

EXPRESSÃO GÊNICA EM RESPOSTA A DEFICIÊNCIA NUTRICIONAL EM FOLHAS RESISTENTES E SUSCETÍVEIS AO BICHO-MINEIRO¹

Fernanda Magalhães Maia²; Bruna Aparecida Strazza³; Juliana Camargo Martinati Schenk⁴; Lilian Padilha⁵; Oliveira Guerreiro-Filho⁶; Mirian Perez Maluf⁷

1 Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de pesquisas e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café

2 Bolsista Consórcio Pesquisa Café, BS, fernandammaia@hotmail.com

3 Bolsista Consórcio Pesquisa Café, BS, bruna.strazza@yahoo.com

4 Pesquisadora, DSc, Instituto Agronômico de Campinas, Campinas-SP, julianamartinati@gmail.com

5 Pesquisadora, DSc, Embrapa Café, Brasília-DF, lilian.padilha@embrapa.br

6 Pesquisador, DSc, Instituto Agronômico de Campinas, Campinas-SP, oliveiro@iac.sp.gov.br

7 Pesquisadora, PhD, Embrapa Café, Brasília-DF, mirian.maluf@embrapa.br

RESUMO: A resposta de defesa de cafeeiros infestados pelo bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) é influenciado por aspectos fisiológicos entre os quais está a disponibilidade de nutrientes. Plantas resistentes podem exibir lesões foliares correspondentes ao desenvolvimento do inseto quando a lavoura tem deficiência de adubação. O conhecimento sobre a interação entre mecanismos de transporte de nutrientes e resposta de defesa ao bicho-mineiro podem contribuir na elucidação da resistência ao inseto em cafeeiros. Este estudo avaliou a expressão relativa de genes associados ao metabolismo de potássio e nitrogênio, ao estresse oxidativo e a mecanismos de defesa em mudas de cafés submetidas a condições nutricionais limitantes. Mudas de progênes resistentes e suscetíveis ao bicho-mineiro foram mantidas em soluções contendo concentrações variáveis de macronutrientes (N+K+, N+K-, N-K+, N-K-). Após o tratamento, as folhas foram coletadas para extração do RNA e posterior caracterização da expressão de genes por qRT-PCR. Genes do metabolismo de potássio apresentaram expressão diferencial entre plantas resistentes e suscetíveis. O perfil de expressão dos genes do metabolismo de Nitrogênio não apresentou diferenças entre as progênes. Além disso, genes diretamente relacionados com a defesa ao bicho-mineiro e ao estresse oxidativo apresentaram expressões diferenciais significativas entre plantas resistentes e suscetíveis. Estas análises preliminares sugerem que a regulação da absorção e/ou transporte de nutrientes não são atividades iniciais na resposta de cafeeiros, e que a ativação de mecanismos de defesa em geral é a resposta inicial à deficiência nutricional.

PALAVRAS-CHAVE: nutrição mineral, mecanismos de defesa, dano oxidativo.

GENE EXPRESSION DURING RESPONSE TO NUTRIENT DEFICIENCY IN LEAF-MINER RESISTANT AND SUSCEPTIBLE GENOTYPE

ABSTRACT: Several physiologic factors affect the defense response of coffee trees to the leaf-miner (*Leucoptera coffeella*), including nutrient availability during plant growth. Resistant coffee plants may exhibit leaf-miner infection when field nutritional status is critical. Knowledge of how biological mechanisms associated with transport of macronutrients and defense to leaf-miner infection interact may provide insights to elucidate the resistance response. In this study, we investigated the expression profile of genes from potassium and nitrogen metabolism, oxidative stress and defense response, in coffee seedlings submitted to limiting nutritional conditions. Young plants from both resistant and susceptible genotypes were irrigated with solutions containing variable macronutrients (N+K+, N+K-, N-K+, N-K-). After treatment, leaves were collected, total RNA extracted and gene expression was evaluated by qRT-PCR. Genes involved with potassium metabolism exhibited differential expression between susceptible and resistant plants in response to nutritional stress. On the other hand, expression profile of genes from nitrogen metabolism was similar in both genotypes. In addition, genes directly involved with defense mechanisms and oxidative stress exhibited the most significant expression differences when compared with genes from nutrient metabolism. These preliminary analyses suggest that regulation of nutrient up-take and/or transport may not play an initial role during coffee response, and instead the activation of defense mechanisms is the initial response to low nutrient availability.

KEYWORDS: mineral nutrition, defense mechanisms, oxidative stress.

INTRODUÇÃO

A nutrição mineral exerce um papel importante na susceptibilidade de plantas a diferentes patógenos, influenciando nas reservas de alimentos disponíveis ao patógeno e causando variações nos seus mecanismos de defesa. Em uma situação de desequilíbrio nutricional, a planta fica geralmente muito mais vulnerável à doença. Elementos minerais estão envolvidos nos mecanismos de aumento ou diminuição da susceptibilidade (Huber e Watson 1974; Pretty, 1982). Essa dependência se deve ao fato dos nutrientes minerais terem um efeito significativo no padrão de crescimento, morfologia

e anatomia, e também na composição química da planta. Assim, a síntese de compostos orgânicos e secundários envolvidos na resposta de defesa, tais como fitoalexinas, ligninas, terpenóides, alcalóides, compostos fenólicos, é totalmente dependente da disponibilidade de nutrientes minerais, essencialmente N, K, P, S, Si, Fe, Mn, etc. (Taiz e Zeiger, 2004). Com relação ao efeito de macronutrientes essenciais, N e K, na resposta de defesa pode-se afirmar que um excesso de N na planta leva a um aumento na severidade dos sintomas causados por infecção de patógenos obrigatórios, devido à consequente redução da síntese de compostos fenólicos. Por outro lado, a deficiência de N promove uma maior susceptibilidade a ataque por patógenos facultativos, que preferem tecidos senescentes. Já um baixo nível de K na planta leva a um aumento generalizado de infecções por patógenos, uma vez que nestes casos ocorre um acúmulo de aminoácidos solúveis e uma redução na lignificação de tecidos (Taiz e Zeiger, 2004).

O bicho-mineiro, *Leucoptera coffeella*, é uma praga que causa severos danos em lavouras de café, pois alimenta-se do mesófilo foliar, reduzindo a área fotossintética, provocando queda prematura das folhas e por consequência redução na produção de frutos (Reis e Souza, 1986; Guerreiro Filho, 1999). A influência da nutrição e das condições fisiológicas das plantas na incidência de postura e no desenvolvimento das lagartas do bicho-mineiro é conhecida. Os cafeeiros são especialmente exigentes em relação aos macronutrientes nitrogênio e potássio. Ambos podem conferir maior tolerância ou suscetibilidade ao inseto. O nitrogênio tem importância na atividade fotossintética, na síntese de aminoácidos e de proteínas e por consequência na sobrevivência de insetos. Por outro lado, o potássio proporciona menor sobrevivência de insetos em função de seu papel na lignificação de tecidos e na síntese e transporte de carboidratos (Caixeta et al., 2004).

Apesar da relação entre resposta de defesa e estado nutricional de lavouras de café ser conhecida, poucos são os estudos que efetivamente quantificaram essa relação a partir de parâmetros fisiológicos, bioquímicos e moleculares. Neste estudo avaliou-se a resposta de mudas de café resistentes e suscetíveis ao bicho-mineiro submetidas a condições variáveis de nutrientes. O parâmetro selecionado para estudo foi o perfil de expressão de genes envolvidos tanto no metabolismo de nutrientes quanto nas respostas de defesa e estresse oxidativo. Desta maneira pretende-se contribuir para a compreensão molecular da resposta de resistência a pragas, elucidando como a expressão de genes envolvidos nesta resposta é afetada pelas condições nutricionais da planta.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal e Tratamento - Mudas de progênies de uma população resultante do cruzamento entre *C. arabica* x *C. racemosa* (F₂RC₃), resistentes ao bicho-mineiro e plantas da cultivar Obatã suscetíveis foram selecionadas. Mudas de 32 plantas resistentes (nota 1) e 32 plantas moderadamente suscetíveis (nota 3) foram transferidas para sistema hidropônico em vasos com bombas de aeração, em estufa climatizada, contendo solução nutritiva de Hogland completa. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com 4 mudas por vaso, sendo duas resistentes e duas suscetíveis, no total de 16 vasos. As plantas foram mantidas em solução completa por 2 meses, quando foi iniciado os tratamentos para déficit nutricional (N⁺K⁺, N⁺K⁻, N⁻K⁺, N⁻K⁻). Foi utilizado o balanço de nutrientes e a composição dos sais para a adubação das mudas de cafeeiro recomendados por Furlani et al (1999). As trocas das soluções ocorreram uma vez por semana e o pH das soluções foi medido e regulado em torno de pH 5,5 em dias alternados. Para controle dos teores de macro e micronutrientes foram coletadas folhas das mudas no início de cada tratamento para análise foliar. Ao final do experimento foram coletadas folhas das mudas de cada tratamento para extração de RNA.

Avaliação da expressão de genes - Para as análises de expressão gênica o RNA total foi extraído utilizando-se protocolo com tampão de LiCl (Chang et al., 1993). Para normalizar os valores de quantificação e evitar diferenças planta-a-planta foram feitos bulks de RNA total das plantas em avaliação. Os bulks consistiram de amostras de RNA de 4 plantas resistentes e de 4 suscetíveis, diluídas para a concentração de 100ng/μl. Foram então pipetados 5 μl de cada amostra e misturados em um microtubo, finalizando um total de 2 μg de RNA total. Para a síntese de cDNA foi utilizado 500ng de cada bulk. A síntese de cDNA foi realizada a partir do método RT-PCR, utilizando-se kit comercial (Thermo Scientific). O cDNA de cada amostra foi quantificado por meio de espectrometria para posterior diluição nas concentrações desejáveis para elaboração das curvas padrão e análises de expressão. Os genes avaliados estão listados na Tabela 1. A expressão dos genes foi quantificada por qRT-PCR, utilizando-se o fluoróforo Sybr Green e kit comercial de reagentes (Fermentas). As análises foram realizadas de acordo com o manual do fabricante (Applied Biosystems 7300) e utilizando-se o método de cálculo de concentração relativa descrito em Iskandar et al (2004). O gene constitutivo Polyubiquitina foi usado com normalizador (controle endógeno). Os valores obtidos para o controle, mudas suscetíveis irrigadas com solução N+K+, foram utilizados como calibradores para cálculo da concentração relativa.

Tabela 1. Descrição dos genes avaliados com suas siglas, função biológica e primers específicos

| Nome do gene | Processo biológico | Primers |
|---|----------------------------------|---|
| HAK5 (High-affinity K ⁺ transporter) | Transporte de K ⁺ | F: GAGTACCTGGCATTGGCTTCATATA R: CATCGCTGTCCCTTGTATGGTC |
| KEA5 (K ⁺ efflux antiporter 5) | Transporte de K ⁺ | F: GCAGTGGTCTTGAATTTTGTATGG R: AGGCACACATGTCCGAGACAATA |
| Calc-B (Calcineurin B-Like) | Regulação de K ⁺ | F: 5' CCGTATCGGAACCTCCGTTA 3' R: 5' CGCCACAGCCAGAAAGTC 3' |
| SNF1 kinase (fator de transcrição) | Metabolismo de N | F: 5' GAGCACCAACCATTTCGTAAGC 3' R: 5' TGTCAGATTCCTGGGCAAGAA 3' |
| ASN1 (Asparagina sintase) | Metabolismo de N | F: 5' CAAGAGAGGTGGGCTCCAAA 3' R: 5' GGGAGTGGTAGGAATCTGTT TGA 3' |
| GS (Glutamina sintase) | Metabolismo de N | F: 5' TCT CCTTTCGGATCTCATTAACTTG 3' R: 5' ACCGATCCAAACATATTCAGCAA 3' |
| PAL1 (Phenyl-alanine liase) | Síntese de compostos secundários | F: GCAAGGCTTTGTTTCTCGAC R: GAAGTTATGCACGGGAAACC |
| ICL (Isocitrato liase) | Resposta de defesa | F: ATCCAGTATCGCCATGAGC R: GGCACAGCATCAAGAACC |
| NADH-Redutase | Estresse oxidativo | F: 5' CGAATCGATTGCATTGAGG 3' R: 5' CGAGCATCATTAACTCC 3' |
| <i>Metalotioneína-like</i> | Resposta de defesa | F: ATTCGTCTGCTCTGTGAAGATGT R: ATACATGTTTCCGCAGTTTCCT |

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo caracterizou o perfil de expressão de genes relacionados com transporte e metabolismo de potássio (HAK5, KEA5, Calc-B) e nitrogênio (SNF1 kinase, ASN, GS), além de genes relacionados com a resistência ao bicho-mineiro (ICL e *metalotioneína-like*) e estresse oxidativo (NADH-redutase). Os perfis foram caracterizados em mudas de cafeeiros resistentes e suscetíveis ao bicho-mineiro, e irrigadas com soluções contendo combinações variáveis de N e K. Os gráficos das figuras 1 e 2 representam os perfis obtidos para cada gene. De maneira geral não foram observadas variações significativas entre plantas resistentes e suscetíveis nos perfis de expressão dos genes de transporte e metabolismo de N e K (Figura 1). Apenas o gene KEA5, relacionado ao transporte de K, apresentou um perfil de expressão distinto ao observado em plantas resistentes em todos os tratamentos. Também para o gene GS observou-se uma diminuição no nível de transcritos em plantas suscetíveis irrigadas com solução N-K-. As variações mais expressivas no perfil de expressão foram observadas para genes relacionados com resposta de defesa em mudas irrigadas com solução N+K- (Figura 2). Assim, a expressão do gene NADH-oxidase aumentou e a do gene *metalotioneína-like* diminuiu em mudas suscetíveis. Em mudas resistentes foi observado um perfil de expressão similar para estes genes, porém com menos intensidade. Por outro lado, os genes ICL e PAL1, reconhecidamente relacionados com a resistência do bicho-mineiro, tiveram um aumento (ICL) ou diminuição (PAL1) na expressão ao longo dos tratamentos, e diferiram entre plantas resistentes e suscetíveis no tratamento N+K-.

Em resumo, as análises indicam que o tratamento N+K- apresentou as variações mais expressivas no perfil da expressão dos genes avaliados entre mudas resistentes e suscetíveis. Além disso, estas observações sugerem também que a ausência de K pode desencadear uma resposta fisiológica mais expressiva do que a ausência de N. Estudos anteriores indicaram que plantas com adubação de N e K balanceada apresentaram maior incidência de lesões foliares do bicho-mineiro (Caixeta et al, 2004), devido à preferência de oviposição do inseto por folhas com teores de nutrientes que favoreçam o desenvolvimento larval. Neste contexto, as análises preliminares mostradas aqui sugerem uma possível estratégia inicial de defesa. Uma vez que o potássio participa da síntese de carboidratos e lignificação dos tecidos foliares, e que compostos secundários são uma barreira no desenvolvimento do bicho-mineiro, na ausência do K plantas podem reprogramar sua atividade transcricional. Esta reprogramação pode envolver a modulação de vias metabólicas de defesa a herbívoros e ao estresse oxidativo, como observado neste estudo. Outra observação importante relacionada a este estudo é que em mudas de café a resposta à baixa disponibilidade de macronutrientes é iniciada pela ativação de mecanismos de defesa ao invés de mecanismos de transporte interno dos nutrientes.

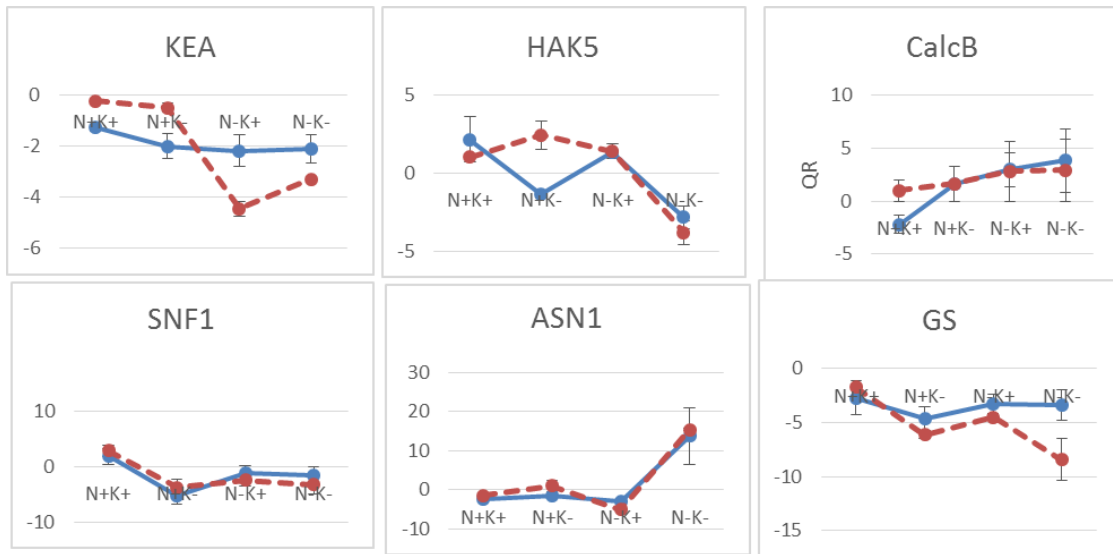


Figura 1 – Expressão relativa (QR) de genes associados ao transporte e metabolismo de Potássio (KEA, HAK5, Calc-B) e Nitrogênio (SNF1, ASN1, GS) em folhas de plantas resistentes (linha sólida) e suscetíveis (linha pontilhada) ao bicho-mineiro.

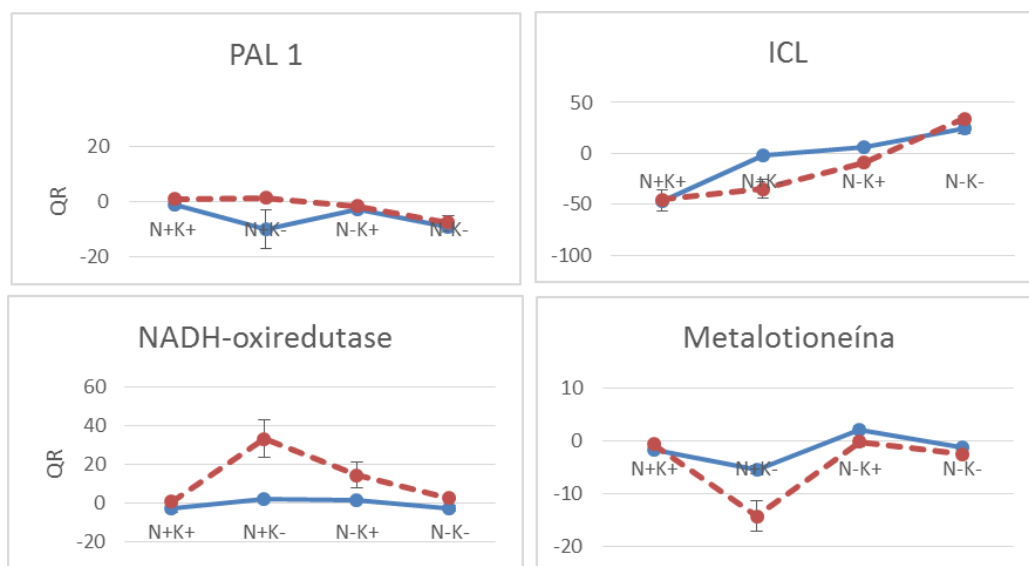


Figura 2 – Expressão relativa (QR) de genes associados à resposta de defesa ao bicho-mineiro (PAL1, ICL, NDAH-oxireductase e *metalotioneína-like*) em folhas de plantas resistentes (linha sólida) e suscetíveis (linha pontilhada).

CONCLUSÕES

A resposta fisiológica em mudas de café submetidas a condições de deficiência nutricional pode ser iniciada pela ativação de genes de defesa ao invés de genes do metabolismo de macronutrientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAIXETA, S. L.; MARTINEZ, H. E. P.; PICANÇO, P. R.; ESPOSTI, M.D.D.; AMARAL, J.F.T. Nutrição e vigor de mudas de cafeeiro e infestação por bicho-mineiro. *Ciência Rural*, 34:1429-1435, 2004.
- CHANG S.; PURYEAR J.; CAIRNEY J. A single and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol*, 11: 113-116, 1993.
- GUERREIRO-FILHO, O.; SILVAROLLA, M.B.; ESKES, A.B. Expression and mode of inheritance of resistance to leaf miner. *Euphytica*, 105:7-15, 1999.

- FURLANI, P. R.; SILVEIRA, L. C. P., BOLONHEZI, D., FAQUIN, V. Cultivo hidropônico de plantas. Campinas: Instituto Agronômico, 1999. 52p. Boletim Técnico IAC, 180.
- HUBER D.M., WATSON, R. D. Nitrogen form and plant disease. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 12:139-165, 1974.
- ISKANDAR, H.M.; SIMPSON, R.S.; CASU, R.E.; BONNETT, G.D.; MACLEAN, D.J.; MANNERS, J.M. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. *Plant Mol Biol Report*, 22:325–337, 2004.
- PRETTY, K.M. O potássio e a qualidade da produção agrícola. In: Yamada T.; Igue K.; Muzilli O.; Usherwood N.R. (Coords.). O potássio na agricultura brasileira. Piracicaba: Instituto de Potassa e Fosfato, p. 177-199, 1982.
- Reis, P.R.; Souza, J.C. Pragas do Cafeeiro. *Cultura do Cafeeiro – Fatores que afetam a produtividade*. Rena, A.B. et al. (eds), Piracicaba, Potafós, 447p. 1986.
- Taiz, L.; Zeiger, E. *Fisiologia vegetal*. 3ª Edição Artmed Editora S/A. Porto Alegre. p.309-332. 2004.