

EFEITO DA FERRUGEM E DA SUPRESSÃO DE NITROGÊNIO NO NÍVEL TRANSCRICIONAL DO GENE *NITRATO REDUTASE (CaNR)* EM *Coffea arabica* L.¹

Tiago Benedito dos Santos^{2*}, Viviane Yumi Baba^{3*}, João Danillo Moura Soares⁴, Kenia de Carvalho⁵, Masako Toma Braghini⁶, Luiz Filipe Protasio Pereira⁷, Douglas Silva Domingues⁸

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

²Bolsista Consórcio Pesquisa Café, DSc, tiagobio02@yahoo.com.br

³Mestranda em Agronomia (UEL), Londrina-PR, vybaba15@gmail.com.br

⁴Mestrando em Genética e Biologia Molecular (UEL), Londrina-PR, j.danillo@yahoo.com.br

⁵Bolsista Consórcio Pesquisa Café, DSc, keniadecarvalho@gmail.com

⁶Bolsista do Consórcio Pesquisa Café, Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Campinas-SP, mako@iac.sp.gov.br

⁷Pesquisador, PhD, Embrapa Café, Brasília-DF, filipe.pereira@embrapa.br

⁸Pesquisador, DSc, Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Londrina-PR, doug@iapar.br

RESUMO: O objetivo do trabalho é avaliar se a ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) pode modular a resposta transcricional de um gene-chave na assimilação de nitrogênio (N), a nitrato redutase, em função da restrição do nutriente e da resposta do cultivar ao patógeno. Sabe-se que o estado nutricional da planta pode influenciar a severidade do ataque por patógenos. A ferrugem no cafeeiro é um problema recorrente em todas as regiões de cultivo, afetando desde a produtividade até a qualidade final da bebida. Apesar da importância da nutrição mineral para a produtividade e seu impacto na resposta à ferrugem, existem poucos estudos relacionados ao estabelecimento da relação molecular entre o estado nutricional do cafeeiro e resposta de defesa a patógenos. Duas cultivares – uma resistente e uma suscetível à ferrugem do cafeeiro – foram submetidas a regimes diferenciais de N e inoculadas com *H. vastatrix*. A análise por qPCR do gene *CaNR* em três períodos pós-inoculação evidenciou padrões transcricionais distintos entre as duas cultivares - a cultivar suscetível apresentou um pico de expressão em período anterior a cultivar resistente. Este estudo preliminar evidencia que fatores genotípicos e nutricionais podem influenciar na atividade de genes relacionados ao metabolismo de N, dando suporte a futuras análises bioquímicas que auxiliem na compreensão de respostas fisiológicas e moleculares relacionadas com a interação da resposta de defesa e o estado nutricional.

PALAVRAS-CHAVE: ferrugem do cafeeiro, assimilação de nitrogênio, padrão transcricional, resposta genotípica

EFFECT OF RUST AND NITROGEN STARVATION IN TRANSCRIPTIONAL LEVELS OF *NITRATE REDUCTASE* GENE (*CaNR*) IN *Coffea arabica* L.

ABSTRACT: The aim of this study is to evaluate if coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) can modulate the transcriptional response of a key gene in nitrogen assimilation (N), nitrate reductase, under nutrient deprivation and cultivar responses to the pathogen. It is known that plant nutritional status may influence the severity of pathogen attack. Coffee leaf rust is a recurring problem in all growing regions, affecting from productivity to cup quality. Despite the importance of mineral nutrition to the productivity and its impact on response to coffee rust, there are few studies establishing the molecular relation between nutritional status and pathogen attack. Two cultivars - one resistant and one susceptible to coffee leaf rust - were maintained in differential N conditions and inoculated with *H. vastatrix*. qPCR analysis of *CaNR* in three time-points after inoculation showed distinct transcriptional patterns between the two cultivars - the susceptible cultivar showed an expression peak in a period prior to the resistant one. This preliminary study shows that genotypic and nutritional factors may influence the transcription pattern of genes related to N metabolism, supporting further biochemical analyses to understand molecular and physiological responses related to the interaction between pathogen attack and nutritional status.

KEY WORDS: coffee rust, nitrogen assimilation, transcriptional pattern, genotypic response

INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é o nutriente mineral mais requerido pelas plantas e sua limitação influi diretamente no crescimento vegetal em ambientes naturais, bem como na produtividade agrícola (Forde e Walch-Liu, 2009; Kraiser et al., 2011). Por consequência, a disponibilidade de N no solo pode influenciar o desenvolvimento das doenças de várias maneiras, ao passo que o crescimento do patógeno pode modificar a absorção e partição do N na planta. No entanto, os efeitos do N sobre as doenças não são plenamente conhecidos. Em um estudo sobre o efeito do N sobre o ataque de diferentes patógenos em tomateiro, Hoffland et al. (2000) verificaram que a influência de N depende do tipo de patógeno. Estudos em outros patossistemas já demonstraram que genes relacionados à assimilação de N podem ser modulados pelo ataque

de patógenos, como em folhas de fumo (Pageau et al., 2006), em feijão (Tavernier et al., 2007) e na interação carvão X milho (Horst et al., 2010). A assimilação do nitrogênio é um processo importante para o crescimento e o desenvolvimento das plantas e tem efeitos marcantes sobre a fitomassa e a produtividade das culturas (Reis et al., 2009). O primeiro passo enzimático da assimilação de N em plantas é mediado pela redutase do nitrato (NR). Os estudos até o momento sobre as respostas moleculares entre a interação ferrugem X cafeeiro encontram-se focados em análises de larga escala (Fernandez et al., 2004; Fernandez et al., 2012) ou em busca de genes candidatos à fonte de resistência derivados desta análise (Ganesh et al., 2006; Petitot et al., 2008; Ramiro et al., 2009). Alguns trabalhos têm demonstrado que o grau de infecção do cafeeiro causado pela ferrugem está diretamente relacionado com seu nível de produção e nutrição (Zambolim et al., 1992; Carvalho et al., 2001), com relação ao nível de nutrientes nas folhas. Entretanto, nenhum estudo até o momento buscou avaliar genes relacionados à assimilação de N na interação ferrugem X cafeeiro. Com base nessas informações, este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil transcricional do gene *CaNR* em condição de supressão de nitrogênio e nos estágios iniciais de inoculação da ferrugem do cafeeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas plantas de aproximadamente um ano de idade de dois cultivares de *Coffea arabica*: IAPAR 59 (resistente à ferrugem) e cv. Catuaí Vermelho IAC 99 (suscetível à ferrugem do cafeeiro - *Hemileia vastatrix* Berk. & Br). As plantas foram mantidas em casa de vegetação, em vasos de 4,5L com areia, e irrigadas semanalmente com água deionizada e solução nutritiva modificada de Clark (1975), com a seguinte composição (em μM): 800 K_2SO_4 , 250 MgSO_4 , 200 KH_2PO_4 , 500 CaCl_2 , 4000 NH_4NO_3 , 100 NaFeEDTA , 5 H_3BO_3 , 3 MnSO_4 , 2,5 ZnSO_4 , 0,1 CuSO_4 , 0,7 NaMoO_4 . Foram estabelecidos dois regimes nutricionais diferenciados para indução de deficiência de N, de 20 plantas por genótipo. No tratamento com N, não houve supressão de fontes de N; no tratamento “sem N”, as plantas foram mantidas por 40 dias com solução nutritiva sem fontes de N, antes da inoculação da ferrugem. A inoculação de *H. vastatrix* raça II foi realizada no Centro de Café “Alcides Carvalho”, no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), seguindo o descrito em Barsalobres-Cavallari, et al. (2009), com suspensão de 1 mg/ml. Após a inoculação, folhas em mesmo estágio de desenvolvimento foram coletadas 0, 12, 24 e 48 h após a inoculação e imersas imediatamente em N líquido e armazenadas em freezer -80°C até o momento de extração de RNA. Folhas inoculadas com água e folhas sem inoculação foram utilizadas como controle. Plantas inoculadas foram mantidas até o aparecimento dos sintomas para confirmação da inoculação. Todo o experimento foi realizado com triplicatas biológicas, onde cada repetição biológica representa um *pool* de folhas no mesmo estágio de no mínimo três plantas.

O RNA total de folhas foi extraído pelo protocolo adaptado de Chang et al. (1993). A concentração e a pureza do RNA foram determinadas por espectrofotometria, utilizando NanoDrop® ND-100 a 260 e 280 nm, e a integridade foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 2%. Foram utilizadas as amostras que apresentaram razão 260/280 nm acima de 1,8. A ausência de contaminação com DNA genômico foi confirmada por PCR utilizando o par de *primers CaGAPDH*, descrito em Barsalobres-Cavallari et al. (2009) e Carvalho et al. (2013). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 5 μg de RNA total, utilizando-se a SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) e oligo-dT, seguindo as instruções do fabricante, num volume final de 20 μl . Os produtos finais de cDNA foram diluídas 10 vezes e a eficiência de reação de cada par de primer, avaliada através do software LinReg (Ramakers et al., 2003) foi de 99% para *CaGAPDH* e 98% para *CaNR*. O nível transcricional do gene *CaNR* foi avaliado através de qPCR, no qual cada reação continha 12,5 μL 2x SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas), 0,5 μl de cada primer (10 μM), 1 μL de cDNA diluído 1:10 em água milli-Q, com um volume final de 25 μl . Os parâmetros de termociclagem foram de 10 min a 95°C , seguido por 40 ciclos de amplificação de 95°C por 30 segundos e 60°C por 60 segundos. A especificidade de amplificação foi confirmada através de curva de dissociação. Foram efetuadas três repetições técnicas para cada repetição biológica. A expressão relativa do gene *CaNR* foi avaliada através do software GenEx (MultiD Analyses AB, Göteborg, Sweden) e o gene *CaGAPDH* foi utilizado para normalização dos dados, conforme recomendado por Barsalobres-Cavallari et al. (2009) e Carvalho et al. (2013). Em todos os casos atribuiu-se o valor 1 para a menor expressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises de qPCR permitiram verificar a influência do nitrogênio no perfil transcricional do gene *CaNR* considerando-se os genótipos suscetível e resistente e três tipos de inoculação (Figura 1). Quando as plantas foram submetidas a condições normais de suprimento de N, em todos os casos, o maior nível transcricional observado foi com 12h pós-inoculação (Figura 1A). O genótipo resistente (IAPAR 59) apresentou maior expressão de transcritos em comparação com o genótipo suscetível (Catuaí Vermelho IAC 99) (Figura 1A) o que pode estar relacionado com uma capacidade diferencial de assimilação de N do primeiro, em condições de nutrição completa, fator que pode influir na resistência à ferrugem. Além disso, observou-se que a inoculação simulada (com água) influenciou a expressão de *CaNR* através de redução de transcritos quando comparado com plantas não inoculadas no mesmo período de 12h de tratamento (Figura 1A). Além disso, a inoculação de ferrugem induziu respostas distintas nos dois genótipos, Catuaí Vermelho IAC 99 teve sua expressão reduzida em comparação com o não inoculado, enquanto que o genótipo IAPAR 59 elevou consideravelmente seus níveis de RNAm (Figura 1A). Como demonstrado na Tabela 1, ainda considerando-

se plantas inoculadas com ferrugem, verificou-se através dos valores de Ct um maior nível de expressão gênica de *CaNR* em condições de nutrição completa. Considerando-se a ausência de fontes de N, para Catuaí Vermelho, as respostas transcricionais quando as plantas foram inoculadas com água foram próximas à quantidade de transcritos quando inoculadas com a ferrugem nas primeiras 12h pós-inoculação, contudo, após 24h, os transcritos foram reduzidos em presença do patógeno (Figura 1B). Ainda em ausência de fontes de N, IAPAR 59, apresentou perfil semelhante nos períodos de 12 e 24h com redução após 48h independente de inoculação com água, ferrugem e não inoculado (Figura 1B). Ressalta-se que em presença do patógeno e condição nutricional deficiente, em um estágio inicial de infecção (12h), os transcritos de *CaNR* foram maiores para o genótipo suscetível, porém com 24h este quadro se inverteu (Figura 1B). Além disso, nesta mesma condição, a partir de 12 horas o genótipo IAPAR 59 manteve a expressão praticamente constante enquanto que a modulação no genótipo suscetível foi reduzida drasticamente após 24h (Figura 1B).

Tabela 1. Média de valores de Ct do gene *CaNR* para o tratamento inoculado com ferrugem do cafeeiro.

Regimes de N/Cultivar	IAPAR 59	Catuaí Vermelho
COM N	27.82	28.14
SEM N	28.40	29.31

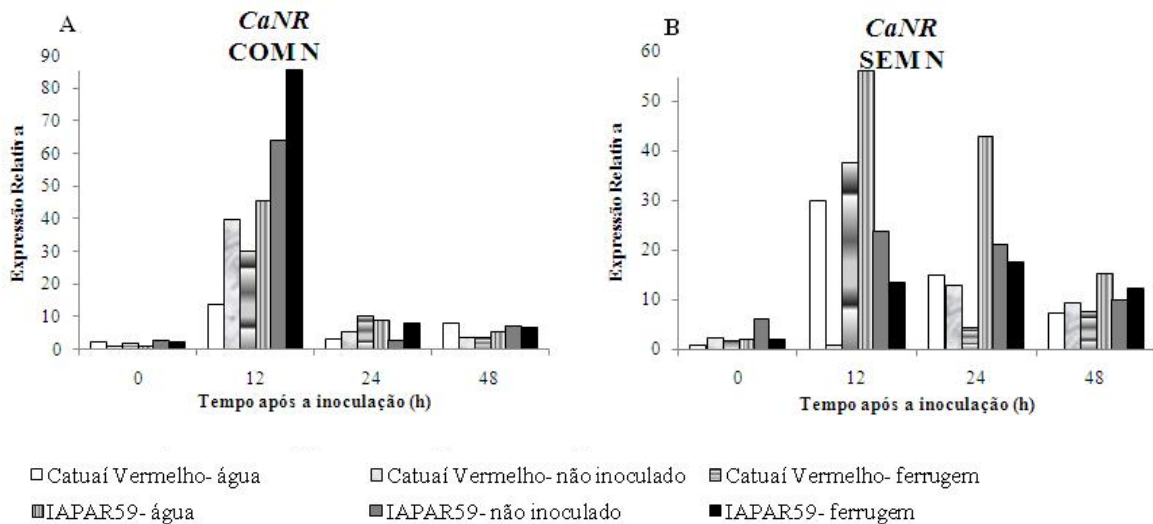


Figura 1. Perfil transcricional do gene *nitrito redutase* (*CaNR*) em dois genótipos, um suscetível à ferrugem (Catuaí Vermelho IAC 99) e um resistente (IAPAR 59) em condições de nutrição completa (A) e deficiência de N (B) com inoculação de ferrugem, água e não inoculado. O valor 1 foi atribuído à menor expressão.

Alguns trabalhos relatam que a maior atividade de *NR* em café ocorre durante as horas de luz e decresce no escuro (Lewis et al., 1982; Hipkin et al., 1984). Entretanto em plantas jovens de café as maiores atividades de *NR* foliar ocorre no período do escuro, diminuindo sua ação na presença de luz (Cordeiro et al., 1984; Alves et al., 1985).

CONCLUSÕES

Os dados de qPCR evidenciaram que o gene *CaNR* sofreu regulação transcricional distinta nas diferentes condições e entre genótipos, sugerindo que a assimilação de N é influenciada tanto pelo genótipo como pelo regime nutricional. Estudos transcricionais e bioquímicos de outras etapas da assimilação de N deverão ser realizados para compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na assimilação de N e sua regulação durante estresses bióticos.

Apoio financeiro: Fundação Araucária, Consórcio Pesquisa Café e CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, J.D.; CORDEIRO, A.T.; RENA, A.B. Relações entre fotossíntese, resistência difusiva e variação circadiana da redutase do nitrito em *Coffea arabica* L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 12., Caxambu, 1985. **Resumos**. Rio de Janeiro: MIC/IBC, p.142-145, 1985.

- BARSALOBRES-CAVALLARI, C.F.; SEVERINO, F.E.; MALUF, M.P.; MAIA, I.J. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. **BMC Molecular Biology**, v. 10, p. 1-11, 2009.
- CARVALHO, V.L.; CHALFOUN, S.M.; CASTRO, H.A.; CARVALHO V.D. Influência de diferentes níveis de produção sobre a evolução da ferrugem-do-cafeeiro e sobre teores foliares de compostos fenólicos. **Ciência e Agrotecnol.** v. 25, p. 49-54, 2001.
- CARVALHO, K.; BESPALHOK FILHO, J.C.; DOS SANTOS, T.B.; DE SOUZA, S.G.H.; VIEIRA, L.G.E.; PEREIRA, L.F.P.; DOMINGUES, D.S. Nitrogen Starvation, Salt and Heat Stress in Coffee (*Coffea arabica* L.): Identification and Validation of New Genes for qPCR Normalization. **Molecular Biotechnology**, v. 53, Issue 3, pp 315-325, 2013.
- CORDEIRO, A.T.; RENA, A.B.; MENDES, L.F. Atividade da redutase do nitrato em plantas jovens e adultas de *Coffea arabica* L., à luz e na obscuridade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PSQUISAS CAFEIEIRA, 11., Curitiba, 1984. **Resumos**. Rio de Janeiro: MIC/IBC, p.77-79, 1984.
- CHANG, S.; PURYERAR, J.; CAIRNEY, J. A single and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology**, v.11, p.113-116, 1993.
- CLARK, R.B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 23, p. 458-460, 1975.
- FERNANDEZ, D.; SANTOS, P.; AGOSTINIC et al. *Coffee* (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Molecular Plant Pathology**, v. 5, p. 527-36, 2004.
- FERNANDEZ, D.; TISSERANT, E.; TALHINHAS, P.; AZINHEIRA, H.; VIEIRA, A.; PETITOT, A.-S.; LOUREIRO, A.; POULAIN, J.; DA SILVA, C.; SILVA, M. D. C.; DUPLESSIS, S. 454-pyrosequencing of *Coffea arabica* leaves infected by the rust fungus *Hemileia vastatrix* reveals in planta-expressed pathogen-secreted proteins and plant functions in a late compatible plant-rust interaction. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, p. 17-37, 2012.
- FORDE, B.G. E WALCH-LIU P. Nitrate and glutamate as environmental cues for behavioural responses in plant roots. **Plant Cell and Environment**, 32:682-693, 2009.
- GANESH, D.; PETITOT, A.S.; SILVA, M.C.; ALARY, R.; LECOULS, A.C.; FERNANDEZ, D. Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. **Plant Science**, v. 170, p. 1045-51, 2006.
- HIPKIN, C.R.; AL CHARBI, A.; ROBERTSON, K.P. Studies on nitrate reductase in British angiosperm. II- variation in nitrate reductase activity in natural populations. **New Phytologist**, v.97, p. 641-651, 1984.
- HOFFLAND, E.; JEGER, M.J.; VAN BEUSICHEM, M.L. **Plant and Soil**, v. 218, p. 239-247, 2000.
- HORST, R.J. et al. *Ustilago maydis* infection strongly alters organic nitrogen allocation in maize and stimulates productivity of systemic source leaves. **Plant Physiol.** v. 152. p. 293-308, 2010.
- KRAISER, T.; GRAS, D.E.; GUTIÉRREZ, A.G.; GONZÁLEZ, B.; GUTIÉRREZ, R.A. A holistic view of nitrogen acquisition in plants. **Journal of Experimental Botany**, 62, 1455-1466. 2011.
- LEWIS, O.A.M.; WATSON, E.F.; HEWITT, E.J. Determination of nitrate reductase activity in barley leaves and roots. **Annals of Botany**, v.49, p.31-37, 1982. 1982.
- PAGEAU, K.; REISDORF-CREN, M.; MOROT-GAUDRY, J.F.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. The two senescence-related markers *gs1* (cytosolic glutamine synthetase) and *gdh* (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilisation are differentially regulated during pathogen attack, by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 547-557, 2006.
- PETITOT, A.-S., LECOULS, A.-C., FERNANDEZ, D. Sub-genomic origin and regulation patterns of a duplicated WRKY gene in the allotetraploid species *Coffea arabica*. **Tree Genetics; Genomes**, v. 4, p. 379-90, 2008.
- RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 1, p. 62-66, 2003.
- RAMIRO, D.; ESCOUTE, J.; PETITOT, A. S.; NICOLE, M.; MALUF, M.; FERNANDEZ, D. Biphasic haustorial differentiation of the orange rust *Hemileia vastatrix* race II associated with differential defense responses in resistant coffee cultivar. **Plant Pathology**, v. 58, p. 944-955, 2009.
- REIS, A.R.; FAVARIN, J.L.; GALLO, L.A.; MALAVOLTA, E.; MORAES, M.F.; LAVRES JR., J. Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in Coffee leaves during fruit development. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 315-324, 2009.
- TAVERNIER, V.; CADIOU, S.; PAGEAU, K.; LAUGE, R.; REISDORF-CREN, M.; LANGIN, T.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. The plant nitrogen mobilization promoted by *Colletotrichum lindemuthianum* in Phaseolus leaves depends on fungus pathogenicity. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 3351-3360, 2007.
- ZAMBOLIM, L.; ACUÑA, R.S.; VALE, F.X.R.; CHAVES, G.M. Influência da produção do cafeeiro sobre o desenvolvimento da ferrugem (*Hemileia vastatrix*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, p. 32-35, 1992.