. 2007.

NAGY, R. et al. Characterization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transport in solanaceous species. **The Plant Journal**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 236-250, Mar. 2005.

_____. Differential regulation of five Pht1 phosphate transporters from Maize (*Zea mays*). **Plant Biology**, Stuttgart, v. 8, n. 2, p. 186-197, Feb. 2005.

PASZKOWSKI, U. et al. Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 20, p. 13324-13329, 2002.

POIRIER, Y. et al. A mutant of Arabidopsis deficient in xylem loading of phosphate. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, n. 3, p. 1087-1093, June 1991.

RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate acquisition. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 665-693, 1999.

RUBIO, V. et al. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. **Genes & Development**, Washington, v. 15, n. 16, p. 2122-2133, Aug. 2001.

SAKANO, K. Proton phosphate stoichiometry in uptake of inorganic-phosphate by cultured-cells of *Catharanthus roseus* (L) G-Don. **Plant Physiology**, Rockville, v. 93, n. 2, p. 479-483, 1990.

SCHACHTMAN, D. P.; REID, R. J.; ALING, S. M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 2, p. 447-453, Feb. 1998.

SMITH, F. W. The phosphate uptake mechanism. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 245, n. 1, p. 105-114, Aug. 2002.

THOMPSON, J. D. et al. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 4, p. 4673-4680, Nov. 1994.

TICCONI, C. A. et al. Arabidopsis pdr2 reveals a phosphate-sensitive checkpoint in root development. **Plant Journal**, Oxon, v. 37, n. 6, p. 801-814, 2004.

TRULL, M. C.; DEIKMAN, D. An Arabidopsis mutant missing one acid phosphatase isoform. **Planta**, Berlin, v. 206, n. 4, p. 544-550, Aug. 1998.

VIEIRA, L. G. E. et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 95-108, Mar. 2006.

WILLIAMSON, L. C. et al. Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, n. 2, p. 875-882, Feb. 2001.

CAPÍTULO 4

Expressão de genes PHT1 de café por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

|

RESUMO

Genes da família Pht1 são transportadores de Pi de alta afinidade e podem ser induzidos ou não por micorrizas. Após a identificação e caracterização *in silico* de sequências protéicas de transportadores Pht1 em café, foram desenhados primers específicos para os contigs 249, 1001, 1263, 123 e o singlet NS1 para a realização de qPCR. Foi extraído o RNA total de folhas de *Coffea arabica* cultivar catuaí, seguindo o protocolo Concert modificado, de um tratamento controle de plantas não inoculadas com micorriza e plantas inoculadas com uma mistura de fungos, após uma semana da aplicação de P. Também foi extraído o RNA total de raízes de café de plantas não inoculadas e inoculadas com uma mistura de fungos, ambas sem aplicação de P e com 5 horas de aplicação de P, para avaliação dos níveis de expressão dos transportadores. Após o tratamento das amostras de RNA com DNase, foi realizada a síntese de cDNA a partir de *pools* de 3 repetições biológicas do RNA total de raízes e folhas, dos diferentes tratamentos. Foi utilizada a ubiquitina como gene constitutivo para a normalização dos resultados. Os genes NS1 e 1001 são induzidos em folhas de café pela presença de micorriza nas plantas. Já em raízes, o gene NS1 é reprimido pela associação com micorriza e também pela adubação com P. Em contraste, os genes 249/1263 apresentaram redução na expressão em folhas de café de mudas micorrizadas. Já em raízes, os genes 249/1263 foram induzidos pela aplicação de P na presença e ausência de micorriza. O contig 123 não apresentou expressão em folhas, mas apresentou expressão significativa em plantas micorrizadas com e sem aplicação de P em relação às plantas não micorrizadas.

Excluído: -se

Formatado: Fonte: Itálico

Excluído: ,

Palavras-chave: RNA. qPCR. Genes. Transportadores. Primers.

ABSTRACT

Pht1 family genes are Pi transporters and can be induced or not by mycorrhizae. After the identification and *in silico* characterization of protein sequences of coffee Pht1 transporters, specific primers were designed for contigs 249, 1001, 1263, 123 singlet and NS1 to perform qPCR. Total RNA was extracted from coffee leaves, following the Concert modified protocol of a control plant not inoculated with mycorrhizae and plants inoculated with a mixture of fungi, one week after application of P. Also, total RNA was extracted from coffee roots of plants uninoculated and inoculated with a mixture of fungi, both without P application and 5 hours of application of P, to evaluate the expression levels of Pht1 transporters. After treatment of RNA samples with DNase, the cDNA synthesis of pools of three biological replicates of total RNA from roots and leaves of different treatments was carried out. Ubiquitin was used as constitutive gene for normalization of results. The NS1 genes and 1001 were induced in coffee leaves in the presence of mycorrhizal plants. In roots, the NS1 gene is repressed by association with mycorrhizal and also by fertilization with P. In contrast, genes 249/1263 had reduced expression in leaves of inoculated coffee seedlings. In roots, 249/1263 genes were induced by application of P in the presence and absence of mycorrhiza. The contig 123 showed no expression in leaves but showed significant expression in mycorrhizal plants with and without P application in respect of non-mycorrhizal plants.

Keywords: RNA. qPCR. Pht1 transporters. [Mycorrhizae](#).

Excluído: m

1 INTRODUÇÃO

No decorrer da evolução, as plantas desenvolveram vários mecanismos adaptativos à deficiência de fosfato. Alterações no crescimento e na arquitetura radicular, bem como o aumento na produção de fosfatases, RNAses e transportadores de fosfato já foram comprovados como parte desses mecanismos (RAGHOTAMA, 1999).

Diversas evidências têm indicado que muitas das alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas, que ocorrem como respostas à deficiência, estão associadas a mudanças na expressão gênica (HAMMOND; BROADLEY; WHITE, 2004). Tais mudanças surgem como uma resposta direta e específica à deficiência de fosfato e, alguns dos genes induzidos estão diretamente envolvidos no aumento da disponibilidade de Pi e em promover sua maior absorção.

Assim, o isolamento de genes de plantas que codificam transportadores de fosfato (TP), similares aos encontrados em leveduras e fungos, deu origem à família Pht-1 de transportadores de fosfato que atuam na absorção, transporte e reciclagem de Pi na planta. De acordo com Smith (2002), a resposta desses genes é consideravelmente intensificada sob a privação por fósforo, seguida da desativação diante da disponibilidade do nutriente, como demonstrado inicialmente para os genes *Pht-1;1* e *Pht-1;2* de *Arabidopsis*.

Nesse sentido, fica claro que o entendimento dos mecanismos moleculares de absorção de fósforo, assim como as suas bases genéticas e sua regulação, são de extrema importância para o melhoramento de cultivares visando qualidade e produtividade (MITSUKAWA et al., 1997).

Pesquisas em plantas como tomateiro, batata, fumo, arroz, *Hordeum vulgare*, *Betula pendula*, *Medicago truncatula*, milho, vêm mostrando que transportadores de fosfato radiculares possuem respostas similares aos genes

Excluído: ,

Excluído: ,

Pht-1;1 e *Pht-1;2* de *Arabidopsis*, ou apresentam expressão constitutiva ou induzida pela deficiência de Pi, ou ainda serem induzidos com o efeito da simbiose com micorriza arbusculares.

Diante do exposto, o objetivo deste capítulo foi o de analisar a expressão dos genes transportadores de fósforo (família Pht1) em plantas de café.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Expressão de genes transportadores de Pi em diferentes espécies

Membros da família transportadora de Pi Pht1 têm sido identificados em uma grande variedade de espécies vegetais tais como *Arabidopsis*, arroz, *Medicago truncatula* e tomate. Muitos desses transportadores são expressos na raiz e mostram elevados níveis de transcrição quando em crescimento em condições de baixos teores de Pi. Das sequências do genoma do arroz e *Arabidopsis* todos os transportadores da família Pht1 estão revelados, sendo que essas espécies possuem 9 e 13 membros, respectivamente. Oito dos nove transportadores de *Arabidopsis* são expressos na raiz e quatro desses em células epidérmicas. Em contraste, há menor abundância nos tecidos aéreos (MUDGE et al., 2002).

Culturas de células de tabaco (*Nicotiana tabacum*) privadas de fosfato levaram ao isolamento de quatro cDNAs induzidos, sendo dois deles homólogos aos genes *parA* e *parB* de *N. tabacum* (EZAKI; YAMAMOTO; MATSUMOTO, 1995).

Excluído: Em c

Já em *Brassica nigra*, foram constatadas como respostas à deficiência de fosfato, a síntese *de novo* de fosfatases ácidas (DUFF; PLAXTON; LEFEBVRE, 1991), bem como a indução de uma fosfofrutoquinase dependente de PPI (THEODOROU; PLAXTON, 1994).

Em tomate (*Lycopersicon esculentum L.*), observou-se o aumento da expressão de Ca^{2+} -ATPase (MUCHHAL; RAGHOTHAMA, 1995) e maior atividade de fosfatase ácida, fitase e ribonuclease, enzimas mobilizadoras de fosfato (BOSSE; KÖCK, 1998).

Um estudo envolvendo *Arabidopsis thaliana* e tomate encontrou evidências de que genes induzidos pela deficiência de fosfato estão submetidos a uma regulação negativa, permanecendo reprimidos na presença do nutriente (MUKATIRA et al., 2001).

Trabalhando com tremoço branco (*Lupinus albus*), uma espécie conhecida por sua tolerância à baixa disponibilidade de Pi, Uhde-Stone et al. (2003) identificaram 35 genes induzidos durante a formação de raízes proteóides promovida como resposta à deficiência de P, incluindo genes envolvidos na aquisição e reciclagem de Pi (fosfatases ácidas) e na síntese de ácidos orgânicos (malato e citrato).

Excluído: 6

Com relação aos transportadores de fosfato de alta afinidade de plantas, estes possuem maior similaridade de sequência com transportadores de levedura e *N. crassa*, associados ao cotransporte de prótons e foram identificados principalmente a partir de raízes de diversas dicotiledôneas (HARRISON; DEWBRE; LIU, 2002).

Em especial, as sequências dos genes *AtPT1* e *AtPT2*, têm contribuído para a identificação de vários homólogos em outras espécies vegetais, tais como batata (*StPT1* e *StTP2*) (LEGGEWIE; WILLMITZER; RIESMEIER, 1997), *Mendicago truncatula* (*MtPT1* e *MtPT2*) (CHIOU; LIU; HARRISON, 2001; LIU; TRIEU; BLAYLOCK, 1998), e tomate (*LePT1* e *LePT2*) (DARAM et al., 1998; LIU et al., 1998), além de outros eucariotos, destacando-se a alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. Nesta alga, o acúmulo de diversos mRNAs correspondentes a proteínas ribossomais e enzimas envolvidas no catabolismo da glicose durante a deficiência de fosfato (DUMONT et al., 1993).

Excluído:

Excluído:

A finalização do sequenciamento do genoma da *Arabidopsis* permitiu a identificação de nove genes presumíveis de transportadores de fosfato de alta afinidade, denominados de *Pht1-1* a *Pht1-9* (ALMEIDA, 2002; MUDGE et al., 2002), da família *Pht-1* (Tabela 1).

Tabela 1 Genes de *Arabidopsis*, membros da família Pht1 de transportadores de fosfato, descritos por Mudge et al. (2002), seguindo os critérios da Comissão de Nomeclatura de Genes de Plantas e nomes formais descritos: ^abanco de dados do genoma de *Arabidopsis* MATDB (www.mips.biochem.mpg.de/pr oj/thal/db/index.html) (^dLIU et al., 1998; ^dMUCHHAL; PARDO; RAGHOTHAMA, 1996; ^bOKUMURA et al., 1998; ^cSMITH; ROBSON; ABBOTT, 1992)

Formatado: Fonte: 10 pt

Formatado: Recuo: À esquerda: 0 cm, Deslocamento: 1,3 cm

Nome dos genes (MUDGE et al., 2002)	Nomes formais dos genes Por outros autores	Código da proteína (banco de dados MATDB*)
ARAth; Pht1 ; 1	PHT1 ^b , APTP2 ^c , AtPT1 ^d	At5g43350
ARAth; Pht1 ; 2	PHT2 ^b , APTP1 ^c ,	At5g43370
ARAth; Pht1 ; 3	PHT3 ^b , APTP1 ^c ,	At5g43360
ARAth; Pht1 ; 4	PHT4 ^b , APTP4 ^e ,	At2g38940
ARAth; Pht1 ; 5	PHT5 ^b , APTP2 ^d ,	At2g32830
ARAth; Pht1 ; 6	PHT6 ^b	At5g43340
ARAth; Pht1 ; 7	-	At3g54700
ARAth; Pht1 ; 8	-	At1g20860
ARAth; Pht1 ; 9	-	At1g76430

Fonte: Almeida (2002)

Os transportadores de fosfato de alta afinidade já clonados e caracterizados consistem de proteínas integrais de membrana do tipo multipass, compostas por doze domínios transmembranares separados em dois grupos de seis, através de uma região peptídica hidrofílica. Essas são características específicas de proteínas transportadoras de açúcares, íons, antibióticos e aminoácidos (HENDERSON, 1993).

Os vários genes HATP clonados foram usados para complementar o mutante *pho84* de leveduras, que é deficiente de transportador de alta afinidade de fósforo. O cDNA de *MtPT1* de *Medicago truncatula* foi capaz de complementar o mutante *pho84*, registrando um *Km* de 192 μ M. Os transcritos de *MtPT1* e *MtPT2* estão presentes nas raízes e aumentam a concentração sob carência de Pi, porém, são suprimidos pelo desenvolvimento de micorrizas. Ambos os transcritos não foram detectados nas folhas (LIU; TRIEU; BLAYLOCK, 1998).

De acordo com Fang et al. (2009), miRNA399 teria por alvo *AtPHO2*, silenciando-o e assim regulando processos envolvidos no transporte de Pi, tais como carregamento, redistribuição e reciclagem. Sugere-se que durante condições normais de disponibilidade de Pi, PHO2 limite o carregamento de Pi na raiz mantendo a reciclagem e redistribuição nas folhas. No início da deficiência, são induzidos miRNA399 e *AtIPS1*, PHO2 é protegido e não reprimido, porém conforme aumenta o estresse a quantidade de miRNA399 aumentaria a ponto de superar *AtIPS1* e PHO2 seria reprimido aumentando o carregamento de Pi para a parte aérea.

Em *M. truncatula* e batata, foram claramente demonstrados que *MtPT1/MtPT2* e *StPT1/StPT2* não estão envolvidos no transporte de fosfato mediado por simbiose com micorrizas arbusculares (MA), uma vez que estes importadores são desativados rapidamente com o desenvolvimento da relação simbiótica (CHIOU; LIU; HARRISON, 2001; LIU; TRIEU; BLAYLOCK, 1998).

O gene *OsPT11* também possui indução específica, induzida por colonização com micorrizas em arroz, e independente do estado nutricional das plantas ou disponibilidade de P na rizosfera (PASZKOWSKI et al., 2002).

De acordo com Almeida (2002), estudos evidenciam que boa parte dos transportadores de alta afinidade, membros da família *Ph1* são

Excluído: s

preferencialmente expressos na raiz, envolvidos na absorção de fosfato da solução do solo. De fato, esses genes foram originalmente isolados de bibliotecas de cDNA provenientes de raízes.

Os promotores de *Pht1-1*, *Pht1-2*, *Pht1-3* e *Pht1-4* direcionaram a expressão para a epiderme das raízes, sendo induzidos quando as plantas cresceram em solos contendo baixa concentração de Pi, de modo semelhante aos transportadores de alta afinidade descritos para tomate *LePT1* e *LePT2* (LIU et al., 1998).

Alguns transportadores de fosfato processam o carregamento de Pi para o xilema ou floema, transporte para células das raízes, folhas, flores e tecidos de reserva, e o efluxo de fosfato para fora da raiz também (RAGHOTHAMA, 1999).

A identificação de pelo menos 16 transportadores de fosfato no genoma da *Arabidopsis* e 13 no de arroz sugerem que as plantas possuem múltiplos TP funcionais em tecidos e órgãos específicos (RAGHOTHAMA, 1999).

A regulação do transporte de fósforo por modificações pós-traducionais, em especial via glicosilação ou fosforilação, é uma evidência consistente presente nos sítios regulatórios fortemente conservados nas sequências de aminoácidos de TP em mono e dicotiledôneas (SMITH, 2002).

De acordo com Muchael e Raghothama (1996), até o momento não foram identificados transportadores de baixa afinidade expressos em raízes, o que é compreensível ao se considerar que as plantas evoluíram sob baixa disponibilidade de Pi.

Quando há disponibilidade de P, [a](#) baixa atividade de PHO2 conduz [ao](#) aumento na expressão de genes transportadores de Pi na raiz (*Pht1,8* e *Pht1,9*) e de membros da família gênica IPS/At4 (DOERNER, 2008).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Extração do RNA

A extração foi realizada seguindo o protocolo Concert modificado, no Laboratório Central de Biologia Molecular da UFLA (LCBM), de raízes de plantas de *C. arabica* cultivar catuaí, inoculadas com uma mistura de fungos micorrízicos e de plantas não inoculadas, ambas com aplicação de fósforo e sem aplicação de fósforo e também de folhas de plantas inoculadas com a mistura de fungos e de plantas sem a inoculação dos fungos, ambas com aplicação de fósforo, seguindo-se assim:

Ao tecido pulverizado, mantido sempre em nitrogênio líquido no cadinho e no eppendorf, foi adicionado 500 µl de concert e levado ao vórtex para homogeneização durante 2 minutos. Os eppendorfs foram deixados na horizontal após homogeneização por 10 minutos em temperatura ambiente.

Logo após esses procedimentos, foi realizada uma centrifugação do material por 5 minutos à 4°C em RPM máxima com preparo de novos eppendorfs com NaCl 5M no volume de 100 µl para transferência da fase líquida do material centrifugado, com posterior transferência da fase líquida para os novos eppendorfs com NaCl e adição de 300 µl de clorofórmio e homogeneização do material no vórtex por 1 minuto, com centrifugação por 10 minutos à 4°C em RPM máxima e repetição do processo de adição de NaCl e clorofórmio com homogeneização e centrifugação por mais uma ou duas vezes.

A coleta da fase superior foi realizada, transferindo-a para novos eppendorfs com adição de 550 µl de isopropanol ao material transferido, fazendo inversão por aproximadamente cinco vezes, deixando os eppendorfs por uma hora no freezer a -20°C, com estes na posição vertical, com posterior centrifugação por 25 minutos à 4°C em RPM máxima.

Formatado: Recuo: Primeira linha: 1,25 cm

Excluído: O

Excluído: endo-o

Excluído: .

Excluído: F

Excluído: realizada

Excluído: ção

Excluído: de

Excluído: que juntamente com o material pulverizado, foi

Foi descartada a fase líquida, tomando cuidado com o *pellet* e adicionando aos eppendorfs, etanol 75% no volume de 600 μ l, sendo centrifugado por 5 minutos à 4°C em RPM máxima e logo após descartando o etanol e aplicando banho-maria à 37°C aos eppendorfs até secar e ressuspensando o *pellet* em 20 μ l de água Milli-Q autoclavada. As etapas de extração foram realizadas no gelo para não haver degradação do material devido à quantidade de amostras extraídas.

3.2 Tratamento com DNA'se

Foi utilizado o Kit Turbo DNA Free da Ambion para tratar o material extraído tendo um volume final de 25 μ l, com 2,5 μ l de tampão e 0,5 de DNA'se e 22 μ l de RNA diluído em água. Este volume de solução foi colocado em banho-maria por 30 minutos à 37°C, após esse procedimento foi colocado 2,5 μ l de solução de parada da reação a qual foi deixada por 2 minutos em temperatura ambiente. Ao final, coletou-se 20 μ l desta solução final de RNA tratado, que foi centrifugado por um minuto e meio a 10.000 rpm para a confecção dos cDNAs.

Excluído: s

As amostras foram corridas em gel de agarose 1% com 40 mL de TAE (tampão), com 1,5 μ l de brometo dietílico para a verificação da ausência de DNA.

Excluído: l

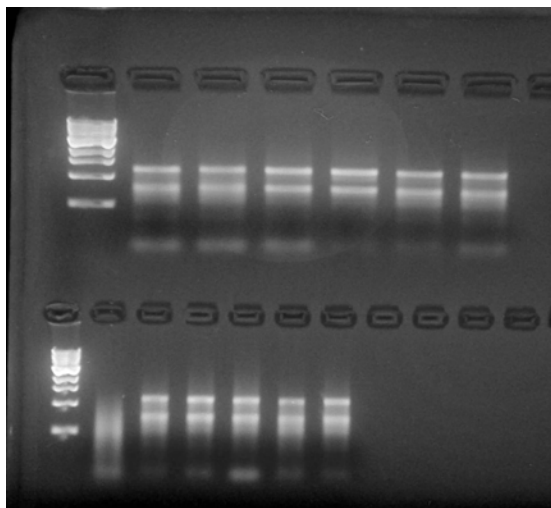


Figura 1 Amostras de RNA de folhas tratadas com o *Kit Turbo DNA Free*
(a amostra degradada foi descartada)

Formatado: Fonte: 10 pt

Excluído:

Formatado: Recuo: Primeira
linha: 0,8 cm

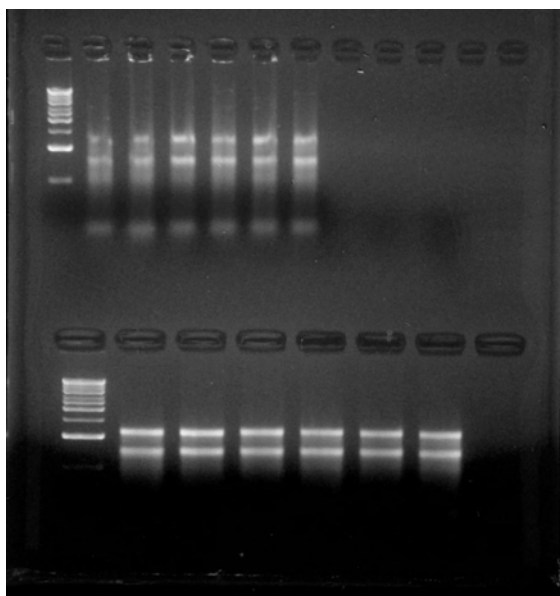


Figura 2 Amostras de RNA de raízes tratadas com o *Kit Turbo DNA Free*

Formatado: Fonte: 10 pt

3.3 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi feita com o Kit “*Hight Capacity*” da APPLIED BIOSYSTEMS a partir de *pools* do RNA total de raízes e folhas. Esses RNAs foram normalizados para uma concentração final de 1 µg. Foi utilizado para cada tubo o seguinte volume dos componentes, para cada amostra.

Formatado: Fonte: Itálico

Tabela 2 Componentes e quantidades para a reação de RT

Formatado: Fonte: 10 pt

Buffer	12,4
d NTP's	4,96
Primer's	12,4
Enzima	6,2
Água	26,04

Tabela 3 Condições para reação de transcriptase reversa (RT)

Formatado: Fonte: 10 pt

Formatado: Espaçamento entre linhas: simples

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temperatura °C	25	37	85	4
Tempo (minutos)	10	120	5	-

3.4 PCR quantitativo (qPCR)

Na Tabela 4, estão listados os pares de primers desenhados para cada gene candidato. Esses primers foram ressuspensos em água Milli-Q com a utilização de ponteiras com filtro (para evitar contaminação), a uma concentração de 100 µM e posteriormente diluída para 10 µM em outro tubo, constituindo-se a amostra de trabalho.

Tabela 4 Descrição do primers desenhados

Gene	Sequência do Primer
1263-F	5' TTTGTTGTGCCGGCTGAAA 3'
1263-R	5' CGAATGCCCAACTATTGCT 3'
NS1-F	5' GCGTTTTTCGCCATGATAAT 3'
NS1-R	5' AATCCGCTTGCGGGATAGTT 3'
249-F	5' ACTAAGCTGCTGGGACGCATT 3'
249-R	5' CCAAGGCAACACCAGTGACA 3'
1001-F	5' GCTGCAGTGTTTGCTATGCAA 3'
1001-R	5' ATGCAGGAGCAGGAAATCCA 3'
HP 123.2-F	5' TTTTCGCAGGCCTCGTTTC 3'
HP 123.2-R	5' GTGGTCCGCATGGTATGATG 3'
UBQ-F	5' AAGACAGCTTCAACAGAGTACAGCAT 3'
UBQ-R	5' GGCAGGACCTTGGCTGACTATA 3'

Excluído: ¶

Formatado: Fonte: 10 pt

Formatado: Fonte: 10 pt

Formatado: À esquerda

A reação de qPCR foi realizada utilizando-se os componentes das Tabelas 5 e 6 descritas a seguir:

Tabela 5 Componentes e quantidade para reação de qPCR

Componente	Quantidade
Syber Green	5,0
Primer Foward (10µM)	0,2
Primer Reverse (10µM)	0,2
Água	2,6
cDNA (1/50)	2,0

Formatado: Fonte: 10 pt

Excluído: .

Excluído: ¶

Formatado: Fonte: 10 pt

Tabela 6 Condições para reação de qPCR

Temperatura em °C	Tempo (segundos)	Ciclos
50	120	1
95	300	1
95	3	40
60	30	40

Formatado: Fonte: 10 pt

Formatado: A esquerda,
Espaçamento entre linhas: 1,5
linha

Excluído: ¶

Após a realização de um ensaio com as diluições das amostras de cDNA de 1:10, 1:50 e 1:100, verificou-se que a melhor diluição para a condução dos experimentos foi a de 1:50 visto que, o início da curva de amplificação, se deu por volta do ciclo de número 26 na reação de qPCR.

Para a verificação de ausência de contaminação dos primers e, possível inespecificidade desses, foi realizada a curva de dissociação das reações e, com a curva gerada foi possível confirmar a presença de um único produto, com uma mesma temperatura de dissociação.

A quantificação de transcritos dos genes pesquisados foi realizada por meio de análises por PCR Quantitativo em tempo real (qPCR) tendo os transcritos do gene constitutivo da ubiquitina como padrão interno na normalização dos dados. As reações foram realizadas em triplicatas.

Os dados dos experimentos de qPCR, foram analisados pelo próprio programa da APLIED BIOSSYSTEMS.

Excluído: .

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Excluído: ¶

4.1 Análises dos resultados de q PCR para genes de café da família PHT1

Nos anexos, encontram-se na Figura 1, as curvas de dissociação dos cinco pares de primers com apenas um pico formado, indicando a formação de um único produto.

Os dados apresentados na Figura 3 referem-se às análises de qPCR onde os resultados foram comparados em um único grupo biológico, considerando como normalizador, a ubiquitina. Como pode ser observado nos dados apresentados na Figura 3 (painel esquerdo), os genes *Ph1* de café, 1001, 1263 3 249, apresentaram expressão em folhas, como encontrado em milho (NAGY et al., 2005). Em contraste, os genes codificados pelo contig 123 e NS1, apresentaram baixa expressão em folhas, corroborando com os resultados encontrados em *Medicago truncatula*.

Excluído: se

Excluído:

Excluído:

Os dados apresentados na Figura 3 (painel esquerdo), indicam também, que de um modo geral, não foram observadas diferenças significativas de expressão gênica quando se compara os tratamentos de folhas de plantas micorrizadas ou na ausência de micorriza. Entretanto, diferença significativa foi observada para a expressão do gene NS1, quando analisado em separado (Figura 4). Neste caso, observa-se níveis de expressão de NS1 mais elevados em folhas de plantas micorrizadas. Já os genes 249 e 1263 apresentam uma tendência de redução da expressão em folhas de plantas micorrizadas, porém esta diferença não foi significativa em nenhum dos casos.

Excluído: ,

Excluído: na

Excluído:

Excluído: ,

Excluído:

Excluído: ,

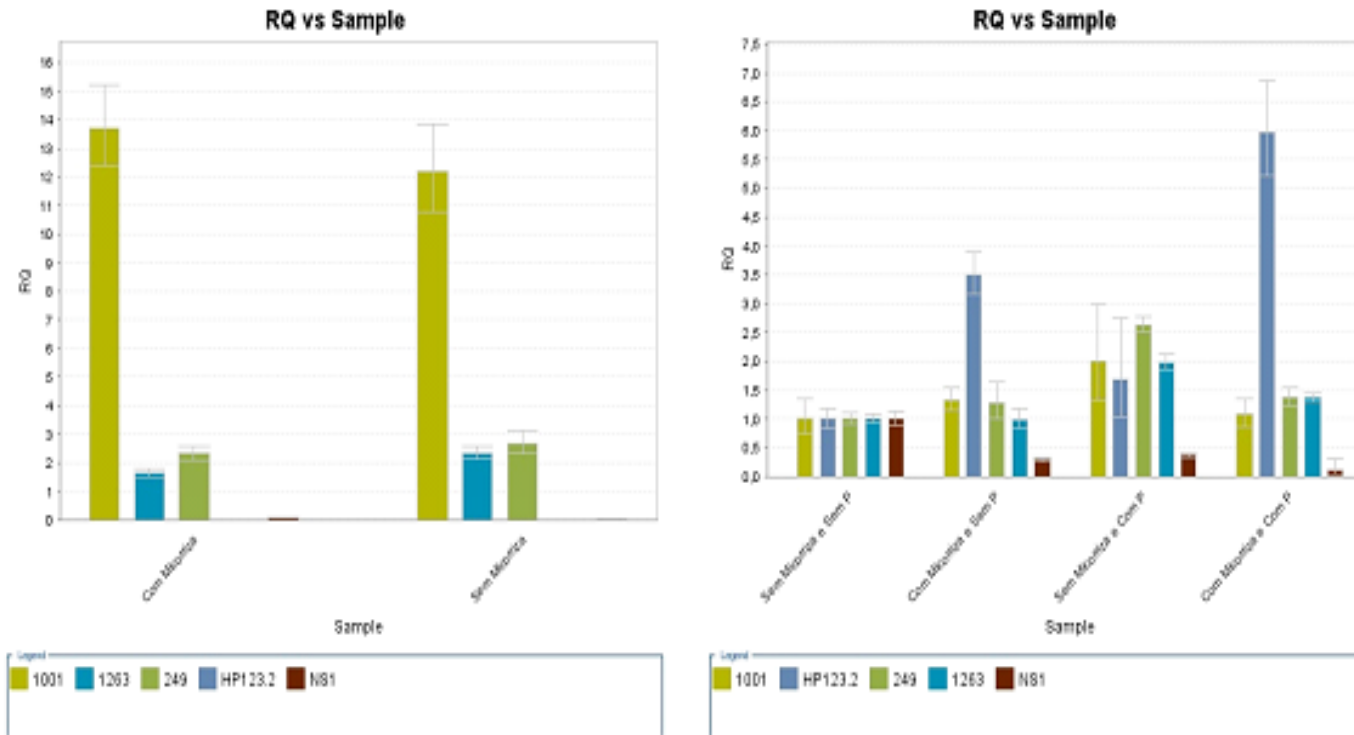


Figura 3 Expressão dos genes da família PHT1 em folhas com P, com e sem micorriza (Painel esquerdo) e raízes com e sem P, com e sem micorriza (Painel direito), de *C. arabica* cultivar catuaí, com primers desenhados a partir dos contigs 1001, 1263, 249, 123 e singlet NS1 sendo a ubiquitina utilizada como gene normalizador.

Formatado

Formatado: Fonte: 10 pt

Formatado: Recuo: À esquerda: 0 cm, Deslocamento: 1,3 cm

Observa-se que a aplicação de P no caso das plantas não micorrizadas influenciou a expressão em raízes (Figura 3-painel direito), de todos os genes Pht1 de café estudados. Somente foi observada uma redução nos níveis de expressão de NS1, com a aplicação de P em plantas não micorrizadas e indução para todos os outros genes estudados. Já no caso de plantas micorrizadas, observa-se que somente o gene 123, apresentou maiores níveis de expressão, com a aplicação de P (Figura 3-painel direito). Na ausência de P, o tratamento com micorriza induziu significativamente a expressão do gene 123, indicando que esse transportador possa [ser](#) induzido por micorriza, porém diferentemente do que se observa na literatura, esse gene apresentou também alta expressão com a aplicação de P. Nestas mesmas condições (ausência de P; ausência e presença de micorriza), observa-se também que houve um pequeno aumento na expressão em raízes micorrizadas dos genes 249 e 1263, porém, o incremento na expressão desses genes foi maior em raízes com a aplicação de P e ausência de micorriza (Figura 3-painel direito), indicando que esses membros possam ser transportadores de baixa afinidade, transportando o Pi quando esse está presente em concentrações mais elevadas. Já o gene NS1 apresentou maiores níveis de expressão em raízes de plantas não micorrizadas, com ausência da aplicação de P. Este dado pode indicar que esse transportador seja membro da família Pht1 de alta afinidade, que absorve P somente em condições severas de déficit desse nutriente.

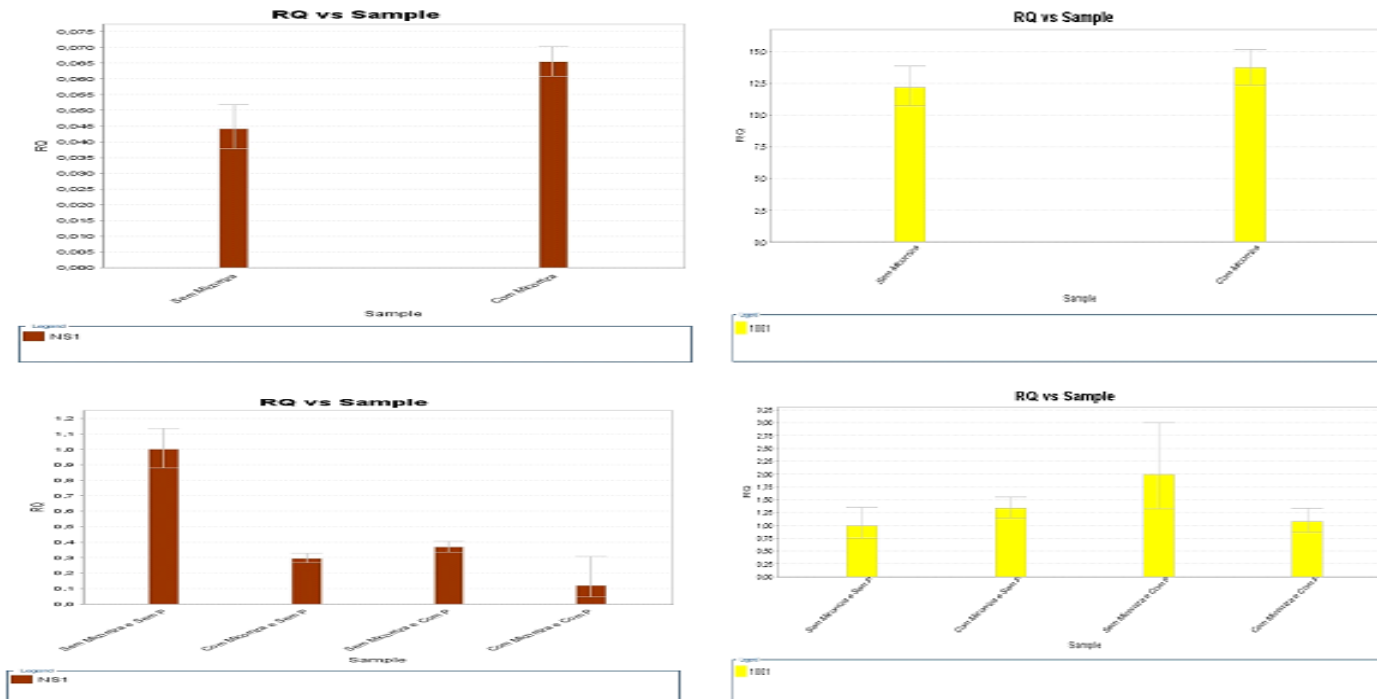


Figura 4 Dados da expressão relativa (qPCR) dos genes NS1 e 1001, em folhas (painel superior) e raízes (painel inferior) de *C. arabica* cultivar catuaí de plantas micorrizadas e não micorrizadas, na ausência e presença de aplicação de P. Os gráficos da esquerda são do gene NS1 e os da direita do gene 1001, todos analisados utilizando-se a ubiquitina como controle endógeno

Formatado

Formatado: Fonte: 10 pt

Em consonância com os dados da análise global, a [Figura 4](#) nos permite observar que a expressão do gene NS1 é induzida em folhas de plantas de café micorrizadas (painel superior esquerdo). Observa-se também, que na ausência de aplicação de P, a expressão do gene NS1 é significativamente reduzida em raízes de plantas de café micorrizadas.

Além disto, observa-se claramente pelos dados da Figura 4 (painel inferior esquerdo), que na ausência de micorriza, ocorre também uma redução significativa na expressão do gene NS1 em função da aplicação de P.

Pode-se observar também uma tendência de indução do gene 1001 em folhas de café micorrizadas (Figura 4-painel superior direito), mesmo que não significativa. Ocorreu também uma tendência na expressão de plantas não micorrizadas e com aplicação de P já mencionada anteriormente.

Na [Figura 5](#), podemos observar que houve uma tendência de maior expressão dos genes 249 e 1263 em folhas de plantas não micorrizadas (painel superior), mesmo não sendo estatisticamente significativa.

Os dados apresentados no painel inferior tanto para o gene 249, quanto para o gene 1263, mostram que na presença do P ocorre um aumento na expressão desses genes em raízes das plantas de café, micorrizadas ou não em relação às plantas sem aplicação de P, sendo maior na ausência da micorriza. Como comentado anteriormente nos dados da análise global, esses genes podem estar envolvidos com a captação de P quando esse está presente em altas concentrações no solo.

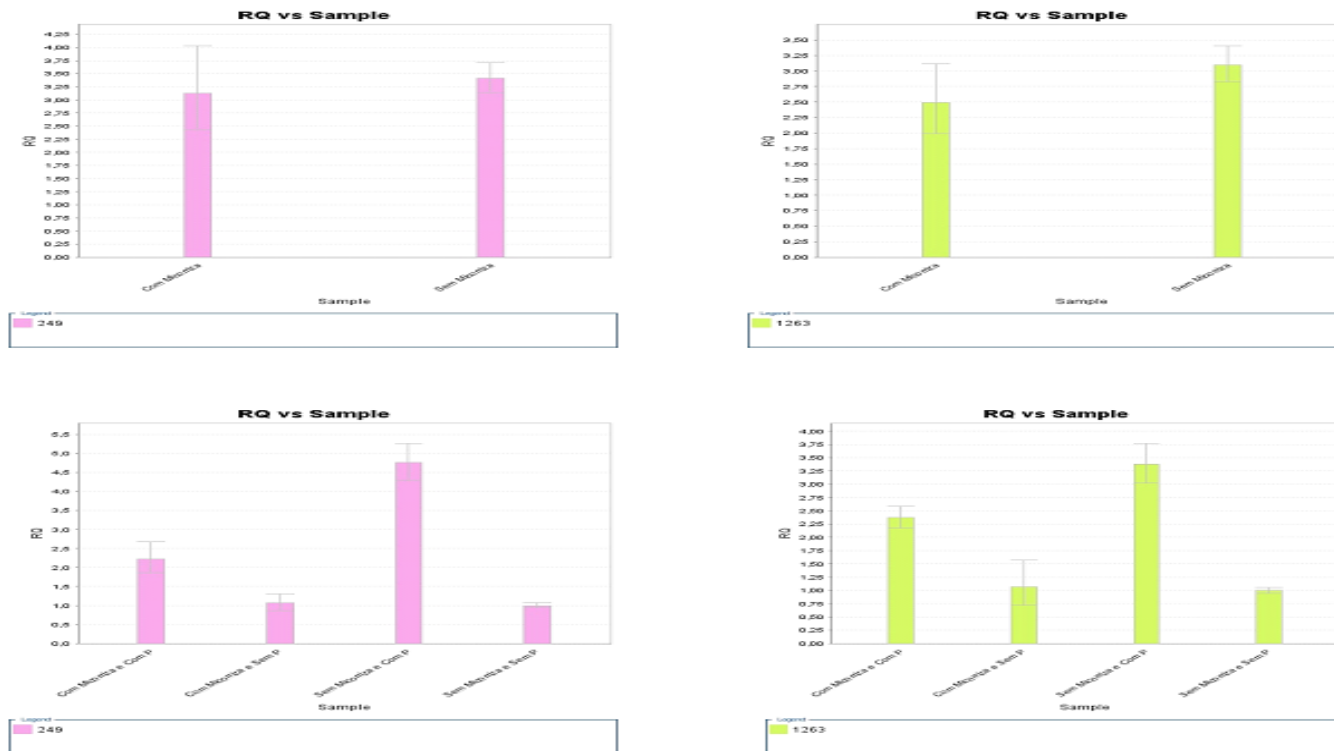


Figura 5 Dados da expressão relativa (qPCR) dos genes 249 e 1263, em folhas (painel superior) e raízes (painel inferior) de *C. arabica* cultivar catuai de plantas micorrizadas e não micorrizadas na ausência e presença de aplicação de P. Os gráficos da esquerda são do gene 249 e os da direita do gene 1263, todos analisados utilizando-se a ubiquitina como controle endógeno

5 CONCLUSÕES

Os dados de expressão relativa por qPCR apresentados neste trabalho, indicam que tanto a associação com fungos micorrízicos como os tratamentos de aplicação de fósforo afetam a expressão dos genes Pht1 analisados, corroborando com a hipótese de que devido à similaridade da sequência proteica observada nos trabalhos descritos no Capítulo 2, a função desses genes pode estar realmente associada ao transporte de Pi em plantas de café.

Excluído: é

Excluído: c

A partir dos dados apresentados, pode-se concluir que a expressão do gene NS1 é induzida em folhas de plantas de café micorrizadas. Além disso, observou-se também, que na ausência de aplicação de P, a expressão do gene NS1 é significativamente reduzida em raízes de plantas de café micorrizadas. Redução significativa na expressão do gene NS1 em raízes também foi observada no tratamento com aplicação de P, na ausência de micorriza.

Excluído: t

Excluído:

Excluído: ,

Não foi observada expressão do gene 123 em folhas, característico de genes transportadores de P induzidos por micorriza. Além disto, observou-se que em raízes de plantas de café micorrizadas com ou sem aplicação de P a expressão deste gene foi mais elevada em relação a plantas não micorrizadas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. S. **Identificação e caracterização de genes de transportadores de fosfato em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2002. 90 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2002.

BOSSE, D.; KÖCK, M. Influence of phosphate starvation on phosphohydrolases during development of tomato seedlings. **Plant Cell Environment**, London, v. 21, n. 3, p. 325-332, 1998.

CHIOU, T. J.; LIU, H.; HARRISON, M. J. The spatial expression patterns of a phosphate transporter (MtPT1) from *Medicago truncatula* indicate a role of phosphate transporter in the root/soil interface. **Plant Journal**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 1-15, Feb. 2001.

DARAM, P. et al. Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato. **Planta**, Berlin, v. 206, n. 2, p. 225-233, Aug. 1998.

DOERNER, P. Phosphate starvation signalling: a threesome controls systemic Pi homeostasis. **Current Opinion Plant Biology**, London, v. 11, n. 5, p. 536-540, Oct. 2008.

DUFF, S. M. G.; PLAXTON, W. C.; LEFEBVRE, D. D. Phosphate-starvation response in plant cells: of new synthesis and degradation of acid phosphatases. **Proceedings of National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 88, n. 21, p. 9538-9542, Nov. 1991.

DUMONT, F. et al. Isolation and characterization of cDNA sequences controlled by inorganic phosphate in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Science**, Shannon, v. 89, n. 1, p. 55-67, Jan. 1993.

EZAKI, B.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H. Cloning and sequencing of the cDNAs induced by aluminum treatment and Pi starvation in cultured tobacco cells. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 93, n. 1, p. 11-18, Jan. 1995.

FANG, Z. Y. et al. Phosphate signaling in Arabidopsis and Oryza sativa. **Plant Science**, Clare, v. 176, n. 2, p. 170-180, 2009.

HAMMOND, J. P.; BROADLEY, M. R.; WHITE, P. J. Genetic responses to phosphorus deficiency. **Annals of Botany**, London, v. 94, n. 3, p. 323-332, Aug. 2004.

HARRISON, M. J.; DEWBRE, G. R.; LIU, J. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 10, p. 2414-2429, Oct. 2002.

HENDERSON, P. J. F. The 12-transmembrane helix transporters. **Current Opinion of Cell Biology**, London, v. 5, n. 4, p. 708-721, 1993.

LEGGEWIE, G.; WILLMITZER, L.; RIESMEIER, J. W. Two cDNAs from potato are able to complement a phosphate uptake-deficient yeast mutant: identification of phosphate transporters from higher plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 3, p. 381-392, 1997.

LIU, C. et al. Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissue by phosphorus. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 1, p. 91-99, Jan. 1998.

LIU, H.; TRIEU, A. T.; BLAYLOCK, L. A. Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 11, n. 1, p. 14-22, Jan. 1998.

MITSUKAWA, N. et al. Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* high-affinity phosphate transporter gene in tobacco cultured cells enhances cell growth under phosphate-limited conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, n. 13, p. 7098-7102, June 1997.

MUCHHAL, U. S.; PARDO, J. M.; RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 13, p. 10519-10523, June 1996.

MUCHHAL, U. S.; RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate starvation induced changes in the expression of tomato Ca²⁺-ATPase. **Plant Physiology**, Washington, v. 108, n. 112, p. 112-114, 1995.

MUDGE, S. M. et al. Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of the phosphate transporters in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Rockville, v. 31, n. 3, p. 341-353, Aug. 2002.

MUKATIRA, U. T. et al. Negative regulation of phosphate-induced genes. **Plant Physiology**, Washington, v. 127, n. 12, p. 1854-1862, Dec. 2001.

NAGY, R. et al. Characterization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transport in solanaceous species. **The Plant Journal**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 236-250, Mar. 2005.

OKUMURA, S. et al. Phosphate transporter gene family of *Arabidopsis thaliana*. **DNA Research**, Oxford, v. 5, n. 5, p. 261-269, 1998.

PASZKOWSKI, U. et al. Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 20, p. 13324-13329, Oct. 2002.

RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate acquisition. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 665-693, 1999.

SMITH, F. W. The phosphate uptake mechanism. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 245, n. 1, p. 105-114, Aug. 2002.

SMITH, S. E.; ROBSON, A. D.; ABBOTT, L. K. The involvement of mycorrhizas in assessment of genetically dependent efficiency of nutrient uptake and use. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 146, n. 1/2, p. 169-179, Oct. 1992.

THEODOROU, M. E.; PLAXTON, W. C. Induction of Ppi-dependent phosphofructokinase by phosphate starvation in seedlings of *Brassica nigra*. **Plant Cell Environment**, London, v. 17, n. 3, p. 287-294, Apr. 1994.

UHDE-STONE, C. et al. Nylon filter arrays reveal differential expression in proteoid roots of white lupin in response to phosphorous deficiency. **Plant Physiology**, Washington, v. 131, n. 3, p. 1064-1079, Mar. 2003.

111

Formatado: Fonte: 10 pt
Formatado

ANEXOS

Tabela 1 Análise de variância para área foliar

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	5	5189.116967	1037.823393	21.722	0.0000
SEM FÓSFORO	1	3.168400	3.168400	0.066	0.7990
TRATAMENTO*SEM FÓSFORO	5	541.427867	108.285573	2.266	0.0802
ERRO	24	1146.675267	47.778136		
TOTAL CORRIGIDO	35	6880.388500			

Excluído: ¶
Formatado: Fonte: 10 pt

Tabela 2 Análise de variância de peso foliar

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	5	0.111156	0.022231	12.621	0.0000
SEM FÓSFORO	1	0.001838	0.001838	1.043	0.3173
TRATAMENTO*SEM FÓSFORO	5	0.021617	0.004323	2.454	0.0623
ERRO	24	0.042276	0.001761		
TOTAL CORRIGIDO	35	0.176886			

Formatado: Fonte: 10 pt
Excluído: ¶

Tabela 3 Análise de variância em matéria seca

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	5	0.230685	0.046137	9.840	0.0000
SEM FÓSFORO	1	0.000695	0.000695	0.148	0.7036
TRATAMENTO*SEM FÓSFORO	5	0.022108	0.004422	0.943	0.4714
ERRO	24	0.112526	0.004689		
TOTAL CORRIGIDO	35	0.366014			

Formatado: Fonte: 10 pt

Excluído: ¶

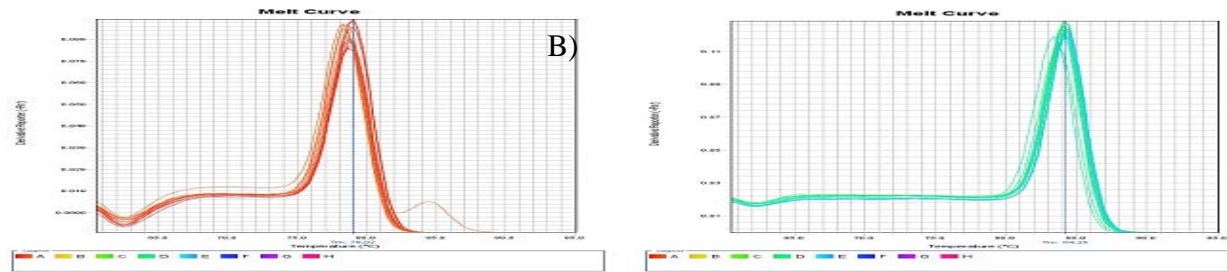
Tabela 4 Análise de variância em número de esporos

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	5	47675842.944444	9535168.588889	19.043	0.0000
ERRO	12	6008485.333333	500707.111111		
TOTAL CORRIGIDO	17	53684328.277778			

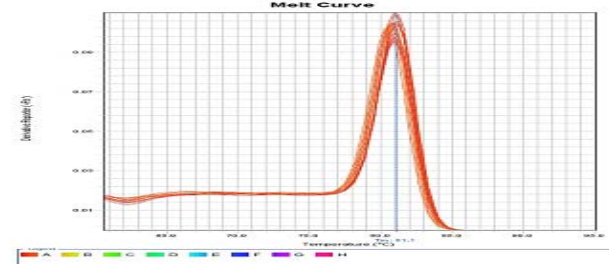
Tabela 5 Análise de variância para % de colonização

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FUNGO	5	4.794.916.667	958.983.333	77.407	0.0000
TEMPO	1	26.694.444	26.694.444	2.155	0.1551
FUNGO*TEMPO	5	43.805.556	8.761.111	0.707	0.6238
ERRO	24	297.333.333	12.388.889		
TOTAL CORRIGIDO	35	5.162.750.000			

A)



C)



D)

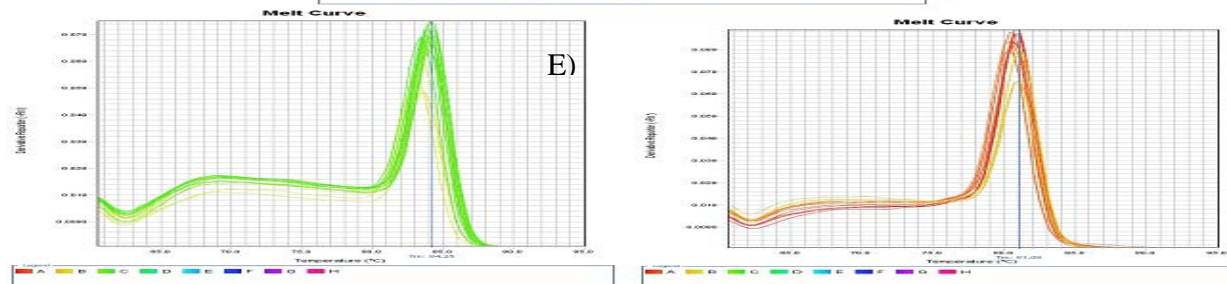


Figura 1 Curvas de dissociação dos cinco pares de primers utilizados neste trabalho. A) Contig 123, B) Contig 249, C) Contig 1001, D) Contig 1263 e E) Singlet NS1

Página iii: [1] Excluido	Gilvania	02/06/2012 11:52:00
M		
Página iii: [1] Excluido	Gilvania	02/06/2012 11:52:00
C		
Página iii: [2] Excluido	Magda	29/08/2012 19:36:00
3.2 Solo.....		36
Página iii: [3] Excluido	Magda	29/08/2012 19:37:00
4		
Página iii: [3] Excluido	Magda	29/08/2012 19:37:00
8		
Página iii: [4] Excluido	Magda	29/08/2012 19:37:00
5		
Página iii: [4] Excluido	Magda	29/08/2012 19:38:00
3		
Página iii: [4] Excluido	Magda	29/08/2012 19:38:00
9		
Página iii: [5] Excluido	Magda	29/08/2012 20:22:00
4		
Página iii: [5] Excluido	Magda	29/08/2012 19:38:00
1		