

CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM TRANSPORTE DE NUTRIENTES EM CAFEEIROS INFECTADOS PELO BICHO-MINEIRO

MARIANA M. SANTOS¹; MIRIAN P. MALUF²; OLIVEIRO G. FILHO³

Nº 11136

RESUMO

O bicho-mineiro, *Leucoptera coffeella*, é a principal praga do cafeeiro, sendo que sua lagarta se alimenta de células do tecido paliádico das folhas e pode causar danos severos ao cafeeiro. Uma alternativa para controle da praga é a utilização de cultivares resistentes ao inseto. No entanto, a disponibilidade de nutrientes minerais pode influenciar a influência do ataque do inseto, pois pode promover modificações na composição química das plantas. Em especial, o nitrogênio e o potássio são muito importantes para o cafeeiro, podendo interferir na sua suscetibilidade ou resistência ao *L. coffeella*. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de genes relacionados com transporte de N e K em mudas de café infestadas pelo bicho-mineiro. Plantas resistentes e suscetíveis ao inseto foram submetidas a 3 meses de tratamento com soluções com diferente disponibilidade de nitrogênio e potássio, e depois foram infestadas com o bicho-mineiro. Foram realizadas coletas das folhas ao longo da infestação para extração de RNA total. A expressão dos genes Asn1, CALC-B, PyrK, ANR1 e SNF1 foi avaliada pela metodologia de PCR em tempo real, e utilizando primers-gene específicos de sequências homólogas aos genes selecionados. Diferenças de expressão dos genes foram significativas entre mudas controle e mudas submetidas ao tratamento, porém não foram observadas entre as mudas tratadas. A expressão dos genes ANR1, Asn1 e PyrK foi diferencial entre mudas resistentes e suscetíveis, não-tratadas, em resposta ao ataque pelo bicho-mineiro.

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, PUC-CAMPINAS, Campinas-SP, □
mariana_martinis@hotmail.com

² Orientadora: Pesquisadora, Embrapa Café/ Instituto Agronômico de Campinas, Campinas-SP

³ Colaborador: Pesquisador, Instituto Agronômico de Campinas, Campinas-SP

ABSTRACT

The leaf miner, *Leucoptera coffeella*, represents the main pest of coffee culture. The leaf-miner caterpillar feeds on cells of the palisade tissue of leaves and can cause severe damage to coffee plants. An alternative to control the insect incidence is to use resistant cultivars. However, the availability of mineral nutrients can influence the intensity of insect attacks, due to possible changes in chemical composition of plants. In particular, nitrogen and potassium are very important for coffee development and can interfere in the susceptibility or resistance to *L. coffeella*. The objective of this study is to evaluate expression of genes involved in N and K transport and metabolism. Resistant and susceptible plants underwent three months of treatment with different solutions regarding availability of nitrogen and potassium, and were then infested with the leaf miner. Leaves were collected, along insect development, and total RNA was then extracted. Expression of Asn1, CALC-B, PyrK, ANR1 and SNF1 was evaluated by quantitative PCR using gene-specific primers of homologous sequences to selected genes. Differential expression was observed between control and treated seedlings, however no differences were observed among treated seedlings. Expression of Asn1, ANR1 and PyrK genes was differentially regulated in susceptible and resistant seedlings, in response to leaf-miner attack.

INTRODUÇÃO

O bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) é a principal praga do cafeeiro (THOMAZIELLO *et al.*, 1979), sua lagarta se alimenta de células do tecido paliçádico podendo causar danos severos ao cafeeiro (REIS e SOUZA, 1986; SOUZA *et al.*, 1998), podendo levar a prejuízos na produção superiores a 50% (THOMAZIELLO *et al.*, 1979). Para tentar diminuir estes problemas uma solução alternativa é a utilização de cultivares resistentes ao inseto (GUERREIRO FILHO, 1989). O programa de Melhoramento do Centro de Café/ IAC desenvolve cultivares resistentes ao inseto a partir da transferência de genes de resistência presentes em *Coffea racemosa* para cultivares de *C. arabica* (MEDINA-FILHO *et al.*, 1977).

Um dos fatores que pode influenciar o tipo de resposta de defesa ao inseto é a disponibilidade de nutrientes minerais, pois pode promover modificações na composição química das plantas (MARSCHNER, 1995). Em especial, o nitrogênio e o potássio são muito importantes para o cafeeiro, podendo interferir na sua suscetibilidade ou resistência ao *L. coffeella* (MARSCHNER *et al.*, 1995; TAIZ e ZEIGER, 2004).

O nitrogênio faz parte da composição de aminoácidos e proteínas, sendo importante no metabolismo das plantas. Sendo assim, quando a planta está com deficiência de nitrogênio, esta passa a desenvolver-se menos, pela falta de proteínas (FERRI, 1985). E o potássio é muito importante por ativar enzimas envolvidas nos processos de respiração e fotossíntese (TAIZ e ZEIGER, 2004). Além de fazer parte do metabolismo da planta como reações de fosforilação, síntese de carboidratos e síntese de proteínas (FERRI, 1985). De acordo com CAIXETA et al. (2004), o nitrogênio em quantidade adequada junto com o excesso de potássio resulta em um maior número de ataques do bicho-mineiro, como consequência do aumento na quantidade de proteínas e diminuição de lignina, açúcares e amido.

Em um estudo anterior, Martinatti et al (2009) avaliaram o nível de expressão de genes envolvidos no transporte e regulação de potássio (K), nitrogênio (N) e fósforo (P) em plantas de café ao longo da infecção pelo bicho-mineiro. Plantas suscetíveis tiveram um aumento na expressão dos genes KEA-5, NRT-2 e PII, e plantas resistentes tiveram expressão aumentada dos genes HAT -5 e PAP-1. Pelos perfis de expressão obtidos foi possível verificar que há uma diferença na expressão destes genes entre plantas suscetíveis e resistentes nos estágios de lesão do inseto, com exceção do gene NRT-2.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diferença na resposta de plantas resistentes e suscetíveis com diferente disponibilidade de nitrogênio e potássio ao ataque do bicho mineiro, a partir da caracterização da expressão de genes relacionados com o transporte destes dois nutrientes nas plantas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas buscas direcionadas no Banco de Dados do Genoma Café para identificar sequências homólogas aos genes selecionados, que estão relacionados com a assimilação de nitrogênio (ANR1, Asparagina synthase e SNF1 Kinase) e potássio (Pyruvato kinase e Calcineurin B-Like). As buscas foram complementadas por análises em outros bancos de dados: Banco de Dados Genômicos de Solanáceas (<http://solgenomics.net/>), Pfam (pfam.sanger.ac.uk/) e o Nacional Center of Biotechnology Information - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Após a identificação das sequências correspondentes, primers gene-específicos foram desenhados, utilizando-se o aplicativo Primer Express 3.0 (Applied Biosystems).

A eficiência dos primers foi avaliada a partir de reações de PCR utilizando DNA genômico extraído de folhas de cafeeiros (DOYLE e DOYLE, 1991). As condições de

reação utilizadas para os primers ANR1, Asn1, Pyr K, CALC-B, SNF1 K1 e SNF1K2 foram um ciclo de 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 52°C e 1 minuto a 72°C e 1 ciclo de 72°C por 10 minutos. Já para os primers Glusynt e Asn2 as condições foram um ciclo de 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C e 1 minuto a 72°C e 1 ciclo de 72°C por 10 minutos. Para visualização dos produtos de PCR foi utilizada a técnica de eletroforese com gel de agarose 3%.

Foram preparadas soluções nutritivas com diferentes disponibilidades de nitrogênio e potássio, de acordo com um estudo anterior de indução de deficiência nutricional realizado no departamento de Fitotecnia da UFV (MARTINEZ, 1999). Neste estudo foram feitas algumas alterações de acordo com as necessidades do atual trabalho. Na solução N+K+ foram utilizados: 6ml/L de KNO₃ 1M, 4ml/L de Ca(NO₃)₂.H₂O 1M, 2ml/L de NH₄H₂PO₄ 1M, 2ml/L de MgSO₄.7H₂O 1M e 2ml/L de Micronutrientes. E na solução N-K- foram utilizados: 2ml/L de MgSO₄.7H₂O 1M, 200ml/L de CaSO₄2H₂O 0,1M, 2ml/L de CaCl₂.2H₂O 1M e 2ml/L de Micronutrientes.

Mudas de progênie de uma população resultante do cruzamento entre *Coffea arabica* x *C. racemosa* (F₂RC₄ e F₂ RC₅), resistentes ao bicho-mineiro e plantas da cultivar Obatã suscetíveis ao bicho-mineiro foram selecionadas para o experimento. As mudas foram limpas, e transferidas para substrato de quartzo, e após um período de adaptação ao substrato, foram submetidas a tratamento com as diferentes soluções nutritivas (25ml/dia). Os teores de micro e macronutrientes foram quantificados após 3 meses de tratamento. Após o tratamento estas plantas foram colocadas em gaiolas com o bicho-mineiro para infestação. Foram realizadas coletas de folhas de todas as plantas nos tempos T₀ (antes da infestação), T₃ (lesões iniciais), T₄ (lesões avançadas). As coletas foram realizadas com N₂ líquido e as folhas foram mantidas em Ultra Freezer a -80°C.

Foi realizada a extração do RNA das folhas de todos os tempos (T₀, T₃ e T₄) a partir da adaptação do protocolo de extração de cloreto de lítio descrito por CHANG *et al.* (1993) e a qualidade dos ácidos nucleicos extraídos foi avaliada pela metodologia de eletroforese em gel de agarose 1% e quantificado em espectrofotometria, medindo-se a absorbância entre 220-280nm. A partir destes RNAs foi sintetizado cDNA seguindo o protocolo da Fermentas (RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit). O cDNA sintetizado foi quantificado em espectrofotometria, medindo-se a absorbância em 220-280nm. Utilizando os cDNAs e todos os primers confeccionados foram feitas reações de qRT-PCR (Sybr Green 2X, primers 10p/moles) para analisar a diferença de expressão dos genes em cada tempo da infestação do bicho-mineiro. As

condições de reações foram as recomendadas pelo protocolo do kit Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas). Os resultados foram analisados através do software SDS version 1.3.1 (Applied Biosystems), as frequências dos transcritos foram estimadas através do uso dos parâmetros “threshold”, “baseline” e CT (Iskandar et al., 2004). Nas análises, os níveis de transcrição dos genes alvo foram normalizados contra o perfil transcricional do gene GAPDH, à excessão dos tratamentos com N⁺K⁺ e N⁻K⁻, onde foi utilizado o perfil do gene polyubiquitina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foi estabelecido um experimento-piloto para avaliar como a deficiência de N e K, em mudas de genótipos resistentes e suscetíveis, afeta a resposta de defesa ao bicho-mineiro e a expressão de genes selecionados. Após 3 meses de tratamento as mudas apresentaram sinais visíveis de deficiência nutricional, tais como amarelamento das folhas e perda de robustez. No entanto, as análises foliares de micro e macronutrientes das mudas em tratamento indicaram que tanto nas mudas irrigadas com solução N+K+ quanto nas irrigadas com N-K- os teores de ambos nutrientes se mantiveram estáveis (Tabela 1).

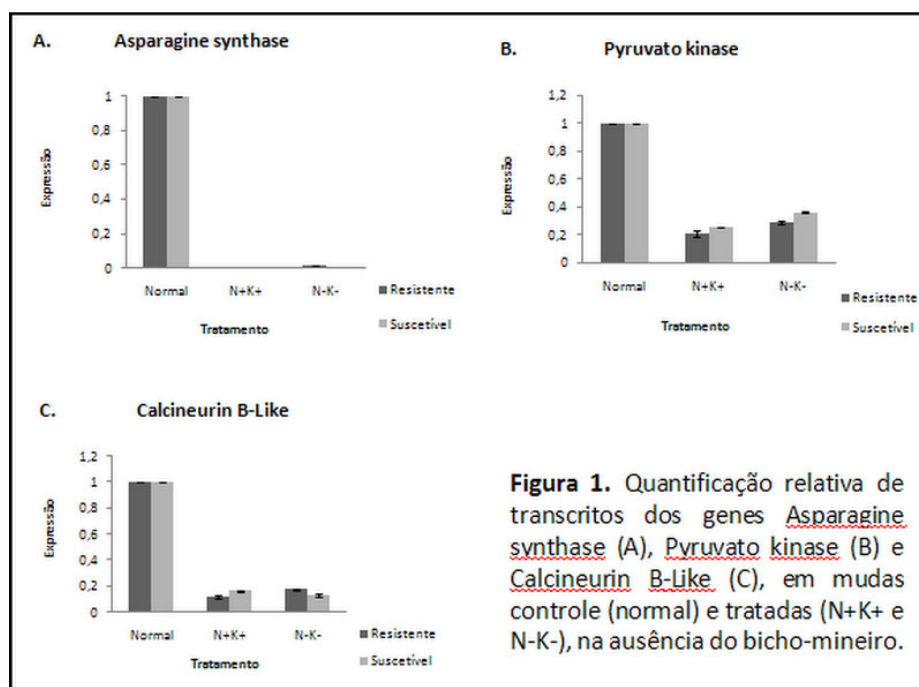
TABELA 1. Porcentagem de N e K em folhas secas de cafeeiros submetidas aos tratamentos N+K+ e N-K-

	N+K+		N-K-	
	Nitrogênio (%)	Potássio (%)	Nitrogênio (%)	Potássio (%)
Resistente	15100,00	17800,00	13900,00	14400,00
Suscetível	19100,00	16000,00	19000,00	21000,00

Este resultado indica que apesar do tratamento estar promovendo uma resposta fisiológica nas mudas, mecanismos moleculares de realocação de nutrientes podem estar ativos e levando à manutenção de teores foliares estáveis dos macronutrientes. Neste caso, o tratamento com as soluções nutritivas específicas deverá ser prolongado por um período maior.

Outro aspecto estudado aqui foi a expressão de genes relacionados com o metabolismo de N e K em mudas tratadas ou não, e infestadas pelo bicho-mineiro. Os resultados da quantificação relativa da expressão dos genes selecionados são apresentados nas Figuras 1 e 2. A maioria dos primers testados apresentaram perfil de amplificação adequado para quantificação, com excessão dos primers

correspondentes ao gene *Glusynt*. A figura 1 apresenta resultados da quantificação relativa da expressão de genes em mudas tratadas e controle, na ausência do bicho-mineiro. É possível observar diferenças significativas na expressão dos genes entre plantas submetidas a condições de nutrição diferencial (N+K+ e N-K-) e plantas controle, mantidas em condições normais de cultivo. Esta diferença é observada apesar de não haver deficiência relativa de N e K nas folhas tratadas. Também é possível observar que as plantas submetidas aos dois tratamentos, com e sem deficiência não tiveram diferença significativa de expressão. Estes dados indicam que a expressão de genes do metabolismo de N e K é afetada pela transferência das mudas de substrato completo para substrato inerte e irrigação com solução nutritiva. Neste caso, o efeito do tratamento na expressão dos genes não é significativo nas condições aqui estabelecidas.



A figura 2 apresenta os resultados da quantificação da expressão dos genes selecionados em mudas controle, durante a infestação do bicho-mineiro. Pode-se observar uma maior diferença na expressão relativa dos genes nas plantas com lesões do bicho-mineiro quando comparadas com as plantas não infestadas. Houve uma maior expressão do gene *Asn1* (gráfico A) nas plantas suscetíveis com lesões e nas plantas resistentes com lesões houve uma expressão muito baixa comparando-se

com as plantas sem lesões. Já o PyrK (Gráfico B) teve menor expressão nas mudas com lesões em relação às sem lesões, sendo que este gene foi mais expresso nas mudas suscetíveis do que nas resistentes. A expressão dos genes CALC-B (Gráfico C) e SNF1 (Gráfico D) foi similar, sendo um pouco mais baixa nas mudas com lesões em relação às plantas sem infestação. O gene ANR1 (Gráfico E) apresentou baixa expressão nas plantas resistentes com lesões, e nas plantas suscetíveis teve grande variação entre as lesões pequenas e as lesões grandes. Assim, foi observada uma expressão diferencial mais evidente para os genes Asn1, ANR1 e PyrK entre mudas resistentes e suscetíveis. Desta maneira, pode-se sugerir que mecanismos de defesa distintos podem estar sendo ativados em resposta ao bicho-mineiro nestes genótipos.

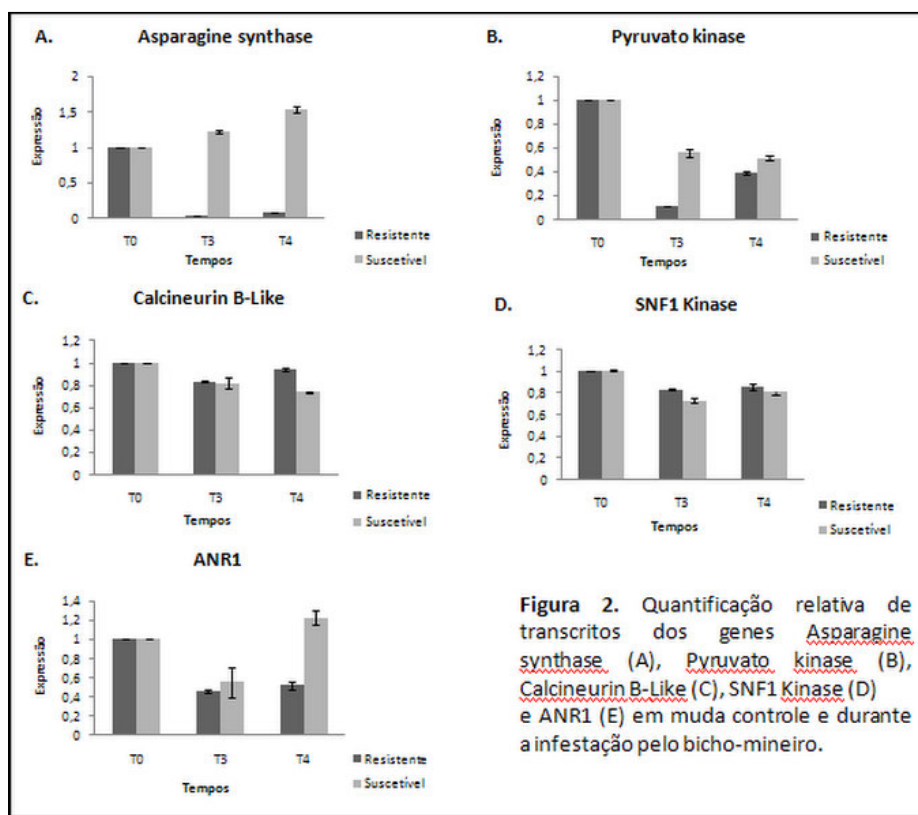


Figura 2. Quantificação relativa de transcritos dos genes Asparagine synthase (A), Pyruvato kinase (B), Calcineurin B-Like (C), SNF1 Kinase (D) e ANR1 (E) em muda controle e durante a infestação pelo bicho-mineiro.

CONCLUSÕES

Neste estudo foi possível concluir que existe uma mudança na composição de macronutrientes em mudas transplantadas do seu ambiente natural (terra), e colocada em outro ambiente (substrato de quartzo), apesar da irrigação diária com solução nutritiva. A duração do tratamento com soluções de deficiência de nutrientes deste trabalho não foi suficiente para observar uma notável diferença entre estas e as

plantas com solução completa de nutrientes. A expressão de genes relacionados com transporte e metabolismo de N e K é afetada tanto pelo transplante para substrato inerte quanto pela infestação com o bicho-mineiro.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas, pela oportunidade de estágio.

REFERÊNCIAS

GUERREIRO FILHO, O. *Avaliação da resistência genética de Coffea SSP a Perileucoptera coffeella*. 1989. 118p. Dissertação de Mestrado pelo Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.

MARSCHNER, H. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2.ed. San Diego: Academic Press, 1995. 889p.

MARTINATI, J. C., MOLINO, J.V.D., BOUNTURI, N., MARTARELLO, F.H.H., GUERREIRO FILHO, O., MALUF, M. P. Expressão de genes relacionados ao metabolismo de nitrogênio, fósforo e potássio em cafeeiros submetidos ao estresse biótico In: VI Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2009, Vitória, ES. *Anais do VI Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*, 2009.

MEDINA-FILHO H.P., CARVALHO, A.; MONACO, L.C. Melhoramento do cafeeiro. XXXVII. Observações sobre a resistência do cafeeiro ao bicho-mineiro. *Bragantia* v. 36, p. 131-137, 1977.

REIS P.R.; SOUZA J.C. de. *Pragas do cafeeiro*. In: *Cultura do cafeeiro: Fatores que afetam a produtividade*. Eds: RENA, A.B. et al. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa do Potássio e do Fósforo. p. 347-356. 1986.

SOUZA, J.C.; REIS, P.R.; RIGINATO, R.L.O. *Bicho-Mineiro do cafeeiro: biologia, danos e manejo integrado*. 2.ed. Belo Horizonte : EPAMIG, 1998. 48p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. Ed 3ª, Editora Artmed: São Paulo, 2004. p. 95-113, 285-334.

THOMAZIELLO, R. A.; TOLEDO-FILHO, J.A.; OLIVEIRA, E.G.; *Guia para identificação das deficiências minerais, toxides, distúrbios fisiológicos, pragas e doenças do cafeeiro*. Campinas: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, 1979.