



RENAN TERASSI PINTO

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE GENES DA
FAMÍLIA *MULTIDRUG AND TOXIC COMPOUND*
EXTRUSION (MATE) POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS
NA ADAPTAÇÃO DE *Coffea arabica* A SOLOS ÁCIDOS**

**LAVRAS -MG
2016**

RENAN TERASSI PINTO

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE GENES DA FAMÍLIA *MULTDRUG AND TOXIC COMPOUND EXTRUSION (MATE)* ENVOLVIDOS NA ADAPTAÇÃO DE *Coffea arabica* À SOLOS ÁCIDOS

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

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
Orientador
Dr. Alan Carvalho Andrade
Co-orientador

**LAVRAS-MG
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pinto, Renan Terassi.

Caracterização funcional de genes da família *Multidrug and toxic compound extrusion (MATE)* potencialmente envolvidos na adaptação de *Coffea arabica* a solos ácidos / Renan Terassi Pinto. - 2016.

102 p.

Orientador(a): Luciano Vilela Paiva.

Coorientador(a): Alan Carvalho Andrade

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2016.

Bibliografia.

1. Coffea arabica. 2. Solos ácidos. 3. Expressão gênica. I. Paiva, Luciano Vilela. II. Andrade, Alan Carvalho. III. Título.

RENAN TERASSI PINTO

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE GENES DA FAMÍLIA *MULTDRUG AND TOXIC COMPOUND EXTRUSION (MATE)* ENVOLVIDOS NA ADAPTAÇÃO DE *Coffea arabica* À SOLOS ÁCIDOS

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

APROVADO em 06 de setembro de 2016.
Dr. Alan Carvalho Andrade – EMBRAPA
Dr. Jurandir Vieira de Magalhães- EMBRAPA

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
Orientador
Dr. Alan Carvalho Andrade
Co-orientador

**LAVRAS-MG
2016**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Lavras, em particular, ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal pela possibilidade de cursar o mestrado.

Agradeço aos órgãos de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo investimento, em termos estruturais e pessoais, na pesquisa brasileira. Em particular, agradeço à CAPES pelo investimento por meio da concessão da bolsa.

Agradeço aos meus pais, Edilson Aparecido Pinto e Eliana Terassi Pinto por serem os maiores incentivadores para que eu siga meus sonhos e os melhores exemplos para que eu saiba qual caminho devo seguir.

Agradeço à minha namorada, Glícia, que me apoiou muito em mais esta etapa da minha vida. Eu espero poder compartilhar com ela todos os outros momentos que ainda virão e que serão melhores por eu estar ao seu lado.

Agradeço à minha família de modo geral. É muito grande, mas cada um é fundamental para formar a base que me sustenta.

Agradeço, em particular pela participação ativa no trabalho, ao Thiago, Ricardo, Natália e Fabrício.

Agradeço, também pelas contribuições ao trabalho entre um cafezinho e outro, ao Wesley, Farley, Douglas, Carlos, Adolfo e Lucas. Gostaria de enfatizar os agradecimentos ao Thiago, Farley e Wesley, pelo companheirismo diário.

Agradeço ao Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva, primeiramente pela oportunidade e pela orientação, mas também pelo crescimento pessoal advindo do incentivo ao pensamento crítico e científico.

Agradeço ao Dr. Alan Carvalho Andrade, pela contribuição fundamental ao trabalho e também pelo estímulo à reflexão sobre o objeto de estudo.

Agradeço aos amigos do LCBM, pela ajuda e amizade durante este período e que eu espero que perdure.

Agradeço, também, aos membros do Laboratório de Análise Avançadas (LAA) pela contribuição, em especial à Sinara por toda a ajuda.

Por fim, de maneira geral, sou grato à todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

*Se hoje enxergamos mais longe, é porque estamos
olhando sobre ombros de gigantes* (Isaac Newton)

RESUMO

A partir da expansão da fronteira agrícola, o cultivo de espécies do gênero *Coffea* expandiu-se para áreas marginalizadas em termos de fertilidade de solos, como o Cerrado brasileiro. Os primeiros trabalhos relacionados ao levantamento das características deste ambiente evidenciaram, dentre outros aspectos, os problemas relacionados à toxidez do alumínio e a baixa disponibilidade de fosfatos. Apesar das técnicas aplicadas para a correção destes problemas serem amplamente difundidas, estas não são facilmente aplicadas em cultivos perenes e, além disso, baseiam-se na alteração do ambiente para o cultivo do vegetal, o que pode culminar em impacto ambiental. Dessa forma, o estudo dos mecanismos moleculares relacionados à adaptação pode impulsionar o desenvolvimento de programas de melhoramento genético, convencional e baseado em biotecnologia, que culminem na manutenção da produtividade do setor cafeeiro de forma sustentável. Neste contexto, a partir deste trabalho, objetivou-se elucidar os membros da família gênica *Multi drug and toxic compound extrusion (MATE)* em *Coffea canephora* afim de identificar, dentre os diversos membros desta família multifuncional, genes relacionados à tolerância ao alumínio e analisar a influência destes genes sobre os mecanismos de tolerância à este estresse em *Coffea arabica*. O estudo *in silico* da família MATE possibilitou a identificação de 60 proteínas presentes em *C. canephora*. Destacaram-se as proteínas CcMATE7 e CcMATE43 provavelmente relacionadas ao transporte de alcalóides em *C. canephora*, também alguns potenciais transportadores de flavonóides, CcMATE18 e CcMATE20 e a proteína CcMATE42, potencialmente associada ao efluxo do ânion citrato, que pode minimizar os efeitos tóxicos do alumínio solúvel e auxiliar a absorção de fosfatos. A partir deste candidato em potencial, foram identificados dois genes homeólogos em *C. arabica*, um relacionado ao subgenoma derivado do ancestral *C. canephora* (*CaMATE_C*) e outro do ancestral *C. eugenioides* (*CaMATE_E*). A partir de um experimento em hidroponia, foi demonstrado por *RT-qPCR* que estes homeólogos apresentam perfis distintos de expressão gênica sob estresse causado por exposição ao alumínio. O gene *CaMATE_E* foi considerado mais responsivo à este estímulo e com perfil de expressão condizente com a exsudação de citrato, mesmo não havendo elementos cis-regulatórios especificamente relacionados à tolerância à alumínio que expliquem esta diferença. Em conclusão, este trabalho pode fornecer informações relevantes para os estudos relacionados aos mecanismos de adaptação de espécies do gênero *Coffea* à solos ácidos, sendo estes pertinentes para o cultivo produtivo e sustentável do cafeeiro neste ambiente.

Palavras-chave: homeólogo; citrato; *Coffea canephora*; *Coffea eugenioides*

ABSTRACT

Since the agricultural boundaries expansion, the cultivation of *Coffea* genus species expanded to poor soil fertility areas, like the Brazilian Cerrado. The precursors works on survey of this environmental characteristics revealed, beside other factors, the aluminium toxicity and low phosphate bioavailability problems. Although the techniques to overcome this issue were quickly widespread, they are not simple to apply on perennial crops and are based on environmental modifications to sustain the cultivation. On this way, the elucidation of molecular mechanisms related to crop adaptation can stimulate coffee breeding programs development, both on conventional and biotechnological ways, that could maintain the productivity in a sustainable mode. So, the aim with this work was to elucidate the *Multi drug and toxic compound (MATE)* gene family on *Coffea canephora* to identify, among other members of this multifunctional family, related genes to aluminium tolerance and to analyze its influence over *Coffea arabica* tolerance mechanisms. 60 *MATE* members were identified on *C. canephora*, divided in many groups and possibly related to specific functions. Some proteins were highlighted, CcMATE7 and CcMATE43, related to alkaloid transport, some flavonoids transporters, CcMATE18 and CcMATE20 and CcMATE 42, potentially associated to citrate efflux that can minimize acid soils constraints. Through this, homeologs genes on *Coffea Arabica* were identified, related to subgenomes derived by *C. canephora* (*CaMATE_C*) ancestor and other by *Coffea eugenioides* (*CaMATE_E*). With an experiment conducted on hydroponic culture, it was demonstrated through RT-qPCR that this homeologs have distinct gene expression profiles under aluminium stress and *CaMATE_E* was consider more responsive to this condition, with the citrate release consistent to expression profile, even any differences on cis-regulatory elements specifically related to aluminium tolerance were found. By conclusion, this work can sustain relevant information to *Coffea* adaptative mechanism to acid soils, important for the sustainable and productive coffee cultivation.

Keywords: homeologous; citrate; *Coffea canephora*; *Coffea eugenioides*

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	11
1	INTRODUÇÃO	12
2	CAFEIEIRO	14
3	TOXICIDADE DE ALUMÍNIO E DISPONIBILIDADE DE FÓSFORO EM SOLOS ÁCIDOS	19
4	GENES MATE E A TOLERÂNCIA À SOLOS ÁCIDOS	22
5	CONSIDERAÇÕES GERAIS	28
	REFERÊNCIAS	29
	CAPÍTULO 2	41
1	INTRODUÇÃO	44
2	MATERIAIS E MÉTODOS	47
2.1	Obtenção das sequências proteicas de genes da família MATE em <i>C. canephora</i> e correção da predição gênica dos candidatos	47
2.2	Análises estruturais <i>in silico</i>	47
2.3	Estabelecimento das relações filogenéticas e agrupamento das sequências proteicas	48
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	63
	CAPÍTULO 3	71
1	INTRODUÇÃO	74
2	MATERIAIS E MÉTODOS	76
2.1	Montagem do experimento em hidroponia	76
2.2	Análise nutricional por tecido foliar e anatomia	78
2.3	Quantificação de citrato exsudado	78
2.4	Extração de RNA, análise da integridade e	

	tratamento com DNase	79
2.5	PCR Housekeeping e RT-PCR	80
2.6	Desenho dos primers, análise da eficiência e análise da estabilidade dos primers para os genes de referência.....	80
2.7	Análise da expressão gênica por qPCR	81
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
4	CONCLUSÃO	95
	REFERÊNCIAS	96

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO

Com excessão das regiões congeladas do planeta, aproximadamente 30% da porção continental é constituída por solos ácidos (pH inferior à 5,5) e a porção da América Latina corresponde à cerca de 7% deste montante (VON UEXKULL; MUTERT, 1995). No Brasil, este tipo de solo compreende cerca de 207 Mha do território (27% da área continental) (Thomas *et al.*, 1999).

Dentre às adversidades para as práticas agrícolas em solos deste tipo, pode-se destacar a reduzida disponibilidade de fósforo (SHEN *et al.*, 2011) e os efeitos tóxicos do alumínio solúvel (ZHOU *et al.*, 2014). Estes percalços dificultam o aumento da produtividade agrária brasileira para diversas *commodities*, dentre elas, o café, que exprime relevância social e econômica para o Brasil a partir, principalmente, da geração de empregos e comercialização dos grãos e seus derivados nos mercados interno e externo.

A estimativa da produção para a safra de 2016 é de, aproximadamente, 51 milhões de sacas de café beneficiado e, em 2015, o montante da receita bruta foi acima de R\$17 bi (CONAB, 2016). O país já é responsável por suprir a demanda de quase 40% do consumo mundial de café (CeCafé, 2016) e a porção marjoritária do cultivo do cafeeiro é conduzida em solos ácidos (DIAS *et al.*, 2015).

Neste sentido, o melhoramento genético das cultivares de cafeeiro em relação à adaptação à este ambiente é indispensável para o aumento dos níveis de produtividade desta cultura.

Alguns estudos já foram realizados à cerca de mecanismos pelos quais a espécie *Coffea arabica* responde ao estresse causado pela toxicidade por alumínio (BAZZO *et al.*, 2013; RAMIREZ-BENITEZ; CHEE-GONZALEZ; HERNANDEZ-SOTOMAYOR, 2008), bem como triagens entre diferentes cultivares em relação à tolerância a solos ácidos (DE MACEDO *et al.*, 2011);

SILVA *et al.*, 2002). Apesar da relevância e contribuição destes trabalhos, há demanda para geração de conhecimento à respeito de genes associados à resposta do cafeeiro à toxicidade por alumínio, para que estes auxiliem em programas de melhoramento como marcadores moleculares ou alvos para estratégias de transformação genética.

Vale ressaltar que proteínas de membrana com funções de transporte são fundamentais e destacam-se como pontos-chave nos processos de interação planta-ambiente, no modo como estas absorvem e utilizam nutrientes e água (SCHROEDER *et al.*, 2013). Com o intuito de intensificar a adaptabilidade do cafeeiro aos estresses advindos do cultivo em solos ácidos, é pertinente o estudo da família gênica *Multi drug and toxic compound extrusion (MATE)*, caracterizada por proteínas de membrana relacionadas à diversos processos metabólicos nos organismos, inclusive à tolerância ao alumínio em vegetais (TAKANASHI, K.; SHITAN; YAZAKI, 2014).

Este mecanismo de tolerância acontece por meio do efluxo do íon citrato para a rizosfera mediado por estas proteínas, o que acarreta na quelatização do alumínio solúvel em solos com pH ácido e consequente diminuição da permeabilidade da célula a este metal, evitando os efeitos nocivos à planta (KOCHIAN *et al.*, 2015).

Além de influenciar na tolerância ao alumínio, pode-se enfatizar que alguns genes *MATE* podem interferir na absorção de fosfato por intermédio, também, da exsudação de citrato (KOSTIC *et al.*, 2015; WANG, Z. *et al.*, 2014), fato este que reitera o potencial desta família de transportadores de membrana para estratégias de engenharia genética visando incremento da adaptabilidade à ambientes como o cerrado brasileiro.

Alguns trabalhos já demonstraram sucesso na obtenção de cafeeiros geneticamente modificados (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009; PETITOT *et al.*, 2013; RIBAS *et al.*, 2011) e o estudo desses genes relevantes para a adaptação a

solos ácidos poderá subsidiar, dentre outros aspectos, a obtenção de plantas com modificações genéticas pontuais para o aprimoramento da tolerância.

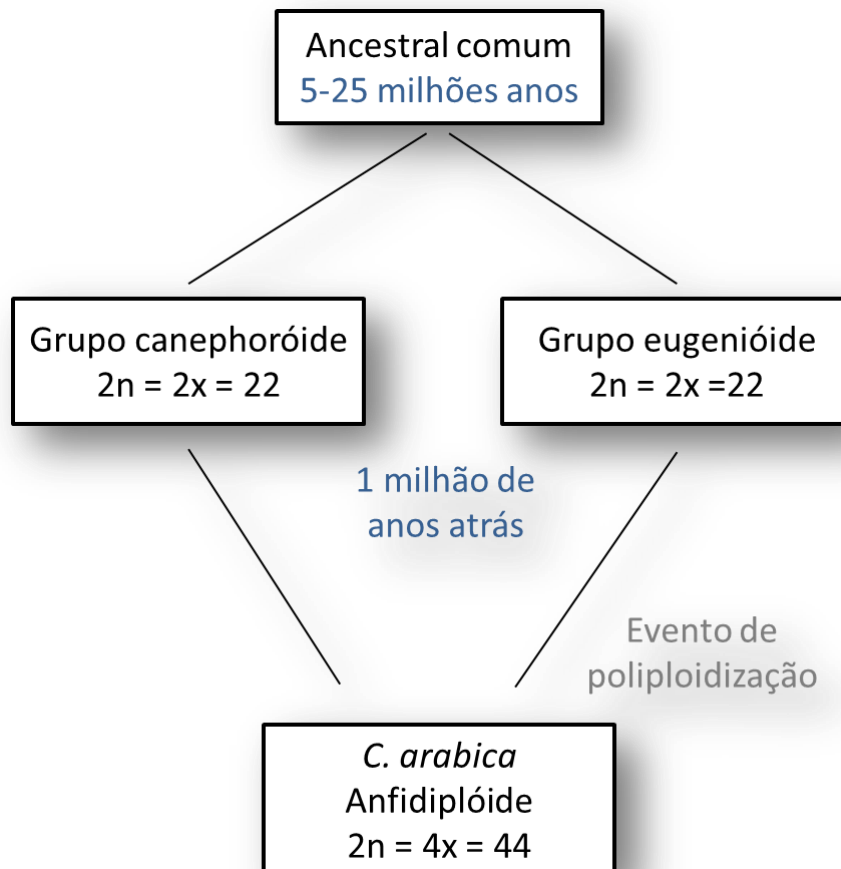
2. CAFEEIRO

O cafeeiro pertence à família *Rubiaceae*, a quarta maior família dentre as angiospermas, composta por 660 gêneros e 11.550 espécies (Robbrecht e Manen, 2006). O gênero *Coffea* compreende mais de 103 espécies, dentre as quais 72 estão consideradas em risco de extinção e, apenas *Coffea arabica*, *Coffea canephora* e *Coffea liberica* são utilizadas para produção de bebidas, com destaque para *C. arabica* (DAVIS *et al.*, 2006).

A espécie *Coffea arabica* é a única autógama e tetraplóide ($2n = 4x = 44$) do gênero *Coffea*. Caracteriza-se por ser anfidiplóide, originada a partir da hibridização natural entre as espécies *C. canephora* e *C. eugenioides*, sendo os dois subgenomas constituintes de *C. arabica* pouco divergentes em relação aos progenitores (LASHERMES *et al.*, 1999). A figura 1 esquematiza esta hibridização.

Nesta espécie, os genes de cada subgenoma (derivados dos ancestrais *C. canephora* e *C. eugenioides*) contribuem de modo diferencial para processos específicos. Em alguns casos, há expressão preferencial de genes derivados de um dos subgenomas em detrimento aos genes homeólogos do segundo subgenoma e isto ocorre de modo variado em relação à processos metabólicos, tecidos e condições ambientais (COMBES *et al.*, 2015; MONDEGO *et al.*, 2011; VIDAL *et al.*, 2010).

Figura 1: Representação do surgimento da espécie *Coffea arabica*



Fonte: Vidal *et al.*, 2010.

Em relação ao histórico da utilização destas espécies pelo homem, relatos apontam que o início do cultivo de cafeeiros deu-se no século XV (1440), por povos árabes, a partir de sementes coletadas na Etiópia, centro de origem da espécie *C. arabica*. A partir de 1690, os holandeses iniciaram o cultivo do cafeeiro na Indonésia, de onde esta prática foi propagada (NEVES, 1974).

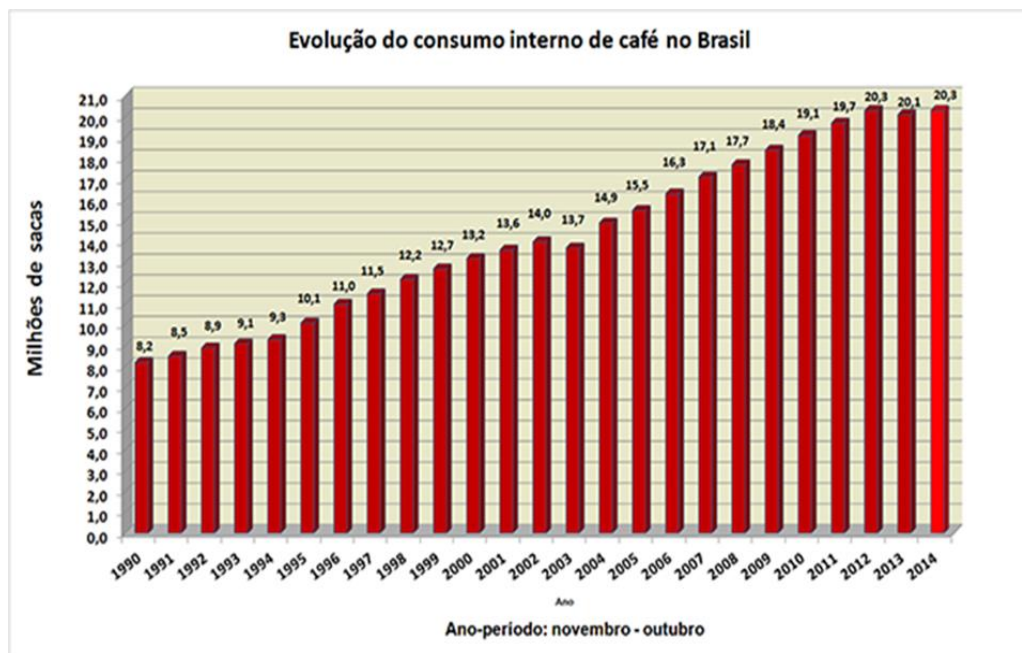
No Brasil, a cultura do café iniciou-se em 1727, no Pará e, em 1732, ocorreu a primeira exportação. A partir de 1932 deu-se início a um plano amplo de estudos a cerca da sistemática, citologia, genética, biologia da reprodução e técnicas agronômicas relacionadas ao cafeeiro no Instituto Agrônômico de Campinas (IAC) e, desde então, novas cultivares foram desenvolvidas e o cultivo tem se expandido pelo Brasil (CARVALHO *et al.*, 2007).

A produção brasileira de café rendeu, em valor bruto no período de janeiro a setembro de 2015, valores superiores a 18 bilhões de reais. A participação é distinta entre as regiões do Brasil, sendo o sudeste o detentor da maior contribuição (84,85%) seguido pelas regiões nordeste (8,38%), sul (3,11%), norte (2,55%) e centro-oeste (1,11%). Na região sudeste, o estado de Minas Gerais é o maior contribuinte para o valor bruto da produção, correspondente à cerca de 10 bilhões de reais e representa 56,14% do valor bruto total da produção brasileira (IBGE, 2015).

O café como *commodity* ocupa a 5ª posição no quadro de exportações do agronegócio brasileiro, com o valor de, aproximadamente, 4 bilhões de dólares no período de janeiro à agosto de 2015. Este valor corresponde a 6,9% das exportações do agronegócio e, do total de café exportado, cerca de 89,87% ocorre em forma de café verde (MAPA/SPA/DCRR, 2015).

Como pode ser constatado a partir da análise do gráfico na figura 2, o consumo interno de café no Brasil apresenta um comportamento crescente estável, à uma taxa de aumento de, aproximadamente, 2,5% em 24 anos, com a produção de 20,3 milhões de sacas em 2014 (ABIC, 2014).

Figura 2: Consumo anual de café no Brasil de 1990 à 2014 (ABIC, 2014).



Fonte: ABIC, 2014.

A bebida elaborada a partir dos grãos do cafeeiro moídos e torrados, o café, é considerada um alimento funcional devido às substâncias com potencial bioativo. Além disso, outros produtos baseados no cafeeiro são consumidos com este intuito, como os frutos verdes, óleos, extratos, casca, mucilagem, pergaminho e epiderme (pele prateada) (ESQUIVEL; JIMENEZ, 2012).

Dentre os efeitos benéficos do consumo de café, pode-se destacar alguns estudos recentes, os quais atestam que mulheres que consomem 3 xícaras de café diariamente diminuem em 54% as chances de desenvolverem carcinoma hepatocelular (PETRICK *et al.*, 2015) e que o aumento do consumo de café está associado à diminuição do risco de desenvolvimento de melanomas cutâneos malignos (GUERTIN *et al.*, 2015).

A produção de café no Brasil concentra-se em áreas de solos ácidos com altos níveis de matéria orgânica e, portanto, é afetada pela toxicidade devido à presença de íons de alumínio solúveis (BOJORQUEZ-QUINTAL *et al.*, 2014). Alguns estudos têm sido executados a respeito dos aspectos fisiológicos, bioquímicos e genéticos associados à influência do alumínio em plântulas e suspensões celulares de cafeeiro (BAZZO *et al.*, 2013; RAMIREZ-BENITEZ *et al.*, 2008).

Estes estudos apontam para estratégias diferenciais entre os diferentes cultivares desta espécie, como mecanismos de tolerância interna através de compartimentalização dos íon Al^{3+} e de exclusão, via exsudação de compostos orgânicos (BAZZO *et al.*, 2013).

Além da presença de alumínio, estas áreas onde expandiu-se o cultivo do cafeeiro são marginalizadas em termos de fertilidade e, o fósforo, destaca-se como um dos nutrientes limitantes na produção, pois encontra-se em baixa concentração nos solos brasileiros (DIAS *et al.*, 2015).

Nos últimos 20 anos, a biotecnologia têm propiciado avanços que podem ser aplicados ao cultivo do cafeeiro e auxiliar o desenvolvimento de cultivares tolerantes às condições ambientais desfavoráveis para a produtividade.

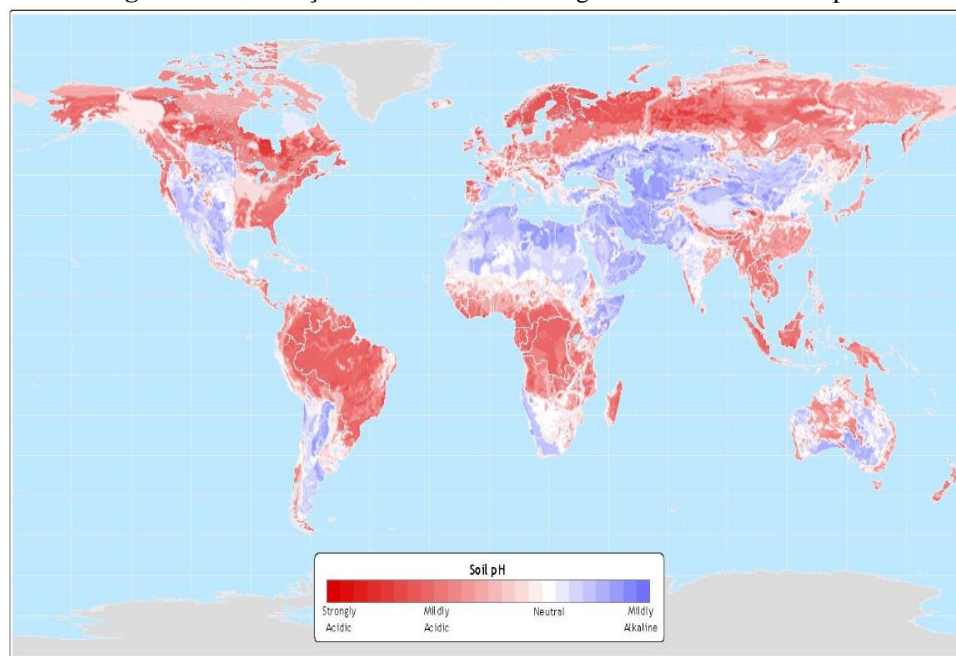
Entre estes avanços, pode-se citar isolamento e caracterização de promotores em potencial para transformação genética (MARRACCINI *et al.*, 2003; ROGERS *et al.*, 1999), sequenciamento de sequências expressas da espécie *C. canephora* (ESTEVESVIEIRA *et al.*, 2006), sequenciamento do genoma completo de *C. canephora* (DENOEUDE *et al.*, 2014) e desenvolvimento de plantas transgênicas em escala laboratorial (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009; BARBOSA *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2006; RIBAS *et al.*, 2011; RIBAS *et al.*, 2005). Este conhecimento gerado dá suporte para o desenvolvimento de estratégias de melhoramento do cafeeiro para diversos viés, inclusive para a adaptação aos solos ácidos de maneira produtiva.

3. TOXICIDADE DE ALUMÍNIO E DISPONIBILIDADE DE FÓSFORO EM SOLOS ÁCIDOS.

Solos com pH inferior à 5,5 são considerados solos ácidos e, basicamente, os fatores que influenciam negativamente o desenvolvimento vegetal incluem altas concentrações de alumínio em forma iônica, manganês e ferro, além da baixa disponibilidade de alguns elementos, como o fósforo, que é o nutriente limitante para produtividade neste tipo de solo (KOCHIAN; HOEKENGA; PINEROS, 2004).

Como pode ser analisado na figura 3, os solos com pH ácido encontram-se majoritariamente nos trópicos e na região norte temperada e compreendem parte considerável da porção de solos aráveis do planeta (IGBF-DIS, 1998).

Figura 3: Distribuição dos solos em âmbito global de acordo com o pH.



Fonte: IGBF-DIS, 1998.

Muitos destes solos são naturalmente pobres em teores de fósforo ou então caracterizam-se pelo alto índice de fixação de fosfato, resultando na necessidade de aplicações de fertilizantes fosfatados para que sejam alcançados níveis satisfatórios de produtividade. Conseqüentemente, o manejo neste tipo de solo requer calagem para elevação do pH, adubação fosfatada, a implementação de práticas que reduzam os efeitos da acidez, o que dispense recursos financeiros (DELHAIZE *et al.*, 2000).

Em solos neutros ou ligeiramente ácidos ($5,5 < \text{pH} < 7$) o alumínio, metal mais abundante no solo, encontra-se complexado de forma estável com oxigênio e sílica. Porém, este metal solubiliza-se em sua forma iônica em solos acidificados, tornando-se disponível para a absorção pelos vegetais e, desta forma, inibe severamente o desenvolvimento radicular (MATSUMOTO, 2000).

As savanas da América Latina compreendem 50% da totalidade deste bioma no planeta e a savana brasileira, o cerrado, destaca-se como a maior (207 Mha enquanto que a segunda colocada em termos de tamanho, a savana da Venezuela, possui apenas 28 Mha) (THOMAS e LOPES, 1999). Em levantamento amostral, com cobertura de 33% do cerrado brasileiro, foi demonstrado que 49% das amostras possuíam $\text{pH} < 5,0$ e 50% com valores entre 5,0 e 5,9. Além disso, foi constatado que 90% das amostras possuíam níveis baixos de fósforo, cerca de 2 mg/dm^3 (LOPES e COX, 1977).

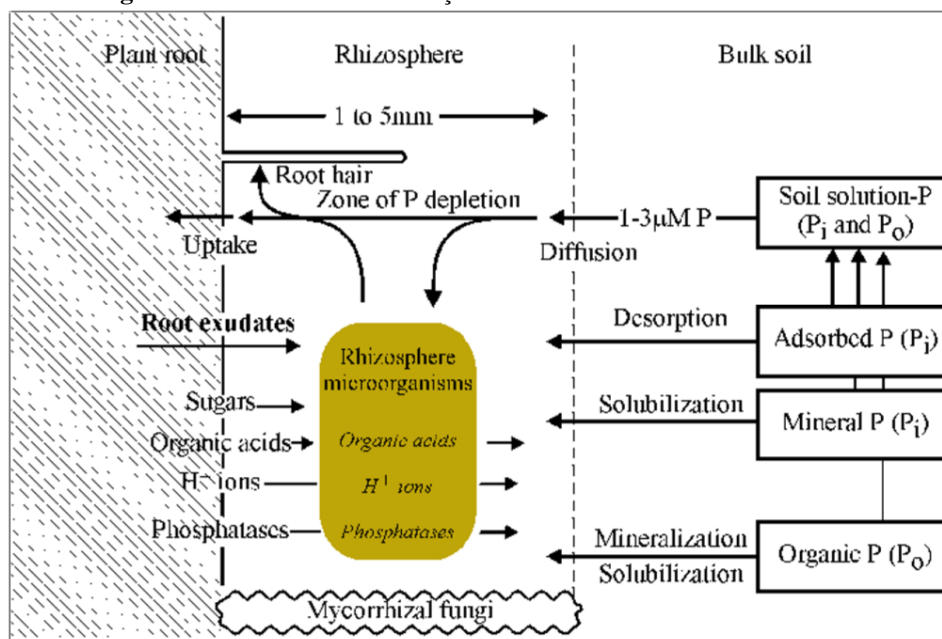
Os níveis baixos de fósforo biodisponível explicam-se pela adsorção do fosfato na superfície de óxidos e hidróxidos de alumínio e ferro, além da formação de complexos estáveis com estes metais (PINTON *et al.*, 2007).

As maneiras pelas quais os vegetais tolerantes se adaptam a este tipo de ambiente são diversas, porém, pode-se destacar a exsudação de compostos na rizosfera que exercem função, de forma direta ou indireta, na minimização dos efeitos tóxicos do alumínio e na disponibilidade de fósforo (figura 4). Dentre os exsudados, destacam-se os ácidos orgânicos (HOCKING *et al.*, 2000).

Este mecanismo de liberação de ácidos orgânicos é o mais estudado entre os processos de tolerância ao alumínio por mecanismos de exclusão (KOCHAN *et al.*, 2015) e também exerce efeito significativo na biodisponibilização de fósforo, principalmente tratando-se da exsudação de citrato (PINTON *et al.*, 2007).

Em estudos com café, já foi constatada a liberação de ácidos orgânicos, principalmente citrato e malato, em resposta às condições de pH ácido e estresse por alumínio, porém a magnitude de exsudação pode diferir entre cultivares (SILVA *et al.*, 2002), tanto quanto a estratégia para tolerar o estresse (BAZZO *et al.*, 2013) que pode basear-se em mecanismos de exsudação ou diminuição dos efeitos tóxicos em âmbito intercelular.

Figura 4: Mecanismos de interação entre a rizosfera e o fósforo.



Legenda: O esquema está focado, principalmente, na influência da exsudação de açúcares, ácidos orgânicos, íons H^+ e fosfatases na microbiota da rizosfera e disponibilização de fósforo.

Fonte: HOCKING *et al.*, 2000.

4. GENES *MATE* E A TOLERÂNCIA À SOLOS ÁCIDOS

A família gênica *MATE* (“*Multi drug and toxic compound extrusion*”) é constituída por vários representantes, tanto em organismos procariotos quanto em eucariotos. É uma família de proteínas de membrana transportadoras de íons do tipo antiporte, por gradiente eletroquímico de íons H^+ ou Na^+ (TAKANASHI, K. *et al.*, 2014).

A maioria dessas proteínas possui de 400 a 550 resíduos de aminoácidos, porém podem variar de 400 a 700 resíduos. Caracterizam-se por possuir 12 domínios transmembranares, contudo, aparentemente, não há uma sequência consenso conservada em todos os membros da família (OMOTE *et al.*, 2006).

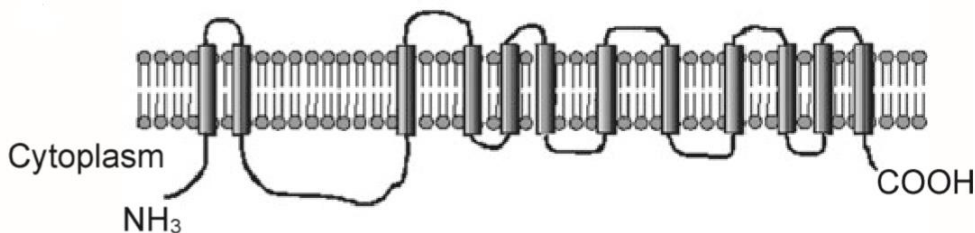
Dentre as funções em estudo destes genes, a influência do transporte de ácidos orgânicos, como citrato, na tolerância à toxicidade de alumínio em solos ácidos tem sido amplamente explorada e, os primeiros genes *MATE* caracterizados que codificam proteínas deste tipo em vegetais foram isolados em *Sorghum bicolor* (*SbMATE*) (MAGALHAES *et al.*, 2007) e em *Hordeum vulgare* (*HvAACT1*) (FURUKAWA *et al.*, 2007).

Desde então, diversos representantes desta família gênica associados ao efluxo de citrato têm sido estudados, como o *TaMATE* de *Triticum aestivum* (RYAN *et al.*, 2009), *ZmMATE* de *Zea mays* (MARON *et al.*, 2010), *EcMATE* de *Eucalyptus camaldulensis* (SAWAKI *et al.*, 2013) e *BoMATE* de *Brassica oleracea* (WU *et al.*, 2014), dentre outros. Comprovadamente, esses membros da família *MATE* exercem influência sobre a exsudação de citrato em suas espécies de origem.

Como característica singular, as proteínas relacionadas a este processo possuem, especificamente, uma região conservada entre o segundo e o terceiro

domínio transmembranar, caracterizada por um “*loop*” interno à membrana plasmática (Figura 5) (LIU *et al.*, 2009).

Figura 5: Topologia comum predita para proteínas da família MATE transportadoras de citrato

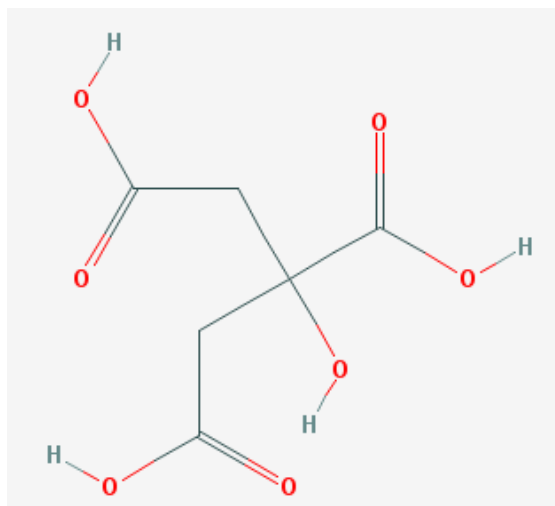


Fonte: Liu *et al.*, 2009.

Estes genes descritos relacionados à liberação de citrato são fundamentais no mecanismo de tolerância das plantas ao alumínio. O citrato interage com o alumínio em proporção 1:1, quelando-o a partir de duas maneiras possíveis: 1- a partir dos três grupamentos ácido carboxílicos, sendo dois periféricos e um central; 2- a partir do grupamento ácido carboxílico central, um dos periféricos e uma hidroxila central (MUJIKI *et al.*, 2012). A estrutura molecular do ácido cítrico pode ser visualizada na figura 6.

Dessa forma, o citrato impede a interação do alumínio na forma catiônica (Al^{3+}) com a membrana plasmática vegetal, sendo esta o principal alvo da toxidez deste metal que pode afetar a homeostase dos fosfolipídeos (POOT-POOT; HERNANDEZ-SOTOMAYOR, 2011). Além disso, o efeito tóxico do alumínio sobre a zona de transição distal nos ápices radiculares pode culminar em alterações no transporte basípeto da auxina ácido indol-3-acético (AIA), que estão associadas à diminuição das taxas de elongação radicular (ZHOU *et al.*, 2014).

Figura 6: Fórmula estrutural da molécula de ácido cítrico ($C_6H_8O_7$).



Fonte: PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

A regulação transcricional destes genes em relação ao estresse causado pelo alumínio é variável. Em suas espécies de origem, os genes *SbMATE*, *AtMATE*, *ZmMATE1*, *VuMATE1*, *OsFRDL4* e *ScFRDL2* são induzidos pelo alumínio, enquanto que *HvAACT1* e *TaMATE1* são expressos de maneira constitutiva, porém mais elevada em cultivares tolerantes (LIU, J. P.; PINEROS; KOCHIAN, 2014).

Alguns aspectos da indução à resposta ao estresse por alumínio envolvendo estes genes já são elucidados.

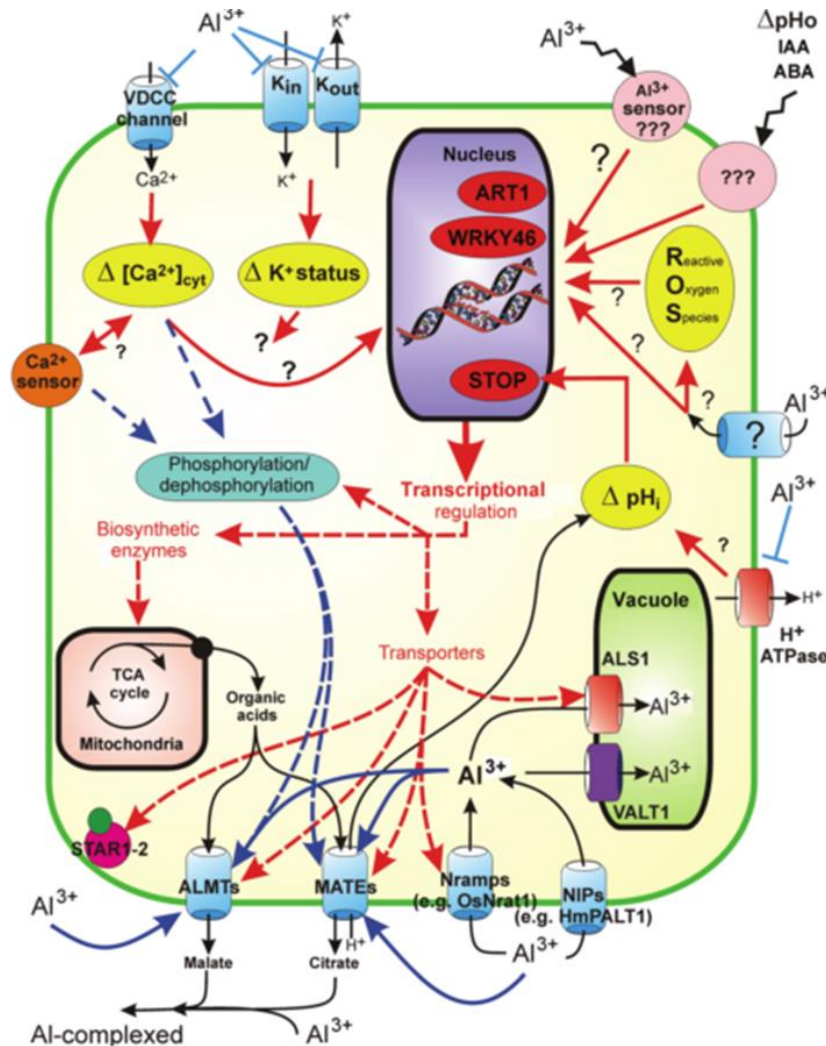
O fator de transcrição *sensitive to proton rhizotoxicity1 (STOP1)*, inicialmente associado à ativação da expressão de genes da família *aluminium activated malate efflux (ALMT)*, é um dos principais reguladores de genes *MATE* e atua como elicitador da expressão, sensível tanto à presença do íon Al^{3+} quanto à pH ácido (DELHAIZE; MA; RYAN, 2012).

Em *Sorghum bicolor*, o sítio de maior expressão do gene *SbMATE* localiza-se na zona de transição distal em ápices radiculares de variedades tolerantes ao alumínio, justamente onde ocorre a interação com o alumínio e esta ativação da expressão está relacionada temporalmente à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SIVAGURU; LIU; KOCHIAN, 2013).

Contudo, a dinâmica do mecanismo de resposta ainda não está totalmente esclarecida, restam dúvidas quanto à percepção do estresse, à ativação dos fatores de transcrição, dentre outras. Um panorama geral deste mecanismo, incluindo outros transportadores, como os ALMTs, pode ser observado na figura 7 (LIU, J. P. *et al.*, 2014).

As maneiras pelas quais ocorre a percepção do estresse em detrimento ao alumínio ainda não estão em consenso, acredita-se que pode ser por intermédio de um receptor membranar, a partir do influxo de íons Al^{3+} para o citoplasma, onde haveria uma cascata de reações ligadas aos mecanismos oxidativos ou simplesmente por variações no pH ou concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} e K^{+} . Qualquer uma dessas formas de percepção pode culminar na ativação de fatores de transcrição por meio de, por exemplo, fosforilações e estes irão influenciar a regulação transcricional de genes relacionados à tolerância à este metal, como os da família *MATE* (LIU *et al.*, 2014).

Figura 7: Panorama geral da resposta celular relacionada aos genes *MATE* contra o estresse causado por alumínio.



Legenda: A percepção celular da presença de íons Al^{3+} pode ocorrer de maneira direta por sensores membranares e por interações intracelulares com este metal ou indiretamente por meio de variações no pH, potássio e cálcio. A partir disso, proteínas de regulação, como a STOP, intermedeiam a ativação de genes que codificam proteínas relacionadas à tolerância ao estresse, como as proteínas de membrana MATE, por onde ocorre o efluxo de citrato que irá quelatar os íons Al^{3+} na rizosfera, minimizando os efeitos tóxicos às raízes.

Fonte: LIU *et al.*, 2014.

Além da regulação da expressão gênica por interferência da ação de fatores de transcrição, variações genômicas estruturais também influenciam a tolerância ao alumínio mediada pelos genes *MATE*. Em estudos com milho, foi constatado que variedades com três cópias de genes *MATE* idênticas e em tandem apresentaram tolerância superior ao alumínio, em função do aumento na expressão destes genes em detrimento do número de cópias (MARON *et al.*, 2013).

Em cevada, a inserção de um fragmento de 1 kb à 4,8 kb de distância do *start codon* ocorre apenas em variedades tolerantes ao alumínio e apresenta relação direta tanto com a expressão do gene *HvAACT1* (membro da família *MATE* em cevada) tanto com a exsudação de citrato (FUJII *et al.*, 2012).

Outro aspecto interessante dos genes *MATE* e da exsudação de citrato é a possibilidade de aumento na absorção de fósforo devido ao aumento da biodisponibilidade deste elemento, por consequência de mudanças no equilíbrio iônico do solo. Em *Fragaria x ananassa* e *Lupinus albus*, os genes *FaMATE5* e *LaMATE* são superexpressos em condições de deficiência de fósforo e afetam positivamente os níveis de absorção deste nutriente (UHDE-STONE *et al.*, 2005; VALENTINUZZI *et al.*, 2015).

Alguns efeitos positivos da aplicação destes genes em estratégias de melhoramento genético já estão descritos em literatura. Em *Sorghum bicolor*, o locus *Alt_{SB}*, referente ao gene *SbMATE*, está associado positivamente com a produtividade da espécie em solos ácidos e foi relatado um incremento de produção de grãos de 0,6 ton.ha⁻¹ neste tipo de ambiente por influência deste gene. Além disso, devido à expressão específica da proteína nos ápices radiculares e regulação transcricional restrita ao estresse por alumínio, não foi constatada penalidade na produção em ambientes sem o referido estresse (CARVALHO, G. *et al.*, 2016).

5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O cafeeiro representa importância para a economia brasileira, pelo fato do café ser um produto que encontra-se no topo do ranking do quadro de exportações do agronegócio. Além disso compõe a dieta diária mundial, sendo fonte de compostos bioativos, e um dos maiores desafios para o cultivo produtivo e sustentável desta espécie está relacionado ao plantio em solos ácidos.

Para que o cultivo neste ambiente seja eficiente são necessários, principalmente, mecanismos de minimização dos efeitos tóxicos dos íons Al^{3+} disponíveis e de aumento da biodisponibilidade de fosfato. As técnicas atuais baseiam-se na modificação deste ambiente, porém seria mais sustentável recorrer a maneiras de adaptar a planta às estas condições, a fim de diminuir os impactos ambientais e o custo para o produtor.

Dessa forma, estratégias de melhoramento genético para a adaptação do cafeeiro aos solos ácidos podem envolver genes-alvo da família *Multi drug and toxic compound extrusion (MATE)*, já que alguns membros estão relacionados ao efluxo de citrato mediante estresse por variações de pH, toxidez causada por alumínio e deficiência de fósforo. Este ânion liberado na rizosfera de modo controlado pela regulação transcricional dos respectivos genes, pode auxiliar na tolerância ao Al^{3+} e absorção de fosfato e contribuir para um avanço biotecnológico que culmine no aprimoramento do cultivo de espécies do gênero *Coffea* neste tipo de ambiente.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, E. V. S.; CUNHA, W. G.; BARBOSA, A. E. A. D.; COSTA, P. M.; TEIXEIRA, J. B.; VIANNA, G. R.; CABRAL, G. B.; FERNANDEZ, D.; GROSSI-DE-SA, M. F. Transgenic coffee fruits from *Coffea arabica* genetically modified by bombardment. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 45, n. 5, p. 532-539, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. Indicadores da indústria de café no Brasil – 2014. Desempenho da produção e consumo interno. **Realização da área de pesquisas da ABIC**, 2014. Disponível em: <http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=4178&sid=61&tpl=printerview#cons2014.2>.

BARBOSA, A. E. A. D.; ALBUQUERQUE, T. V. S.; SILVA, M. C. M.; SOUZA, D. S. L.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; VALENCIA, A.; ROCHA, T. L.; GROSSI-DE-SA, M. F. α -Amylase inhibitor-1 gene from *Phaseolus vulgaris* expressed in *Coffea arabica* plants inhibits α -amylases from the coffee berry borer pest. **BMC Biotechnology**, v. 10, 2010.

BAZZO, B. R.; EIRAS, A. D.; DELAAT, D. M.; SIQUEIRA, W. J.; MONDEGO, J. M. C.; COLOMBO, C. A. Gene Expression Analysis Suggests Temporal Differential Response to Aluminum in *Coffea arabica* Cultivars. **Tropical Plant Biology**, v. 6, n. 4, p. 191-198, Dec 2013.

BOJORQUEZ-QUINTAL, J. E. D.; SANCHEZ-CACH, L. A.; KUGONZALEZ, A.; DE LOS SANTOS-BRIONES, C.; MEDINA-LARA, M. D.; ECHEVARRIA-MACHADO, I.; MUNOZ-SANCHEZ, J. A.; SOTOMAYOR, S.; ESTEVEZ, M. M. Differential effects of aluminum on in vitro primary root growth, nutrient content and phospholipase C activity in coffee seedlings (*Coffea arabica*). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 134, p. 39-48, May 2014.

BRACCINI, M.C.L.; MARTINEZ, H.E.P.; SILVA, E.A.M.; BRACCINI, A.L.; SCAPIM, C.A. Crescimento da planta e coloração das raízes com hematoxilina como critérios de avaliação de genótipos de café quanto à tolerância à toxidez de alumínio. **Revista brasileira de ciência do solo**, v. 24, p. 59-68, 2000.

CARVALHO, A. Histórico do desenvolvimento do cultivo do café no Brasil. **Instituto agrônomo de campinas**, p.1-8, 2007.

CARVALHO, G., JR.; SCHAFFERT, R. E.; MALOSETTI, M.; MOREIRA VIANA, J. H.; MENEZES, C. B.; SILVA, L. A.; GUIMARAES, C. T.; COELHO, A. M.; KOCHIAN, L. V.; VAN EEUWIJK, F. A.; MAGALHAES, J. V. Back to Acid Soil Fields: The Citrate Transporter SbMATE Is a Major Asset for Sustainable Grain Yield for Sorghum Cultivated on Acid Soils. **G3-Genes Genomes Genetics**, v. 6, n. 2, p. 475-484, Feb 1 2016.

CHEN, E. C. H.; NAJAR, C.; ZHENG, C. F.; BRANDTS, A.; LYONS, E.; TANG, H. B.; CARRETERO-PAULET, L.; ALBERT, V. A.; SANKOFF, D. The dynamics of functional classes of plant genes in rediploidized ancient polyploids. **Bmc Bioinformatics**, v. 14, p. 10, Oct 2013.

CHEN, L.; LIU, Y.; LIU, H.; KANG, L.; GENG, J.; GAI, Y.; DING, Y.; SUN, H.; LI, Y. Identification and Expression Analysis of MATE Genes Involved in Flavonoid Transport in Blueberry Plants. **Plos One**, v. 10, n. 3, Mar 17 2015.

COMBES, M. C.; HUEBER, Y.; DEREPPER, A.; RIALLE, S.; HERRERA, J. C.; LASHERMES, P. Regulatory Divergence between Parental Alleles Determines Gene Expression Patterns in Hybrids. **Genome Biology and Evolution**, v. 7, n. 4, p. 1110-1121, Apr 2015.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira, Café. **Monitoramento agrícola**, v.2, p. 1-68, 2016.

CONSELHO DOS EXPORTADORES DE CAFÉ DO BRASIL (CeCafé). Relatório mensal, janeiro/2016, disponível em www.cecafe.com.br.

DAVIS, A. P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D. M.; STOFFELEN, P. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 152, n. 4, p. 465-512, Dec 2006.

DELHAIZE, E.; MA, J. F.; RYAN, P. R. Transcriptional regulation of aluminium tolerance genes. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 6, p. 341-348, Jun 2012.

DE MACEDO, C. M. P.; LOPES, J. C.; DO AMARAL, J. A. T.; DA FONSECA, A. F. A.; DO AMARAL, J. F. T. Tolerance of Arabica Coffee Cultivars for Aluminum in Nutritive Solution. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 5, p. 885-891, Sep-Oct 2011.

DENOEUDE, F.; CARRETERO-PAULET, L.; DEREPPER, A.; DROC, G.; GUYOT, R.; PIETRELLA, M.; ZHENG, C. F.; ALBERTI, A.; ANTHONY, F.; APREA, G.; AURY, J. M.; BENTO, P.; BERNARD, M.; BOCS, S.; CAMPA, C.; CENCI, A.; COMBES, M. C.; CROUZILLAT, D.; DA SILVA, C.; DADDIEGO, L.; DE BELLIS, F.; DUSSERT, S.; GARSMEUR, O.; GAYRAUD, T.; GUIGNON, V.; JAHN, K.; JAMILLOUX, V.; JOET, T.; LABADIE, K.; LAN, T. Y.; LECLERCQ, J.; LEPELLEY, M.; LEROY, T.; LI, L. T.; LIBRADO, P.; LOPEZ, L.; MUNOZ, A.; NOEL, B.; PALLAVICINI, A.; PERROTTA, G.; PONCET, V.; POT, D.; PRIYONO; RIGOREAU, M.; ROUARD, M.; ROZAS, J.; TRANCHANT-DUBREUIL, C.; VANBUREN, R.; ZHANG, Q.; ANDRADE, A. C.; ARGOUT, X.; BERTRAND, B.; DE KOCHKO, A.; GRAZIOSI, G.; HENRY, R. J.; JAYARAMA; MING, R.; NAGAI, C.; ROUNSLEY, S.; SANKOFF, D.; GIULIANO, G.; ALBERT, V. A.; WINCKER, P.; LASHERMES, P. The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. **Science**, v. 345, n. 6201, p. 1181-1184, Sep 2014.

DIAS, K. G. D.; NETO, A. E. F.; GUIMARAES, P. T. G.; REIS, T. H. P.; DE OLIVEIRA, C. H. C. COFFEE YIELD AND PHOSPHATE NUTRITION PROVIDED TO PLANTS BY VARIOUS PHOSPHORUS SOURCES AND LEVELS. **Ciencia E Agrotecnologia**, v. 39, n. 2, p. 110-120, Mar-Apr 2015.

DIENER, A. C.; GAXIOLA, R. A.; FINK, G. R. Arabidopsis ALF5, a multidrug efflux transporter gene family member, confers resistance to toxins. **Plant Cell**, v. 13, n. 7, p. 1625-1637, Jul 2001.

ESQUIVEL, P.; JIMENEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 488-495, May 2012.

VIEIRA, L.G.E.; ANDRADE, A. C.; COLOMBO, C. A.; HELONEIDA DE ARAUJO MORAES, A.; METHA, A.; CARVALHO DE OLIVEIRA, A.; LABATE, C. A.; MARINO, C. L.; DE BARROS MONTEIRO-VITORELLO, C.; DE CASTRO MONTE, D.; GIGLIOTI, E.; KIMURA, E. T.; ROMANO, E.; KURAMAE, E. E.; MACEDO LEMOS, E. G.; PEREIRA DE ALMEIDA, E. R.; JORGE, E. C.; ALBUQUERQUE, E. V. S.; RODRIGUES DA SILVA, F.; VINECKY, F.; SAWAZAKI, H. E.; DORRY, H. F. A.; CARRER, H.; ABREU, I. N.; BATISTA, J. A. N.; TEIXEIRA, J. B.; KITAJIMA, J. P.; XAVIER, K. G.; DE LIMA, L. M.; ARANHA DE CAMARGO, L. E.; PROTASIO PEREIRA, L. F.; COUTINHO, L. L.; FRANCO LEMOS, M. V.; ROMANO, M. R.; MACHADO, M. A.; MOTA DO CARMO COSTA, M.; GROSSI DE SA, M. F.; GOLDMAN, M. H. S.; FERRO, M. I. T.; PENHA TINOCO, M. L.; OLIVEIRA, M. C.; VAN SLUYS, M.-A.; SHIMIZU, M. M.; MALUF, M. P.; SOUZA DA EIRA, M. T.; GUERREIRO FILHO, O.; ARRUDA, P.;

MAZZAFERA, P.; SAMPAIO CORREA MARIANI, P. D.; DE OLIVEIRA, R. L. B. C.; HARAKAVA, R.; BALBAO, S. F.; TSAI, S. M.; ZINGARETTI DI MAURO, S. M.; SANTOS, S. N.; SIQUEIRA, W. J.; LACERDA COSTA, G. G.; FORMIGHIERI, E. F.; CARAZZOLLE, M. F.; GUIMARAES PEREIRA, G. A. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 95-108, Jan-Mar 2006.

FUJI, M.; YOKOSHO, K.; YAAMAJI, N.; SAISHO, D.; YAMANE, M.; TAKANASHI, H.; SATO, K.; NAKAZONO, M.; MA, J. F. Acquisition of aluminium tolerance by modification of a single gene in barley. **Nature Communications**, v. 3, p. 1-9, 2012

GIGLIOTI, E.; KIMURA, E. T.; ROMANO, E.; KURAMAE, E. E.; MACEDO LEMOS, E. G.; PEREIRA DE ALMEIDA, E. R.; JORGE, E. C.; ALBUQUERQUE, E. V. S.; RODRIGUES DA SILVA, F.; VINECKY, F.; SAWAZAKI, H. E.; DORRY, H. F. A.; CARRER, H.; ABREU, I. N.; BATISTA, J. A. N.; TEIXEIRA, J. B.; KITAJIMA, J. P.; XAVIER, K. G.; DE LIMA, L. M.; ARANHA DE CAMARGO, L. E.; PROTASIO PEREIRA, L. F.; COUTINHO, L. L.; FRANCO LEMOS, M. V.; ROMANO, M. R.; MACHADO, M. A.; MOTA DO CARMO COSTA, M.; GROSSI DE SA, M. F.; GOLDMAN, M. H. S.; FERRO, M. I. T.; PENHA TINOCO, M. L.; OLIVEIRA, M. C.; VAN SLUYS, M.-A.; SHIMIZU, M. M.; MALUF, M. P.; SOUZA DA EIRA, M. T.; GUERREIRO FILHO, O.; ARRUDA, P.; MAZZAFERA, P.; SAMPAIO CORREA MARIANI, P. D.; DE OLIVEIRA, R. L. B. C.; HARAKAVA, R.; BALBAO, S. F.; TSAI, S. M.; ZINGARETTI DI MAURO, S. M.; SANTOS, S. N.; SIQUEIRA, W. J.; LACERDA COSTA, G. G.; FORMIGHIERI, E. F.; CARAZZOLLE, M. F.; GUIMARAES PEREIRA, G. A. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 95-108, Jan-Mar 2006.

FRANK, S.; KECK, M.; SAGASSER, M.; NIEHAUS, K.; WEISSHAAR, B.; STRACKE, R. Two differentially expressed MATE factor genes from apple complement the Arabidopsis transparent testa12 mutant. **Plant Biology**, v. 13, n. 1, p. 42-50, Jan 2011.

FURUKAWA, J.; YAMAJI, N.; WANG, H.; MITANI, N.; MURATA, Y.; SATO, K.; KATSUHARA, M.; TAKEDA, K.; MA, J. F. An aluminum-activated citrate transporter in barley. **Plant and Cell Physiology**, v. 48, n. 8, p. 1081-1091, Aug 2007.

GUERTIN, K. A.; FREEDMAN, N. D.; LOFTFIELD, E.; STOLZENBERG-SOLOMON, R. Z.; GRAUBARD, B. I.; SINHA, R. A prospective study of

coffee intake and pancreatic cancer: results from the NIH-AARP Diet and Health Study. **British Journal of Cancer**, v. 113, n. 7, p. 1081-1085, Sep 2015.

HOCKING, P. J.; RANDALL, P. J.; DELHAIZE, E.; KEERTHISINGHE, G. The role of organic acids exuded from roots in phosphorous nutrition and aluminium tolerance in acidic soils. **Management and conservation of tropical acid soils for sustainable crop production, proceedings consultants meeting**, p. 61-70, 2000.

IGBF-DIS. SoilData (V.0) A program for creating global soil-property databases. **IGBP Global Soils Task**, 1998. Disponível em: https://nelson.wisc.edu/sage/data-and-models/atlas/maps/soilph/atl_soilph.jpg.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Valor bruto da produção/Café. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – LPSA**, 2015. Disponível em: http://www.consorcioesquisacafe.com.br/Valor_Bruto_da_Producao_Regional_por_UF_-_Setembro_2015.

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PINEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? - Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 459-493, 2004.

KOCHIAN, L. V.; PINEROS, M. A.; LIU, J. P.; MAGALHAES, J. V. Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, p. 571-598, 2015.

KOSTIC, L.; NIKOLIC, N.; SAMARDZIC, J.; MILISAVLJEVIC, M.; MAKSIMOVIC, V.; CAKMAK, D.; MANOJLOVIC, D.; NIKOLIC, M. Liming of anthropogenically acidified soil promotes phosphorus acquisition in the rhizosphere of wheat. **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, n. 3, p. 289-298, Apr 2015.

KUMAR, V.; SATYANARAYANA, K. V.; ITTY, S. S.; INDU, E. P.; GIRIDHAR, P.; CHANDRASHEKAR, A.; RAVISHANKAR, G. A. Stable transformation and direct regeneration in *Coffea canephora* P ex. Fr. by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation without hairy-root phenotype. **Plant Cell Reports**, v. 25, n. 3, p. 214-222, Mar 2006.

LASHERMES, P.; COMBES, M. C.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; D'HONT, A.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A. Molecular characterisation and origin of

the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular and General Genetics**, v. 261, n. 2, p. 259-266, Mar 1999.

LI, L. G.; HE, Z. Y.; PANDEY, G. K.; TSUCHIYA, T.; LUAN, S. Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 7, p. 5360-5368, Feb 2002.

LIU, J.; MAGALHAES, J.V.; SHAFF, J.; KOCHIAN, L.V. Aluminium-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer *Arabidopsis* aluminium tolerance. **The plant journal**, v.57, p. 389-399, 2009.

LIU, J.; LI, Y.; WANG, W.; GAI, J.; LI, Y. Genome-wide analysis of MATE transporters and expression patterns of a subgroup of MATE genes in response to aluminum toxicity in soybean. **Bmc Genomics**, v. 17, Mar 11 2016.

LIU, J. P.; PINEROS, M. A.; KOCHIAN, L. V. The role of aluminum sensing and signaling in plant aluminum resistance. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 56, n. 3, p. 221-230, Mar 2014.

LOPES, A.S.; COX, F.R. A survey of the fertility status of surface soils under cerrado vegetation in Brazil. **Soil Science Society of America Journal**, v.41, p.742-747, 1977.

MAGALHAES, J. V.; LIU, J.; GUIMARAES, C. T.; LANA, U. G. P.; ALVES, V. M. C.; WANG, Y. H.; SCHAFFERT, R. E.; HOEKENGA, O. A.; PINEROS, M. A.; SHAFF, J. E.; KLEIN, P. E.; CARNEIRO, N. P.; COELHO, C. M.; TRICK, H. N.; KOCHIAN, L. V. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, v. 39, n. 9, p. 1156-1161, Sep 2007.

MAGALHAES, J. V. How a microbial drug transporter became essential for crop cultivation on acid soils: aluminium tolerance conferred by the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family. **Annals of Botany**, v. 106, n. 1, p. 199-203, Jul 2010.

MARINOVA, K.; POURCEL, L.; WEDER, B.; SCHWARZ, M.; BARRON, D.; ROUTABOUL, J.-M.; DEBEAUJON, I.; KLEIN, M. The *Arabidopsis* MATE transporter TT12 acts as a vacuolar flavonoid/H⁺-antiporter active in proanthocyanidin-accumulating cells of the seed coat. **Plant Cell**, v. 19, n. 6, p. 2023-2038, Jun 2007.

MARON, L. G.; GUIMARAES, C. T.; KIRST, M.; ALBERT, P. S.; BIRCHLER, J. A.; BRADBURY, P. J.; BUCKLER, E. S.; COLUCCIO, A. E.; DANILOVA, T. V.; KUDRNA, D.; MAGALHAES, J. V.; PINEROS, M. A.; SCHATZ, M. C.; WING, R. A.; KOCHIAN, L. V. Aluminum tolerance in maize is associated with higher MATE1 gene copy number. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 13, p. 5241-5246, Mar 2013.

MARON, L. G.; PINEROS, M. A.; GUIMARAES, C. T.; MAGALHAES, J. V.; PLEIMAN, J. K.; MAO, C. Z.; SHAFF, J.; BELICUAS, S. N. J.; KOCHIAN, L. V. Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. **Plant Journal**, v. 61, n. 5, p. 728-740, Mar 2010.

MARRACCINI, P.; COURJAULT, C.; CAILLET, V.; LAUSANNE, F.; LEPAGE, B.; ROGERS, W. J.; TESSERAU, S.; DESHAYES, A. Rubisco small subunit of *Coffea arabica*: cDNA sequence, gene cloning and promoter analysis in transgenic tobacco plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 17-25, Jan 2003

MATSUMOTO, H. Cell biology of aluminium toxicity and tolerance in higher plants. **International review of cytology**, v. 200, p.1-46, 2000.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUARIA E ABASTACIMENTO, SECRETARIA DE POLÍTICA AGRÍCOLA E DEPARTAMENTO DE CRÉDITO, RECURSOS E RISCOS. Informe estatístico do café. Setembro, 2015.

MONDEGO, J. M. C.; VIDAL, R. O.; CARAZZOLLE, M. F.; TOKUDA, E. K.; PARIZZI, L. P.; COSTA, G. G. L.; PEREIRA, L. F. P.; ANDRADE, A. C.; COLOMBO, C. A.; VIEIRA, L. G. E.; PEREIRA, G. A. G.; BRAZILIAN COFFEE GENOME PROJECT, C. An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. **Bmc Plant Biology**, v. 11, p. 22, Feb 2011.

MORITA, M.; SHITAN, N.; SAWADA, K.; VAN MONTAGU, M. C. E.; INZE, D.; RISCHER, H.; GOOSSENS, A.; OKSMAN-CALDENTY, K.-M.; MORIYAMA, Y.; YAZAKI, K. Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *Nicotiana tabacum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 7, p. 2447-2452, Feb 17 2009.

MUJIKA, J. L.; UGALDE, J. M.; LOPES, X. Aluminium speciation in biological environments. The deprotonation of free and aluminium bound citrate in aqueous solution. **Physical chemistry chemical physics**, v. 14, p. 12465-124675, 2012

NEVES, C. **A estória do café**. Instituto Brasileiro do Café, Assessoria de Relações Públicas, 1974.

OMOTE, H.; HIASA, M.; MATSUMOTO, T.; OTSUKA, M.; MORIYAMA, Y. The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 11, p. 587-593, Nov 2006.

PEREZ-DIAZ, R.; RYNGAJLLO, M.; PEREZ-DIAZ, J.; PENA-CORTES, H.; CASARETTO, J. A.; GONZALEZ-VILLANUEVA, E.; RUIZ-LARA, S. VvMATE1 and VvMATE2 encode putative proanthocyanidin transporters expressed during berry development in *Vitis vinifera* L. **Plant Cell Reports**, v. 33, n. 7, p. 1147-1159, Jul 2014.

PETITOT, A. S.; BARSALOBRES-CAVALLARI, C.; RAMIRO, D.; ALBUQUERQUE FREIRE, E.; ETIENNE, H.; FERNANDEZ, D. Promoter analysis of the WRKY transcription factors CaWRKY1a and CaWRKY1b homoeologous genes in coffee (*Coffea arabica*). **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 8, p. 1263-1276, 2013.

PETRICK, J. L.; FREEDMAN, N. D.; GRAUBARD, B. I.; SAHASRABUDDHE, V. V.; LAI, G. Y.; ALAVANJA, M. C.; BEANE-FREEMAN, L. E.; BOGGS, D. A.; BURING, J. E.; CHAN, A. T.; CHONG, D. Q.; FUCHS, C. S.; GAPSTUR, S. M.; GAZIANO, J. M.; GIOVANNUCCI, E. L.; HOLLENBECK, A. R.; KING, L. Y.; KOSHIOL, J.; LEE, I. M.; LINET, M. S.; PALMER, J. R.; POYNTER, J. N.; PURDUE, M. P.; ROBIEN, K.; SCHAIRER, C.; SESSO, H. D.; SIGURDSON, A. J.; ZELENIUCH-JACQUOTTE, A.; WACTAWSKI-WENDE, J.; CAMPBELL, P. T.; MCGLYNN, K. A. Coffee Consumption and Risk of Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma by Sex: The Liver Cancer Pooling Project. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 24, n. 9, p. 1398-1406, Sep 2015.

PINTON, R.; VARANINI, Z.; NANNIPIERI, P.; The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. **CRC Press**, second edition, 2007.

POOT-POOT, W.; HERNANDEZ-SOTOMAYOR, S. M. T. Aluminum Stress and its Role in the Phospholipid Signaling Pathway in Plants and Possible Biotechnological Applications. **Iubmb Life**, v. 63, n. 10, p. 864-872, Oct 2011.

RAMIREZ-BENITEZ, J. E.; CHEE-GONZALEZ, L.; HERNANDEZ-SOTOMAYOR, S. M. T. Aluminium induces changes in organic acids metabolism in *Coffea arabica* suspension cells with differential Al-tolerance. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, n. 8, p. 1631-1637, Aug 2008.

RIBAS, A. F.; KOBAYASHI, A. K.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Genetic transformation of *Coffea canephora* by particle bombardment. **Biologia Plantarum**, v. 49, n. 4, p. 493-497, 2005.

RIBAS, A. F.; DECHAMP, E.; CHAMPION, A.; BERTRAND, B.; COMBES, M. C.; VERDEIL, J. L.; LAPEYRE, F.; LASHERMES, P.; ETIENNE, H. Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. **Bmc Plant Biology**, v. 11, p. 15, May 2011.

ROBBRECHT, E.; MANEN, J.F. The major evolutionary lineages of coffee family (Rubiaceae, angiosperms). Combined analysis (nDNA and cpDNA) to infer position of *Copsapelta* and *Luculia*, and supertree construction based on *rbcL*, *rps16*, *trnL-trnF* and *atpB-rbcL* data. A new classification in two subfamilies, Cinchooideae and Rubioideae. **Systematics and Geography of Plants**, v. 76, p. 85-145, 2006.

ROGERS, W. J.; BEZARD, G.; DESHAYES, A.; MEYER, I.; PETIARD, V.; MARRACCINI, P. Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 261-272, Apr 1999.

RYAN, P. R.; RAMAN, H.; GUPTA, S.; HORST, W. J.; DELHAIZE, E. A Second Mechanism for Aluminum Resistance in Wheat Relies on the Constitutive Efflux of Citrate from Roots. **Plant Physiology**, v. 149, n. 1, p. 340-351, Jan 2009.

SAWAKI, Y.; KIHARA-DOI, T.; KOBAYASHI, Y.; NISHIKUBO, N.; KAWAZU, T.; KOBAYASHI, Y.; KOYAMA, H.; SATO, S. Characterization of Al-responsive citrate excretion and citrate-transporting MATEs in *Eucalyptus camaldulensis*. **Planta**, v. 237, n. 4, p. 979-989, Apr 2013.

SCHROEDER, J. I.; DELHAIZE, E.; FROMMER, W. B.; GUERINOT, M. L.; HARRISON, M. J.; HERRERA-ESTRELLA, L.; HORIE, T.; KOCHIAN, L.

V.; MUNNS, R.; NISHIZAWA, N. K.; TSAY, Y. F.; SANDERS, D. Using membrane transporters to improve crops for sustainable food production. **Nature**, v. 497, n. 7447, p. 60-66, May 2013.

SHEN, J. B.; YUAN, L. X.; ZHANG, J. L.; LI, H. G.; BAI, Z. H.; CHEN, X. P.; ZHANG, W. F.; ZHANG, F. S. Phosphorus Dynamics: From Soil to Plant. **Plant Physiology**, v. 156, n. 3, p. 997-1005, Jul 2011.

SHITAN, N.; MINAMI, S.; MORITA, M.; HAYASHIDA, M.; ITO, S.; TAKANASHI, K.; OMOTE, H.; MORIYAMA, Y.; SUGIYAMA, A.; GOOSSENS, A.; MORIYASU, M.; YAZAKI, K. Involvement of the Leaf-Specific Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE) Transporter Nt-JAT2 in Vacuolar Sequestration of Nicotine in *Nicotiana tabacum*. **Plos One**, v. 9, n. 9, Sep 30 2014.

SILVA, F.A.M.; NOGUEIRA, F.D.; GUIMARAES, P.A.G.; GODINHO, A.; MALTA, M.R. Determinação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular na rizosfera de cafeeiro por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Ciência e agrotecnologia**, edição especial, p.1391-1395, 2002.

SIVAGURU, M.; LIU, J. P.; KOCHIAN, L. V. Targeted expression of SbMATE in the root distal transition zone is responsible for sorghum aluminum resistance. **Plant Journal**, v. 76, n. 2, p. 297-307, Oct 2013.

TAKANASHI, K.; YOKOSHO, K.; SAEKI, K.; SUGIYAMA, A.; SATO, S.; TABATA, S.; MA, J. F.; YAZAKI, K. LjMATE1: A Citrate Transporter Responsible for Iron Supply to the Nodule Infection Zone of *Lotus japonicus*. **Plant and Cell Physiology**, v. 54, n. 4, p. 585-594, Apr 2013.

TAKANASHI, K.; SHITAN, N.; YAZAKI, K. The multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family in plants. **Plant Biotechnology**, v. 31, n. 5, p. 417-430, Dec 2014.

THOMAS, R. J.; AYARZA, M. A.; LOPES, A. S. Management and conservation of acid soils in the savannahs of latin America: lessons from the agricultural development of the Brazilian cerrados. **Management and conservation of tropical acid soils for sustainable crop production, proceedings consultants meeting**, p. 10-18, 2000.

TIWARI, M.; SHARMA, D.; SINGH, M.; TRIPATHI, R. D.; TRIVEDI, P. K. Expression of OsMATE1 and OsMATE2 alters development, stress responses and pathogen susceptibility in *Arabidopsis*. **Scientific Reports**, v. 4, Feb 4 2014.

UHDE-STONE, C.; LIU, J. Q.; ZINN, K. E.; ALLAN, D. L.; VANCE, C. P. Transgenic proteoid roots of white lupin: a vehicle for characterizing and silencing root genes involved in adaptation to P stress. **Plant Journal**, v. 44, n. 5, p. 840-853, Dec 2005.

VALENTINUZZI, F.; PII, Y.; VIGANI, G.; LEHMANN, M.; CESCO, S.; MIMMO, T. Phosphorus and iron deficiencies induce a metabolic reprogramming and affect the exudation traits of the woody plant *Fragaria x ananassa*. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 20, p. 6483-6495, Oct 2015.

VIDAL, R. O.; MONDEGO, J. M. C.; POT, D.; AMBROSIO, A. B.; ANDRADE, A. C.; PEREIRA, L. F. P.; COLOMBO, C. A.; VIEIRA, L. G. E.; CARAZZOLLE, M. F.; PEREIRA, G. A. G. A High-Throughput Data Mining of Single Nucleotide Polymorphisms in *Coffea* Species Expressed Sequence Tags Suggests Differential Homeologous Gene Expression in the Allotetraploid *Coffea arabica*. **Plant Physiology**, v. 154, n. 3, p. 1053-1066, Nov 2010.

VIEIRA, L.G.E.; ANDRADE, A. C.; COLOMBO, C. A.; HELONEIDA DE ARAUJO MORAES, A.; METHA, A.; CARVALHO DE OLIVEIRA, A.; LABATE, C. A.; MARINO, C. L.; DE BARROS MONTEIRO-VITORELLO, C.; DE CASTRO MONTE, D.; GIGLIOTI, E.; KIMURA, E. T.; ROMANO, E.; KURAMAE, E. E.; MACEDO LEMOS, E. G.; PEREIRA DE ALMEIDA, E. R.; JORGE, E. C.; ALBUQUERQUE, E. V. S.; RODRIGUES DA SILVA, F.; VINECKY, F.; SAWAZAKI, H. E.; DORRY, H. F. A.; CARRER, H.; ABREU, I. N.; BATISTA, J. A. N.; TEIXEIRA, J. B.; KITAJIMA, J. P.; XAVIER, K. G.; DE LIMA, L. M.; ARANHA DE CAMARGO, L. E.; PROTASIO PEREIRA, L. F.; COUTINHO, L. L.; FRANCO LEMOS, M. V.; ROMANO, M. R.; MACHADO, M. A.; MOTA DO CARMO COSTA, M.; GROSSI DE SA, M. F.; GOLDMAN, M. H. S.; FERRO, M. I. T.; PENHA TINOCO, M. L.; OLIVEIRA, M. C.; VAN SLUYS, M.-A.; SHIMIZU, M. M.; MALUF, M. P.; SOUZA DA EIRA, M. T.; GUERREIRO FILHO, O.; ARRUDA, P.; MAZZAFERA, P.; SAMPAIO CORREA MARIANI, P. D.; DE OLIVEIRA, R. L. B. C.; HARAKAVA, R.; BALBAO, S. F.; TSAI, S. M.; ZINGARETTI DI MAURO, S. M.; SANTOS, S. N.; SIQUEIRA, W. J.; LACERDA COSTA, G. G.; FORMIGHIERI, E. F.; CARAZZOLLE, M. F.; GUIMARAES PEREIRA, G. A. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 95-108, Jan-Mar 2006.

VON UEXKULL, H. R.; MUTERT, E. GLOBAL EXTENT, DEVELOPMENT AND ECONOMIC-IMPACT OF ACID SOILS. **Plant and Soil**, v. 171, n. 1, p. 1-15, Apr 1995.

WANG, X. Y.; PATERSON, A. H. Gene Conversion in Angiosperm Genomes with an Emphasis on Genes Duplicated by Polyploidization. **Genes**, v. 2, n. 1, p. 1-20, Mar 2011.

WANG, Z.; STRAUB, D.; YANG, H.; KANIA, A.; SHEN, J.; LUDEWIG, U.; NEUMANN, G. The regulatory network of cluster-root function and development in phosphate-deficient white lupin (*Lupinus albus*) identified by transcriptome sequencing. **Physiologia Plantarum**, v. 151, n. 3, p. 323-338, Jul 2014.

WU, X. X.; LI, R.; SHI, J.; WANG, J. F.; SUN, Q. Q.; ZHANG, H. J.; XING, Y. X.; QI, Y.; ZHANG, N.; GUO, Y. D. Brassica oleracea MATE Encodes a Citrate Transporter and Enhances Aluminum Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v. 55, n. 8, p. 1426-1436, Aug 2014.

YOKOSHO, K.; YAMAJI, N.; UENO, D.; MITANI, N.; MA, J. F. OsFRDL1 Is a Citrate Transporter Required for Efficient Translocation of Iron in Rice. **Plant Physiology**, v. 149, n. 1, p. 297-305, Jan 2009.

ZHAO, J.; DIXON, R. A. MATE Transporters Facilitate Vacuolar Uptake of Epicatechin 3'-O-Glucoside for Proanthocyanidin Biosynthesis in *Medicago truncatula* and *Arabidopsis* (vol 21, pg 2323, 2009). **Plant Cell**, v. 22, n. 3, p. 991-991, Mar 2010.

ZHOU, P.; YANG, F.; REN, X. Y.; HUANG, B. R.; AN, Y. Phytotoxicity of aluminum on root growth and indole-3-acetic acid accumulation and transport in alfalfa roots. **Environmental and Experimental Botany**, v. 104, p. 1-8, Aug 2014.

CAPÍTULO 2: Estudo *in silico* da família *Multi drug and toxic compound extrusion* em *Coffea canephora*.

RESUMO

A família gênica *Multi drug and toxic compound extrusion (MATE)* é composta por membros relacionados a diversos processos metabólicos e mecanismos de resposta às condições ambientais. As proteínas codificadas por estes genes possuem estrutura em comum, porém apresentam divergências específicas que permitem a subdivisão em grupos, os quais, geralmente relacionam-se às funções específicas. Por isso, ensaios filogenéticos e análises de similaridades podem fornecer informações relevantes para a caracterização desta família em espécies que possuem o genoma sequenciado. No entanto, para que os dados sejam representativos da realidade, é necessário que a predição do modelo gênico seja validada por análises específicas, como a comparação com bibliotecas de cDNA. Apesar da importância destas proteínas para as plantas, esta família não é elucidada em espécies do gênero *Coffea* e nem mesmo da subclasse *Asterideae*. A partir dessas constatações, objetivou-se com este trabalho, identificar os genes da família *MATE* em *C. canephora*, bem como validar a predição gênica para estes membros mediante confronto dos dados contra bibliotecas de cDNA provenientes de ensaios de RNA-seq, além de associar alguns membros às potenciais funções características. A correção do modelo gênico foi realizada manualmente com auxílio do software GENEIOUS e as análises filogenéticas foram executadas no programa MEGA 6.0. O alinhamento das proteínas foi elaborado a partir do algoritmo ClustalW e foi utilizado o método *Neighbor joining* para a construção da árvore filogenética, baseada no método *p-distance* e em *bootstrap* com 10.000 replicatas. Os alinhamentos múltiplos foram visualizados a partir do software GENEDOC. Foi possível identificar 60 genes membros desta família em *C. canephora*, condizente com o observado em outras espécies, todos estes foram analisados mediante biblioteca de cDNA e a maioria compartilha a estrutura proteica padrão, após realizadas as correções da predição gênica. Por fim, alguns membros desta família em *C. canephora* foram destacados pelo potencial envolvimento em funções relevantes para a cultura do café, como a adaptação aos solos ácidos (*CcMATE42*), transporte de alcalóides (*CcMATE7* e *CcMATE43*) e flavonóides (*CcMATE18* e *CcMATE20*).

Palavras-chave: filogenético; RNA-seq; flavonóides; alcalóides; solos ácidos

ABSTRACT

The *Multi drug and toxic compound extrusion (MATE)* gene family is comprised by members related to many metabolic process and stress response mechanisms. The proteins that are codified by these genes have a common structure, but with specific divergences that allows subdivisions in some groups, generally related to specific functions. So, phylogenetic studies and similarity analysis can sustain relevant information for this family characterization on genome sequenced species. On the other hand, to have concise reality related data, it is necessary to assure the gene prediction model by specific analyzes, as the comparison to cDNA libraries. Although this protein family has great importance for plants, it is not elucidated on *Coffea* genus and even on *Asterideae* subclass. By this facts, the objectives with this work were to identify *MATE* genes on *Coffea canephora* and validate its genic predictions by confronting them against cDNA libraries data from RNA-seq experiments, besides of associate some members to specific functions. The corrections of gene model were made manually, on GENEIOUS program and phylogenetics were made on MEGA 6.0 program, by alignment of the proteins trough ClustalW algorithm and the use of Neighbor-joining algorithm to construct the phylogenetic tree, based on p-distance and 10.000 bootstrap replicates. The multiple alignments were analyzed by the software GENEDOC. It was possible to identify 60 *MATE* genes on *C. canephora*, what was consistent to observed in other plants. All the data was confronted to cDNA libraries and, after that, it was observed that the proteins shares standard protein structures. By the end, some members of this family on *C. canephora* were highlighted by potential involvement on relevant functions to coffee cultivation and consumption, like acid soil adaptation (*CcMATE42*), alkaloid transport (*CcMATE7* and *CcMATE43*) and flavonoids transport (*CcMATE18* and *CcMATE20*), revealing important candidate genes for breeding programs.

Keywords: phylogenetic; RNA-seq; flavonoid; alkaloid; acid soils

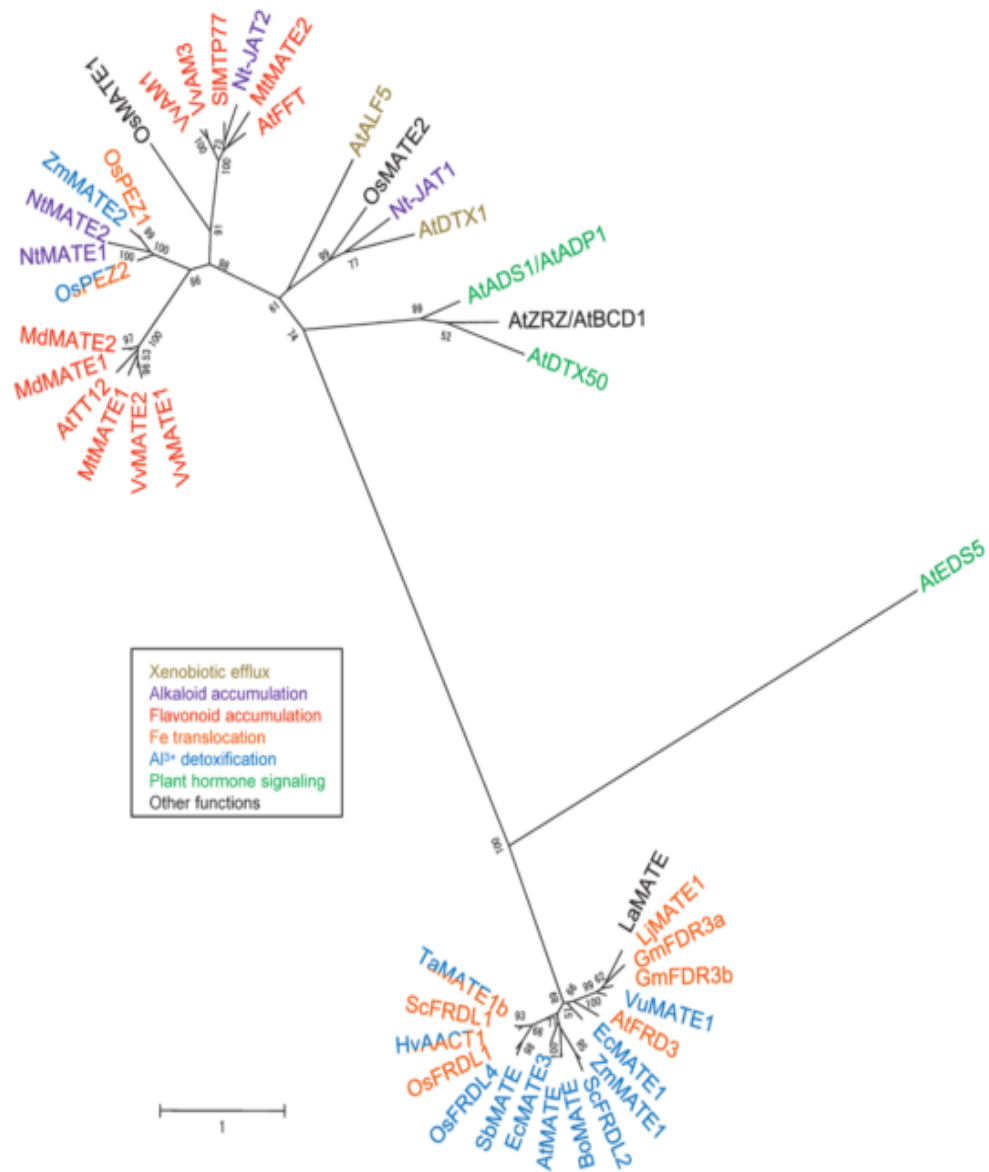
1. INTRODUÇÃO

A família gênica *Multi drug and toxic compound extrusion (MATE)* pode ser dividida em 15 subfamílias e seus membros distribuem-se de forma ubíqua entre os organismos vivos. Sete subfamílias são específicas para bactérias, uma é composta apenas por proteínas de arqueobactérias, três apresentam proteínas identificadas somente em bactérias e arqueobactérias, uma compreende proteínas de vegetais e bactérias e, por fim, três subfamílias possuem proteínas restritas à eucariotos, especificamente para leveduras, plantas e animais (HVORUP *et al.*, 2003).

O primeiro gene clonado desta família é originário da bactéria *Vibrio parahaemolyticuse*. A partir da superexpressão em *Escherichia coli* este gene conferiu resistência à norfloxacin, além de ciprofloxacina, etídeo, kanamicina e streptomicina, portanto, atribuiu multi-resistência à bactéria. Não havia, até então, proteínas depositadas em bancos de dados com similaridade significativa (MORITA *et al.*, 1998).

Em plantas, o gene *AtALF5* de *A. thaliana* foi o primeiro a ser isolado e também estava envolvido com múltipla resistência à xenobióticos (DIENER *et al.*, 2001). No entanto, a partir da descoberta de novas proteínas MATE em vegetais foi demonstrado que esta família está relacionada à diversas funções fisiológicas pois, apesar da especificidade de cada membro individual por um substrato a ser transportado, esta família compreende diversos membros com afinidade por variados tipos de moléculas. Por isso, desempenham funções diversificadas nos organismos vegetais, desde translocação de nutrientes, como ferro, ao transporte de ácidos orgânicos, hormônios e metabólitos secundários (Figura 8) (TAKANASHI, K. *et al.*, 2014).

Figura 8: Árvore filogenética com representantes da família *MATE* já caracterizados e suas funções.



Fonte: TAKANASHI *et al.*, 2014

Alguns estudos apontam para o número elevado de parálogos desta família presentes em espécies vegetais. Em *A. thaliana* existem 56 proteínas MATE, enquanto que em *Oryza sativa* 53, *Medicago truncatula* cerca de 40 e *Glycine max* 117 representantes (LI *et al.*, 2002; LIU, J. *et al.*, 2016; TIWARI *et al.*, 2014; ZHAO; DIXON, 2010). Já em bactérias, arqueias e leveduras, esta variabilidade no número de parálogos restringe-se ao número máximo de 10 representantes em um indivíduo (HVROUP *et al.*, 2003).

Por se tratarem de proteínas que exercem o transporte de diversos substratos, são importantes para a compreensão de diferentes processos metabólicos em um organismo e, conseqüentemente, podem ser alvos de programas de melhoramento genético para o aprimoramento de características de interesse.

Não existem relatos na literatura à respeito de membros dessa família no gênero *Coffea*, apesar da pertinência científica e tecnológica relativa ao estudo destes genes para estas espécies, pois alguns membros já caracterizados em plantas desempenham funções importantes tanto para o cultivo do cafeeiro, como o efluxo de citrato para tolerância à toxicidade de alumínio, absorção de fosfato e transporte de ferro (CARVALHO, G., JR. *et al.*, 2016; KOSTIC *et al.*, 2015; TAKANASHI, KOJIRO *et al.*, 2013), quanto para aspectos relacionados a qualidade da bebida, como o transporte e acúmulo de alcalóides e flavonóides (CHEN, L. *et al.*, 2015; PEREZ-DIAZ *et al.*, 2014; SHITAN *et al.*, 2014).

Neste contexto, objetivou-se identificar os membros da família MATE em *C. canephora*, bem como validar a predição gênica de cada representante a partir de confronto contra dados provenientes de análises de RNA-seq. Além disso, foram realizadas análises *in silico* dos membros identificados, afim de destacar genes alvo para processos de interesse para programas de melhoramento do cafeeiro.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Obtenção das sequências proteicas de genes da família *MATE* em *C. canephora* e correção da predição gênica dos candidatos

A partir de trabalhos publicados referentes à caracterização de genes *MATE*, foram selecionados 40 membros desta família de forma representativa em relação às diversas funções que estes podem desempenhar nos processos metabólicos em plantas (Apêndice, tabela 1). Apenas genes com funções comprovadas a partir de ensaios *in vivo* foram selecionados para as análises.

Estas sequências foram confrontadas contra um banco de dados proteômicos de *C. canephora*, a partir da utilização do algoritmo *blastp*, com restrição para valores de *e-value* inferiores à 0,00001.

Então, as sequências reduntantes foram eliminadas e as restantes foram submetidas à análise contra banco de dados de cDNAs provenientes de análise de RNA-seq, por intermédio do algoritmo *tblastn* e, com base nos resultados gerados, a partir da utilização do software GENEIOUS R9, foi realizada a correção manual da predição de éxons, íntrons e regiões não traduzidas (5'UTR e 3'UTR) para cada sequência obtida.

2.2. Análises estruturais *in silico*

As sequências proteicas geradas a partir das correções efetuadas em 2.1 foram, então, submetidas à busca por domínios conservados no banco de dados *Conserved Domain Database – National Center for Biotechnology Information (CDD-NCBI)* a partir da ferramenta *Conserved Domain Search* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). Apenas as sequências

que apresentaram, pelo menos, o domínio conservado da superfamília *MATE* (código de acesso cl09326) foram utilizadas para as análises seguintes.

A partir da ferramenta *HMMTOP* (<http://www.enzim.hu/hmmtop/index.php>) (TUSNÁDY E SIMON, 1998; TUSNÁDY E SIMON, 2001) foram preditos o número e a posição dos domínios transmembranares de cada proteína.

2.3. Estabelecimento das relações filogenéticas e agrupamento das sequências proteicas

As sequências de proteínas *MATE* já caracterizadas de diferentes espécies vegetais, juntamente com as sequências proteicas obtidas e corrigidas de *C. canephora* foram alinhadas mediante ao algoritmo *ClustalW* (THOMPSON, 1994), com auxílio do programa MEGA 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013) (<http://www.megasoftware.net/>). A partir disto, foi realizada uma análise filogenética pelo método *Neighbor-joining* (SAITOU e NEI, 1987), como modelo de substituição *p-distance* (NEI e KUMAR, 2000) e teste de filogenia pelo método de *Bootstrap* com 10.000 replicatas.

A partir da análise da árvore filogenética gerada, bem como do alinhamento múltiplo com auxílio do software GENEDOC (NICHOLAS *et al.*, 1997) (<http://www.nrbcs.org/gfx/genedoc/ebinet.htm>), as sequências foram divididas em grupos, as quais foram novamente alinhadas e analisadas quanto às relações filogenéticas para a divisão em subgrupos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das análises efetuadas em bancos de dados genômicos de *C. canephora*, associadas às correções nas predições gênicas mediante confronto contra dados transcriptômicos obtidos de bibliotecas de RNA-seq, foi possível identificar 60 genes pertencentes à família *MATE* em *C. canephora*. Estes genes foram renomeados de acordo com a ordem do arquivo de saída das análises, de *CcMATE1* à *CcMATE60*.

Este número de parálogos desta família é condizente em relação à espécies vegetais, já que em *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* e *Medicago truncatula* foram identificados 56, 53 e 40 membros, respectivamente (LI *et al.*, 2002; TIWARI *et al.*, 2014; ZHAO; DIXON, 2010). Apenas em *Glycine max* a quantidade de genes dessa família é maior, sendo 117 genes, fato explicado pela elevada taxa de duplicação gênica (82,05% dos genes *MATE* estão presentes em duplicações, 21,37% em tandem e 60,68% de forma segmental) (LIU, J. *et al.*, 2016).

Interessantemente, a quantidade de parálogos desta família em plantas é superior ao observado em arqueias, bactérias, leveduras e animais (HVROUP *et al.*, 2003; OMOTE *et al.*, 2006). A maior quantidade de parálogos de famílias multigênicas em vegetais pode ser relacionada aos eventos de poliploidização recorrentes, principalmente em angiospermas, que geram duplicações gênicas redundantes (WANG, X. Y.; PATERSON, 2011). A retenção destas duplicações no genoma por longos períodos temporais culmina, por meio de mutações, em eventos de subfuncionalização e neofuncionalização e, conseqüentemente, estes genes duplicados que adquirem novas funções são mantidos, resultando em um aumento da diversidade de proteínas derivadas de um mesmo ancestral (VEITIA, 2005).

A comparação dos 60 genes identificados em banco de dados genômicos com dados de experimentos de RNA-seq permitiu a realização de ajustes na predição gênica destes candidatos. Os transcritos montados a partir dos dados de RNA-seq foram utilizados para a delimitação de éxons e íntrons, além do estabelecimento de regiões não-traduzidas (figura 1, Apêndice)

Após estas correções, constata-se que os genes *MATE* identificados em *C. canephora*, marjoritariamente, codificam proteínas de 400 à 700 resíduos de aminoácidos com cerca de 12 domínios transmembranares e todos possuem ao menos o domínio conservado referente à superfamília MATE (Tabela 1) o que corrobora com o padrão observado para esta família (OMOTE *et al.*, 2006).

Tabela 1: Detalhamento dos membros da família *MATE* em *C. canephora* quanto ao número de éxons, tamanho da proteína codificada pelo gene, domínios conservados e número de domínios transmembranares (DTM).

Gene	Nº éxons	Tamanho da proteína	Código de acesso (NCBI-CDD)	Nº de DTM
CcMATE1	8	496 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	12
CcMATE2	3	493 aa	cl09326; cd13132; COG0534	12
CcMATE3	8	486 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	12
CcMATE4	1	553 aa	cl09326; cd13132; COG0534	11
CcMATE5	8	529 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	12
CcMATE6	6	332 aa	cl09326	5
CcMATE7	7	510 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	12
CcMATE8	7	504 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	12
CcMATE9	8	489 aa	cl09326; cd13132; COG0534	12
CcMATE10	8	442 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	10
CcMATE11	7	507 aa	cl09326; cd13132; COG0534	12
CcMATE12	6	354 aa	cl09326; TIGR00797	6
CcMATE13	4	186 aa	cl09326;	2
CcMATE14	12	530 aa	cl09326; cd13136; TIGR00797	12

CcMATE15	14	600 aa	cl09326; cd13136; COG0534	11
CcMATE16	7	494 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	12
CcMATE17	8	230 aa	cl09326;	3
CcMATE18	8	503 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	12
CcMATE19	9	430 aa	cl09326;	7
CcMATE20	8	505 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	12
CcMATE21	2	575 aa	cl09326; cd13132; COG0534	11
CcMATE22	7	501 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	12
CcMATE23	4	319 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	8
CcMATE24	7	500 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	12
CcMATE25	7	495 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	12
CcMATE26	8	485 aa	cl09326; cd13132; COG0534	12
CcMATE27	8	441 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	10
CcMATE28	1	504 aa	cl09326; cd13132; COG0534	10
CcMATE29	1	512 aa	cl09326; cd13132; COG0534	12
CcMATE30	14	485 aa	cl09326; COG0534	12
CcMATE31	14	565 aa	cl09326; cd13136; COG0534	9
CcMATE32	9	565 aa	cl09326; cd13132; COG0534	12
CcMATE33	5	305 aa	cl09326;	8
CcMATE34	7	480 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	12
CcMATE35	7	479 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	12
CcMATE36	13	563 aa	cl09326; cd13136; TIGR00797	11
CcMATE37	7	430 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	10
CcMATE38	8	504 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	12
CcMATE39	2	501 aa	cl09326; cd13132; COG0534	12
CcMATE40	13	578 aa	cl09326; cd13136; TIGR00797	10
CcMATE41	1	481 aa	cl09326; cd13132; COG0534	12
CcMATE42	13	511 aa	cl09326; cd13136; TIGR00797	12
CcMATE43	7	505 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	12
CcMATE44	3	580 aa	cl09326; cd13132; COG0534	11

CcMATE45	8	520 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	12
CcMATE46	8	477 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	12
CcMATE47	7	480 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	12
CcMATE48	8	488 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	12
CcMATE49	7	478 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	12
CcMATE50	7	370 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	9
CcMATE51	6	400 aa	cl09326; cd13132; COG0534	10
CcMATE52	7	505 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	11
CcMATE53	6	447 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	11
CcMATE54	7	497 aa	cl09326; cd13132; COG0534	13
CcMATE55	7	446 aa	cl09326; cd13132; COG0534	12
CcMATE56	8	484 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	12
CcMATE57	7	447 aa	cl09326; cd13132; COG0534	10
CcMATE58	9	473 aa	cl09326; cd13132; TIGR00797	11
CcMATE59	8	455 aa	cl09326; cd13132; COG0534	10
CcMATE60	7	454 aa	cl09326; cd13132	9

Os códigos de acesso para os domínios conservados expostos na tabela 1 referem-se à domínios comumente observados em proteínas da família *MATE* como o referente à superfamília *MATE* (cl0936). O código cd13132 refere-se ao domínio específico *MATE_eukaryotic* relacionado ao padrão estrutural encontrado em eucariotos, cd13136 refere-se ao domínio específico *MATE_Dinf_like* relacionado ao padrão observado em proteínas de procariotos que intermedeiam o efluxo de substâncias por influxo de H⁺, COG0534 refere-se ao multi-domínio *Norm* que caracteriza proteínas de procariotos as quais ocorre o influxo de Na⁺ para o efluxo do substrato e o código TIGR00797 que remete ao multi-domínio *matE* que engloba proteínas desta família.

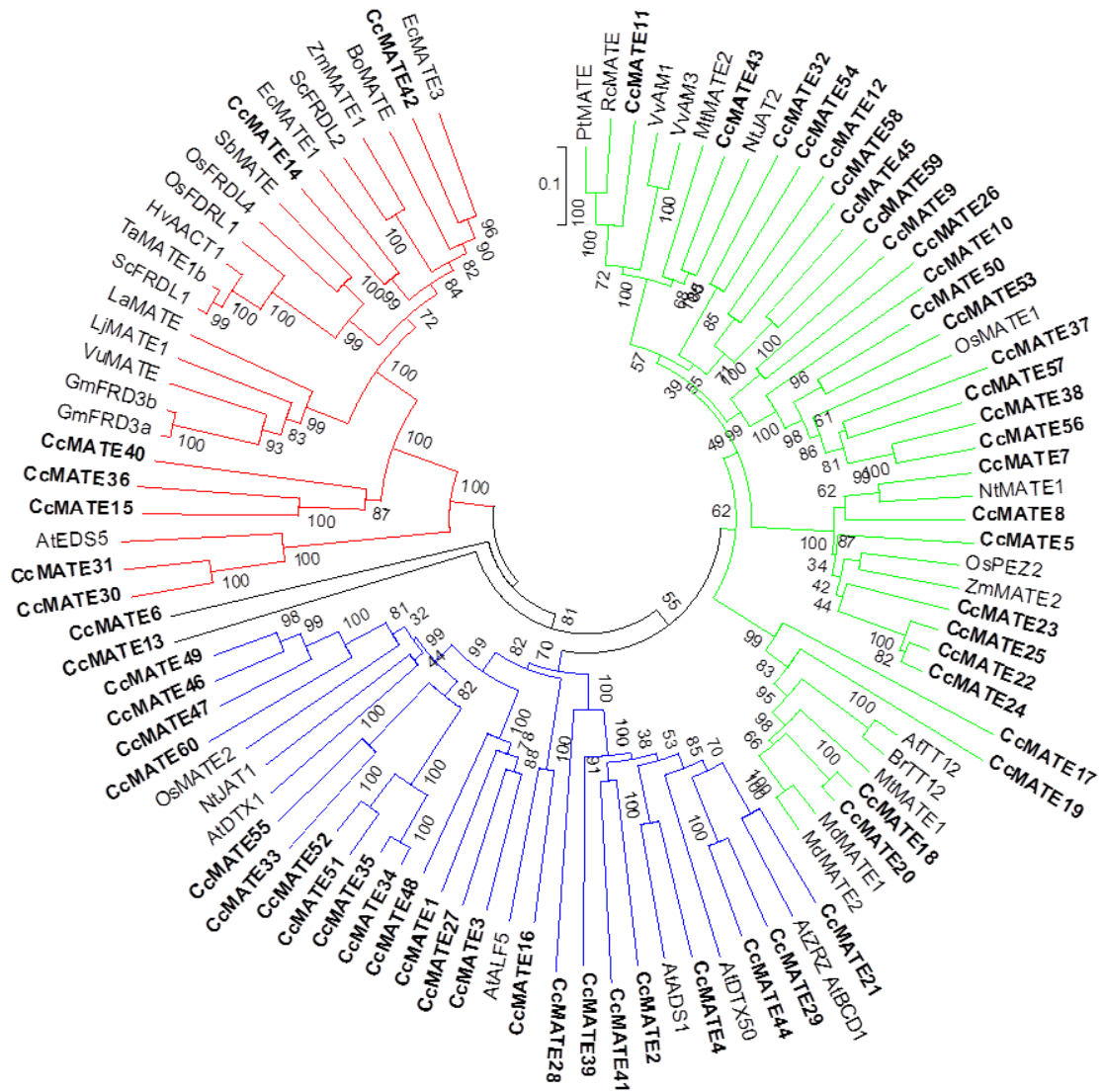
Estas proteínas identificadas em *C. canephora* como potenciais membros da família MATE foram submetidas à análises filogenéticas e, foram incorporadas à este estudo, 40 proteínas oriundas de diversas espécies vegetais e que representam todas as funções atribuídas até o momento aos membros desta família. A árvore filogenética resultante (figura 9) propicia a análise da segregação das proteínas MATE parálogas de *C. canephora* e das outras espécies em grupos específicos, possivelmente distribuídos mediante a afinidades dos transportadores por determinadas moléculas.

Este padrão de formação de grupos específicos para o transporte de substratos distintas é o mesmo observado em trabalhos anteriores (LIU, J. *et al.*, 2016; TAKANASHI, K. *et al.*, 2014) e evidencia a influência destes genes em processos metabólicos variados nos organismos vegetais, inclusive em *C. canephora*.

Apenas duas proteínas não ficaram próximas à nenhum grupo com membros de funções conhecidas, *CcMATE6* e *CcMATE13*. Estas proteínas tem tamanhos relativamente pequenos (332 e 186 resíduos de aminoácidos, respectivamente) em comparação com o padrão de 400 à 700 resíduos de aminoácidos e apresentam apenas 5 e 2 domínios transmembranares, respectivamente. Estes fatores podem ter influenciado a posição destas proteínas na árvore filogenética, porém outros membros como *CcMATE12* e *CcMATE17* que também apresentam características discrepantes foram alocados em grupos com representantes de funções determinadas.

Vale ressaltar que esta é a primeira análise da família MATE em sua totalidade em uma planta lenhosa, bem como em um membro da subclasse *Asteridae*, portanto é possível suportar a hipótese de que estas duas proteínas possam exercer uma função ainda não caracterizada em membros de outras espécies.

Figura 9: Análise filogenética dos membros da família *MATE* de *C. canephora* e de diversas espécies das quais a função atribuída à proteína está elucidada.



Legenda: Foi utilizado o método de *Neighbor Joining* com bootstrap de 10.000 replicatas. As cores representam os grupos marjoritários nos quais a árvore filogenética divide-se, sendo vermelho para grupo 1, azul para grupo 2 e verde para o grupo3.

Fonte: do autor.

A partir do alinhamento global destas proteínas é possível observar que não há blocos contínuos conservados para todas as sequências proteicas da família *MATE* analisadas neste estudo, em nível de similaridade entre resíduos de aminoácidos, apenas padrões de conservação em posições específicas, fato que é coerente com os dados abordados em literatura (MAGALHAES, 2010).

As relações filogenéticas geradas permitem a divisão das proteínas em três grupos, 1 (cor vermelha) 2 (cor azul) e 3 (cor verde), nos quais as sequências compartilham maior grau de similaridade. Afim de agrupar as proteínas com afinidade por substratos em comum, cada grupo foi subdividido seguindo o critério de manter proteínas com funções caracterizadas em todos os subgrupos (Figuras 10, 11 e 12).

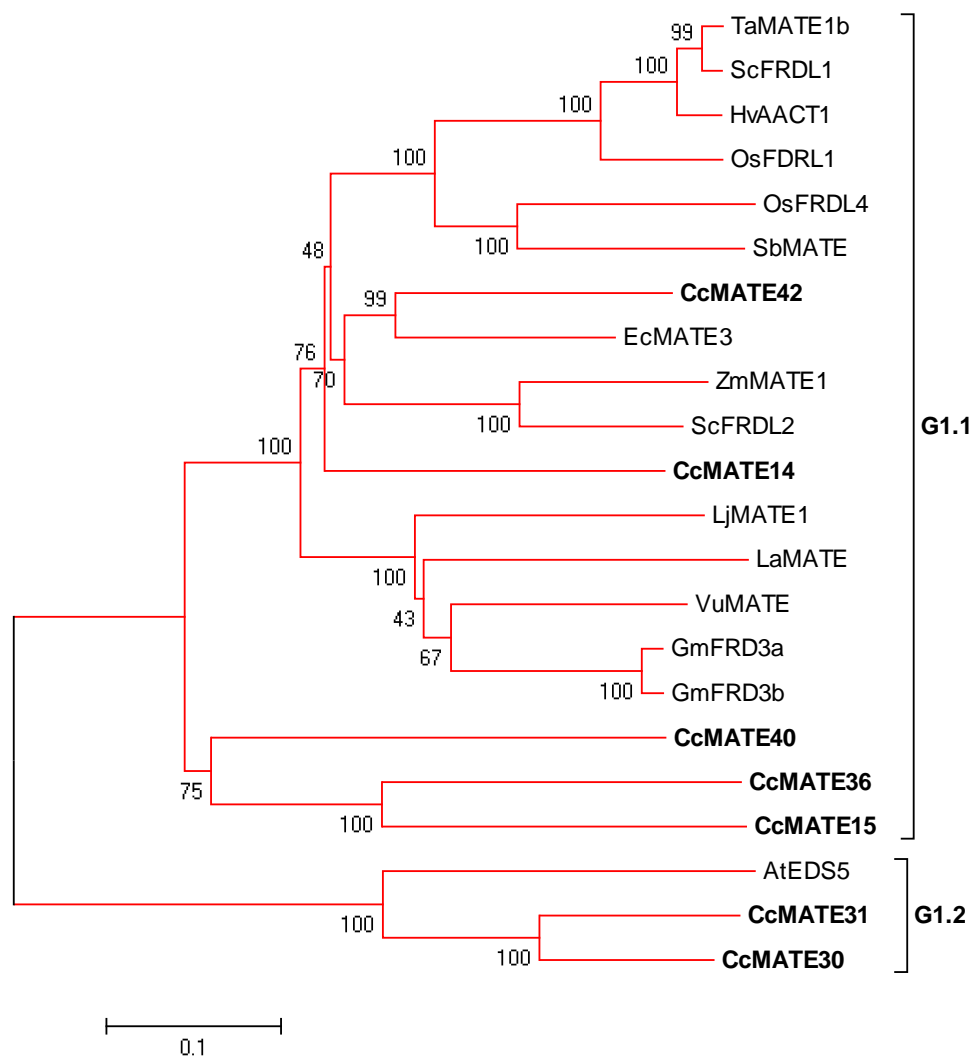
O subgrupo G1.1 engloba proteínas que intermedeiam o efluxo de citrato, que está principalmente relacionado à mecanismos de tolerância ao alumínio, absorção de fosfato e translocação de ferro, juntamente com 5 membros de *C. canephora*. O subgrupo G1.2 é composto pela proteína AtEDS5, relacionada ao transporte de ácido salicílico como parte da resposta imune vegetal desencadeada por estresse biótico e 2 membros de *C. canephora*, potenciais homólogos à este gene (Apêndice, tabela 1).

Já o subgrupo G2.1 é formado por membros da espécie em estudo alomerados com proteínas *MATE* que transportam moléculas variadas, sendo que para alguns casos não foi elucidado o substrato transportado, como para OsMATE2 e AtDTX1. O subgrupo G2.2 acomoda membros de *C. canephora* e proteínas relacionadas ao desenvolvimento vegetal, ligadas ao transporte de moléculas como ácido abscísico e ácido indol-3-acético (Apêndice, tabela 1).

Os subgrupos G3.1 e G3.4 são compostos por membros de *C. canephora* e proteínas que transportam metabólitos secundários, principalmente flavonóides. No subgrupo G3.3 são alocadas proteínas com funções diversificadas, como transporte de ferro e alcalóides e, por fim, o subgrupo G3.2

associa proteínas de *C. canephora* à proteína OsMATE1, relacionada ao desenvolvimento vegetal e resposta à patógenos (Apêndice, Tabela 1).

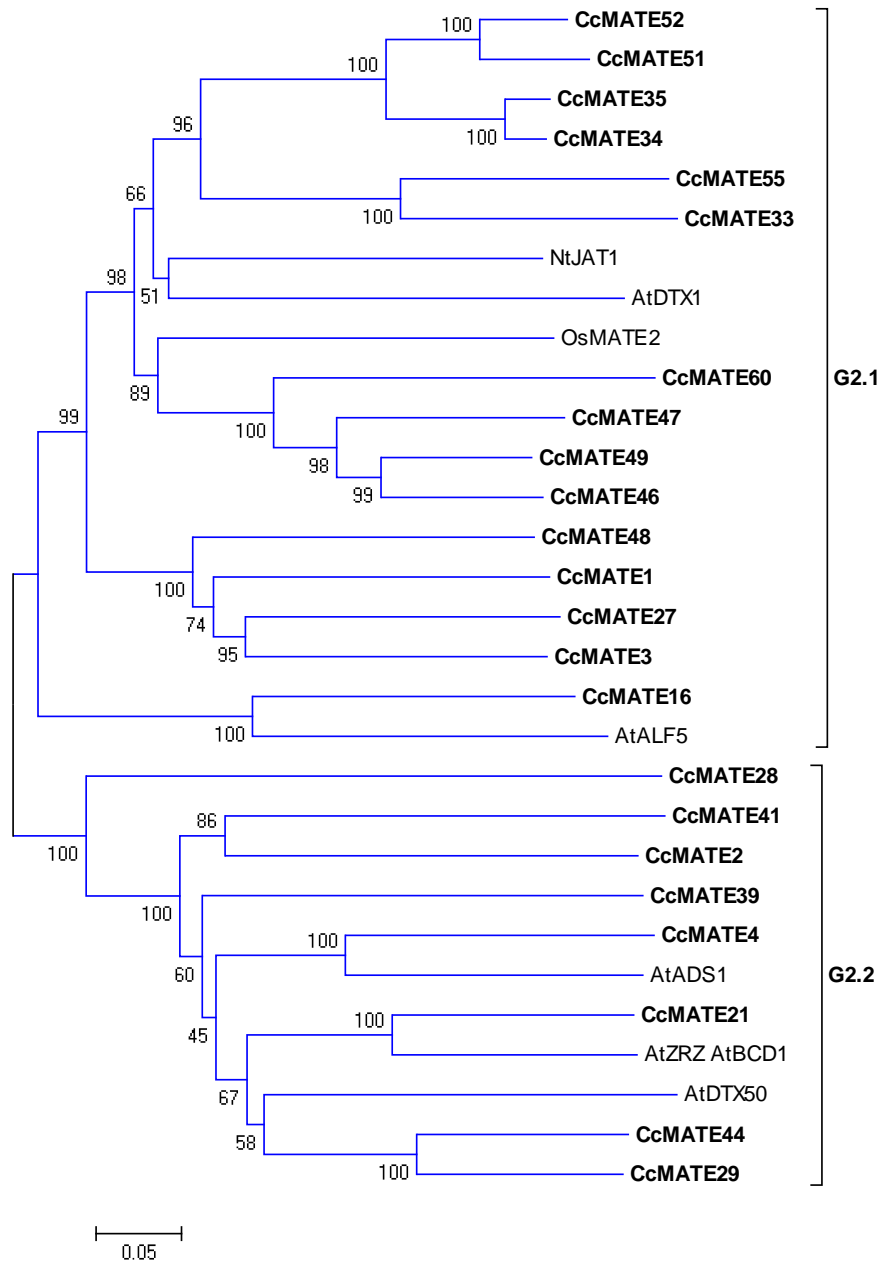
Figura 10: Subdivisões do Grupo 1 da árvore filogenética.



Legenda: G1.1 – grupo 1, subgrupo 1; G1.2 – grupo 1, subgrupo 2.

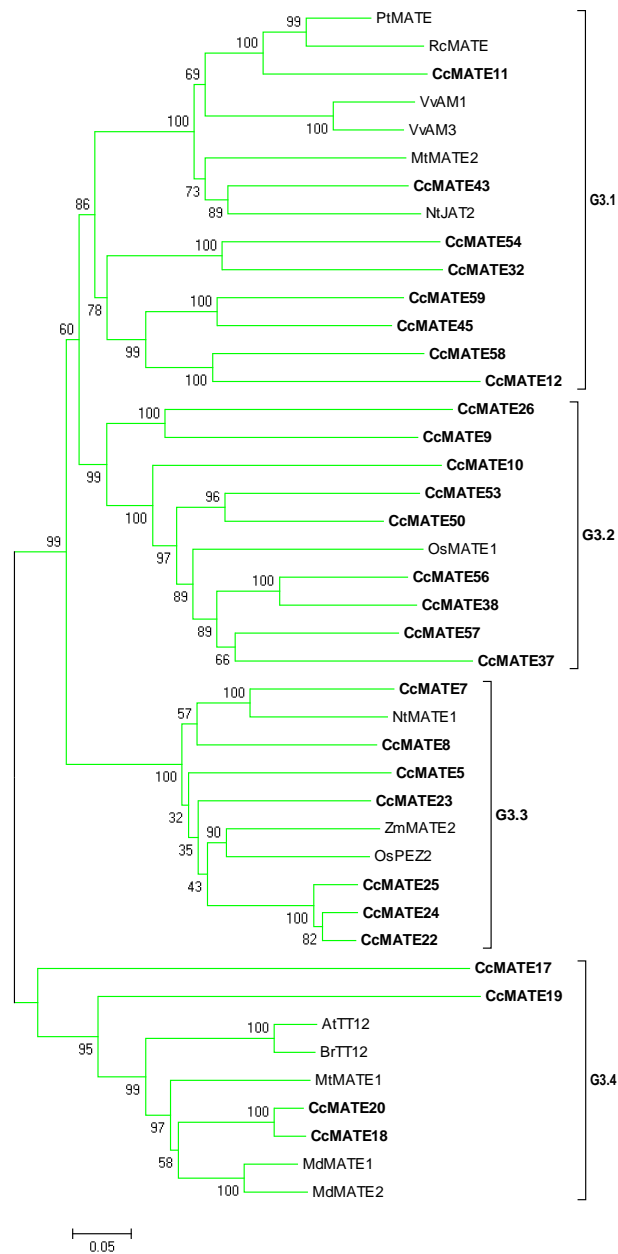
Fonte: do autor.

Figura 11: Subdivisões do Grupo 2 da árvore filogenética.



Legenda: G2.1 – grupo 2, subgrupo 1; G2.2 – grupo 2, subgrupo 2.
 Fonte: do autor.

Figura 12: Subdivisões do Grupo 3 da árvore filogenética.



Legenda: G3.1 – grupo 3, subgrupo 1; G3.2 – grupo 3, subgrupo 2; G3.3 – grupo 3, subgrupo 3; G3.4 – grupo 3, subgrupo 4.

Fonte: do autor

A distribuição dos membros de *C. canephora* entre os subgrupos é desuniforme. Alguns subgrupos aglomeram proteínas caracterizadas de forma coerente em relação à afinidade por um tipo de substrato, como o subgrupo G1.1 que agrupa apenas proteínas que intermedeiam o efluxo de citrato, G3.1 com proteínas que transportam flavonóides e alcalóides e G3.4 com proteínas caracterizadas restritas ao transporte de flavonóides (Apêndice, tabela 1). Estes subgrupos destacam-se entre os que alocaram menos *CcMATEs*.

O subgrupo que contém a maior quantidade de *CcMATEs* alocados é o G2.1, com 25% do total de *CcMATEs*, e este é composto por proteínas caracterizadas que intermedeiam o efluxo de xenobióticos (DIENER; GAXIOLA; FINK, 2001; LI *et al.*, 2002), o transporte de alcalóides (MORITA *et al.*, 2009) e substratos ainda desconhecidos que influenciam o crescimento e desenvolvimento vegetal (TIWARI *et al.*, 2014). É possível que haja proteínas MATE com afinidade por outros grupos de moléculas além dos já caracterizados e isto poderia aumentar o número de subdivisões da árvore, bem como propiciar a formação de conjuntos de proteínas mais concisos em termos de funcionalidade.

Este padrão de distribuição dos membros de *C. canephora* assemelha-se ao observado em *Glycine max* em termos de porcentagem de proteínas em cada subdivisão. Por exemplo, 6,67% das proteínas de *C. canephora* estão associadas ao subgrupo G3.4, 11,67% ao subgrupo G1.1 e 25% ao subgrupo G2.1 e, em soja, os valores percentuais respectivos para as mesmas subdivisões são 4,27%, 6,83% e 29,06%. Aparentemente, existe uma proporção de conservação comum para certas espécies vegetais em relação aos diversos tipos de proteínas da família MATE.

A conservação de padrões pode ser explicada pela hipótese de haver conformidade entre espécies vegetais em relação à susceptibilidade ao fracionamento de genes de acordo com as funções as quais estes são envolvidos.

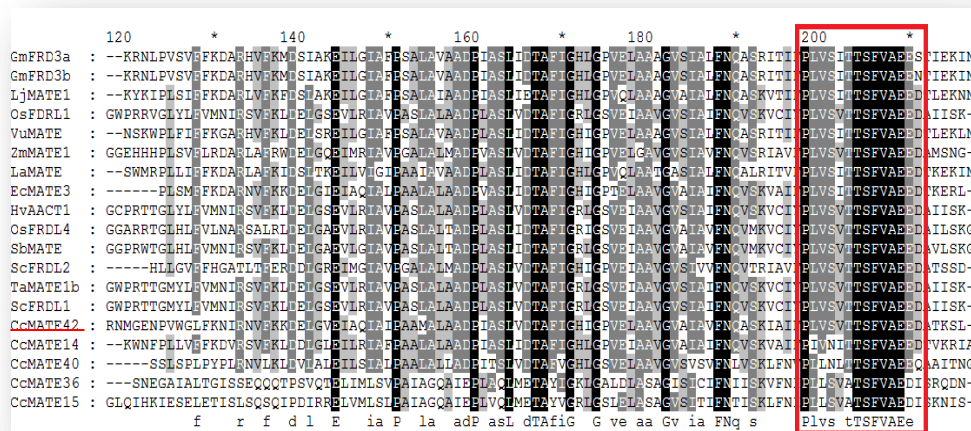
Em estudos com monocotiledôneas e dicotiledôneas das subclasses *Rosidae* e *Asteridae*, foi demonstrado que o padrão de fracionamento de parálogos é correspondente à categoria funcional e não à proximidade genética entre as espécies e, dessa forma, genes ligados às funções metabólicas tendem a apresentar menores números de cópias em relação aos genes envolvidos em processos de regulação e resposta a estímulos (CHEN, E. C. H. *et al.*, 2013).

As funções as quais os genes da família *MATE* identificados neste trabalho em *C. canephora* podem estar envolvidos são diversas e cada um destes membros é um candidato em potencial para programas de melhoramento genético do cafeeiro. Em alguns casos, é notória a importância dos membros desta família para o cultivo do cafeeiro e estes são destacados a seguir.

O subgrupo G1.1 caracteriza-se por alocar proteínas que intermedeiam o efluxo de citrato, principalmente na rizosfera, tanto para a diminuição dos efeitos tóxicos do alumínio (MAGALHAES *et al.*, 2007) e incremento na absorção de fosfato (UHDE-STONE *et al.*, 2005), quanto para o auxílio no transporte de Fe^{3+} por meio do xilema (YOKOSHO *et al.*, 2009).

As proteínas caracterizadas que tem afinidade e transportam o íon citrato compartilham duas características estruturais em comum, que não são observadas em outras proteínas *MATE*, a presença de um *loop* interno à membrana entre o segundo e o terceiro domínio transmembranar, com aproximadamente 100 pb e uma região de 14 aminoácidos conservada justamente próxima ao segundo domínio transmembranar, PLVS[V/I]TTSFVAEE[D/n/s] (LIU *et al.*, 2009). Neste subgrupo estão alocadas 5 proteínas de *C. canephora*, duas destas (*CcMATE14* e *CcMATE42*) possuem o *loop* intercelular e apenas uma, *CcMATE42*, apresenta a região conservada anteriormente citada (figura 13).

Figura 13: Destaque da região conservada entre as proteínas MATE transportadoras de citrato (retângulo vermelho), compartilhada apenas pela proteína *CcMATE42* de *C. canephora* (sublinhada em vermelho).



Fonte: do autor.

Dessa forma, o gene *CcMATE42* é um importante candidato para estudos relacionados à adaptação do cafeeiro à solos ácidos, ambiente amplamente difundido em termos globais e explorado pela cafeicultura (BOJORQUEZ-QUINTAL *et al.*, 2014).

Destacam-se também as proteínas *CcMATE7* e *CcMATE43*, dos subgrupos G3.1 e G3.3, respectivamente. Estes membros apresentam relações estreitas com as proteínas *NtMATE1* e *NtJAT2*, que são fundamentais para o transporte e acúmulo de alcalóides, especialmente nicotina, em *Nicotiana tabacum*. A proteína *NtMATE1* intermedeia o acúmulo de nicotina em células das raízes de *N. tabacum* e, mediante uma cascata de sinais desencadeada por herbivoria, que envolvem o ácido jasmônico, essa substância é transportada até

as células das folhas, onde as proteínas NtJAT1/2 mediam o acúmulo no vacúolo (SHITAN *et al.*, 2014).

A similaridade à nível proteico entre as proteínas NtMATE1 e CcMATE7 é de 75% e entre as proteínas NtJAT2 e CcMATE43, 68%. Os genes respectivos à estas proteínas podem, portanto, estar relacionados ao transporte de alcalóides em *C. canephora*, como a cafeína, o que enfatiza a eminência de seu estudo em detrimento da importância desta substância para a cultura do café.

Além desses candidatos, vale ressaltar o potencial das proteínas CcMATE17, CcMATE19, CcMATE18 e CcMATE20, como transportadoras de flavonóides em *C. canephora*, visto os valores percentuais de similaridade em relação às proteínas caracterizadas deste subgrupo, com destaque para as duas últimas (tabela 2).

Tabela 2: Distribuição de valores percentuais de similaridade entre proteínas do subgrupo G3.4

CcMATEs	Proteínas do subgrupo G3.4				
	AtTT12	BrTT12	MtMATE1	MdMATE1	MdMATE2
CcMATE17	45%	43%	43%	48%	47%
CcMATE19	51%	50%	50%	50%	52%
CcMATE18	73%	72%	77%	80%	78%
CcMATE20	72%	72%	75%	79%	75%

Todas as proteínas deste subgrupo, apresentadas na tabela 2, estão envolvidas com o acúmulo de pró-antocianinas nos frutos (FRANK *et al.*, 2011; MARINOVA *et al.*, 2007; ZHAO; DIXON, 2010). É importante destacar que o café é o produto que mais contribui para a ingestão de flavonóides na dieta brasileira e também é relevante em termos mundiais (KOEHNLEIN *et al.*, 2014), fato que reitera a pertinência de estudos relacionados à estes candidatos em *C. canephora*.

4. CONCLUSÃO

A partir da execução deste trabalho a família gênica *Multi drug and toxic compound extrusion* foi parcialmente elucidada em *Coffea canephora*, com a identificação e validação da predição gênica de 60 membros, fato que contribui para o aprimoramento do conhecimento em relação à esta família por ser o primeiro estudo realizado em uma espécie da subclasse *Asterideae*, bem como em uma planta lenhosa.

As proteínas estudadas distribuem-se em diversos grupos, possivelmente relacionados à variadas funções no metabolismo vegetal e foi possível destacar alguns genes que podem estar envolvidos em aspectos importantes para o cultivo do cafeeiro e consumo do café, como a adaptação à solos ácidos e qualidade nutricional da bebida. Estes candidatos são pertinentes como objetos de estudo para programas de melhoramento, visto a ampla utilização desta espécie para este fim e a aplicabilidade potencial destas proteínas.

REFERÊNCIAS

BOJORQUEZ-QUINTAL, J. E. D.; SANCHEZ-CACH, L. A.; KUGONZALEZ, A.; DE LOS SANTOS-BRIONES, C.; MEDINA-LARA, M. D.; ECHEVARRIA-MACHADO, I.; MUNOZ-SANCHEZ, J. A.; SOTOMAYOR, S.; ESTEVEZ, M. M. Differential effects of aluminum on in vitro primary root growth, nutrient content and phospholipase C activity in coffee seedlings (*Coffea arabica*). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 134, p. 39-48, May 2014.

CARVALHO, G. *et al.* Back to Acid Soil Fields: The Citrate Transporter SbMATE Is a Major Asset for Sustainable Grain Yield for Sorghum Cultivated on Acid Soils. **G3-Genes Genomes Genetics**, v. 6, n. 2, p. 475-484, Feb 2016.

CHEN, E. C. H.; NAJAR, C.; ZHENG, C. F.; BRANDTS, A.; LYONS, E.; TANG, H. B.; CARRETERO-PAULET, L.; ALBERT, V. A.; SANKOFF, D. The dynamics of functional classes of plant genes in rediploidized ancient polyploids. **Bmc Bioinformatics**, v. 14, p. 10, Oct 2013.

CHEN, L. *et al.* Identification and Expression Analysis of MATE Genes Involved in Flavonoid Transport in Blueberry Plants. **Plos One**, v. 10, n. 3, Mar 17 2015.

DIENER, A. C.; GAXIOLA, R. A.; FINK, G. R. Arabidopsis ALF5, a multidrug efflux transporter gene family member, confers resistance to toxins. **Plant Cell**, v. 13, n. 7, p. 1625-1637, Jul 2001.

FRANK, S.; KECK, M.; SAGASSER, M.; NIEHAUS, K.; WEISSHAAR, B.; STRACKE, R. Two differentially expressed MATE factor genes from apple complement the Arabidopsis transparent testa12 mutant. **Plant Biology**, v. 13, n. 1, p. 42-50, Jan 2011.

HVORUP, R. N.; WINNEN, B.; CHANG, A. B.; JIANG, Y.; ZHOU, X.; SAIER JR, M. H. The multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide (MOP) exporter superfamily. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, p.799-813, 2003.

KOEHNLEIN, E. A.; BRACHT, A.; NISHIDA, V. S.; PERALTA, R. M. Total antioxidant capacity and phenolic content of the Brazilian diet: a real scenario. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 65, p. 293-298, 2014

KOSTIC, L. *et al.* Liming of anthropogenically acidified soil promotes phosphorus acquisition in the rhizosphere of wheat. **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, n. 3, p. 289-298, Apr 2015.

LI, L. G. *et al.* Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 7, p. 5360-5368, Feb 2002.

LIU, J.; MAGALHAES, J. V.; SHAFF, J.; KOCHIAN, L. V. Aluminium-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer Arabidopsis aluminium tolerance. **The Plant Journal**, v. 57, p. 389-399, 2009.

LIU, J. *et al.* Genome-wide analysis of MATE transporters and expression patterns of a subgroup of MATE genes in response to aluminum toxicity in soybean. **Bmc Genomics**, v. 17, Mar 11 2016.

MAGALHAES, J. V.; LIU, J.; GUIMARAES, C. T.; LANA, U. G. P.; ALVES, V. M. C.; WANG, Y. H.; SCHAFFERT, R. E.; HOEKENGA, O. A.; PINEROS, M. A.; SHAFF, J. E.; KLEIN, P. E.; CARNEIRO, N. P.; COELHO, C. M.; TRICK, H. N.; KOCHIAN, L. V. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, v. 39, n. 9, p. 1156-1161, Sep 2007.

MAGALHAES, J. V. How a microbial drug transporter became essential for crop cultivation on acid soils: aluminium tolerance conferred by the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family. **Annals of Botany**, v. 106, n. 1, p. 199-203, Jul 2010.

MARINOVA, K.; POURCEL, L.; WEDER, B.; SCHWARZ, M.; BARRON, D.; ROUTABOUL, J.-M.; DEBEAUJON, I.; KLEIN, M. The Arabidopsis MATE transporter TT12 acts as a vacuolar flavonoid/H⁺-antiporter active in proanthocyanidin-accumulating cells of the seed coat. **Plant Cell**, v. 19, n. 6, p. 2023-2038, Jun 2007.

MORITA, Y.; KODAMA, K.; SHIOTA, S.; MINE, T.; KATAOKA, A.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIYA, T. NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, p. 1778-1782, 1998

MORITA, M.; SHITAN, N.; SAWADA, K.; VAN MONTAGU, M. C. E.; INZE, D.; RISCHER, H.; GOOSSENS, A.; OKSMAN-CALDENTY, K.-M.; MORIYAMA, Y.; YAZAKI, K. Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *Nicotiana tabacum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 7, p. 2447-2452, Feb 17 2009.

NEI, M.; KUMAR, S. Molecular Evolution and Phylogenetics. **Oxford University Press**, 2000.

NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS, H.B.Jr. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distribuído pelo autor, 1997.

OMOTE, H.; HIASA, M.; MATSUMOTO, T.; OTSUKA, M.; MORIYAMA, Y. The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic

organic cations. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 11, p. 587-593, Nov 2006.

PEREZ-DIAZ, R. *et al.* VvMATE1 and VvMATE2 encode putative proanthocyanidin transporters expressed during berry development in *Vitis vinifera* L. **Plant Cell Reports**, v. 33, n. 7, p. 1147-1159, Jul 2014.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SHITAN, N.; MINAMI, S.; MORITA, M.; HAYASHIDA, M.; ITO, S.; TAKANASHI, K.; OMOTE, H.; MORIYAMA, Y.; SUGIYAMA, A.; GOOSSENS, A.; MORIYASU, M.; YAZAKI, K. Involvement of the Leaf-Specific Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE) Transporter Nt-JAT2 in Vacuolar Sequestration of Nicotine in *Nicotiana tabacum*. **Plos One**, v. 9, n. 9, Sep 30 2014.

TAKANASHI, K. *et al.* LjMATE1: A Citrate Transporter Responsible for Iron Supply to the Nodule Infection Zone of *Lotus japonicus*. **Plant and Cell Physiology**, v. 54, n. 4, p. 585-594, Apr 2013.

TAKANASHI, K.; SHITAN, N.; YAZAKI, K. The multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family in plants. **Plant Biotechnology**, v. 31, n. 5, p. 417-430, Dec 2014.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729.

TIWARI, M. *et al.* Expression of OsMATE1 and OsMATE2 alters development, stress responses and pathogen susceptibility in *Arabidopsis*. **Scientific Reports**, v. 4, Feb 4 2014.

TUSNÁDY, G. E.; SIMON, I. Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. **Journal of Molecular Biology**, v. 283, p. 489-506, 1998.

TUSNADY, G.E.; SIMON, I. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. **Bioinformatics**, v. 17, p. 849-850, 2001.

UHDE-STONE, C.; LIU, J. Q.; ZINN, K. E.; ALLAN, D. L.; VANCE, C. P. Transgenic proteoid roots of white lupin: a vehicle for characterizing and silencing root genes involved in adaptation to P stress. **Plant Journal**, v. 44, n. 5, p. 840-853, Dec 2005.

VEITIA, R. A. Paralogs in polyploids: one for all and all for one? **The plant cell**, v. 17, p. 4-11, 2005.

WANG, X. Y.; PATERSON, A. H. Gene Conversion in Angiosperm Genomes with an Emphasis on Genes Duplicated by Polyploidization. **Genes**, v. 2, n. 1, p. 1-20, Mar 2011.

YOKOSHO, K.; YAMAJI, N.; UENO, D.; MITANI, N.; MA, J. F. OsFRDL1 Is a Citrate Transporter Required for Efficient Translocation of Iron in Rice. **Plant Physiology**, v. 149, n. 1, p. 297-305, Jan 2009.

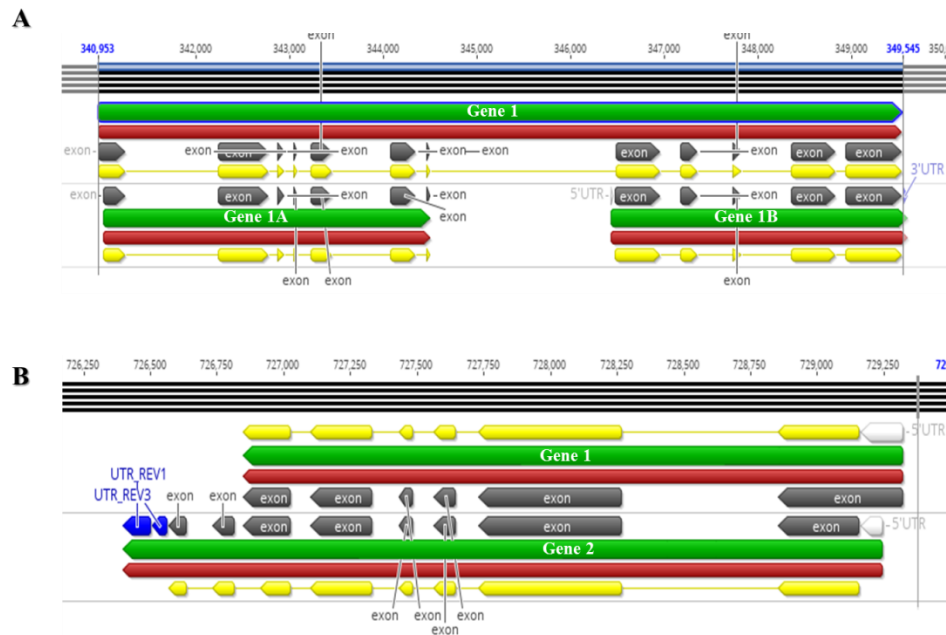
ZHAO, J.; DIXON, R. A. MATE Transporters Facilitate Vacuolar Uptake of Epicatechin 3 '-O-Glucoside for Proanthocyanidin Biosynthesis in *Medicago truncatula* and *Arabidopsis* (vol 21, pg 2323, 2009). **Plant Cell**, v. 22, n. 3, p. 991-991, Mar 2010.

Tabela 1: Descrição das proteínas da família MATE utilizadas neste estudo, quanto ao número de acesso, espécie originária e referências relevantes.

Nome	Número de acesso	Espécie	Referência
AtTT12	At3g59030	<i>Arabidopsis thaliana</i>	DEBEAUJON <i>et al.</i> , 2001, MARINOVA <i>et al.</i> , (2007), ZHAO AND DIXON (2009)
BrTT12	ACJ36213	<i>Brassica rapa</i>	CHAI <i>et al.</i> , (2009)
MtMATE1	FJ858726	<i>Medicago truncatula</i>	ZHAO AND DIXON (2009)
NtMATE1	AB286961	<i>Nicotiana tabacum</i>	SHOJI <i>et al.</i> , (2009)
PtMATE	XP_002302594	<i>Populus trichocarpa</i>	Submissão direta
RcMATE1	XP_002532702	<i>Ricinus communis</i>	Submissão direta
VvAM1	FJ264202	<i>Vitis vinifera</i>	GOMEZ <i>et al.</i> , (2009), GOMEZ <i>et al.</i> , (2011)
VvAM3	FJ264203	<i>Vitis vinifera</i>	GOMEZ <i>et al.</i> , (2009), GOMEZ <i>et al.</i> , (2011)
AtALF5	At3g23560	<i>Arabidopsis thaliana</i>	DIENER <i>et al.</i> , (2001)
AtDTX1	At2g04070	<i>Arabidopsis thaliana</i>	LI <i>et al.</i> , (2002)
Nt-JAT1	AM991692	<i>Nicotiana tabacum</i>	MORITA <i>et al.</i> , (2009)
AtADS1	At4g29140	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SUN <i>et al.</i> (2011), LI <i>et al.</i> , (2014), WANG <i>et al.</i> , (2015)
AtBCD1/AtZRZ	At1g58340	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BURKO <i>et al.</i> , (2011), SEO <i>et al.</i> , (2012), Wang <i>et al.</i> , (2015)
AtEDS5	At4g39030	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NAWRATH <i>et al.</i> (2002), ISHIHARA <i>et al.</i> , (2008), SERRANO <i>et al.</i> , (2013), YAMASAKI <i>et al.</i> , (2013)
BoMATE	KF031944	<i>Brassica oleracea</i>	WU <i>et al.</i> , (2014)
EcMATE1	AB725912	<i>Eucalyptus</i>	SAWAKI <i>et al.</i> , (2013)

		<i>camaldulensis</i>	
GmFRD3b	EU591741	<i>Glycine max</i>	ROGERS <i>et al.</i> , (2009)
HvAACT1	BAF75822	<i>Hordeum vulgare</i>	FURUKAWA <i>et al.</i> , (2007), FUJII <i>et al.</i> , (2012); ZHOU <i>et al.</i> , (2013)
OsFRDL4	Os01g0919100	<i>Oryza sativa</i>	YOKOSHO <i>et al.</i> , (2011)
SbMATE	ABS89149	<i>Sorghum bicolor</i>	MAGALHAES <i>et al.</i> , (2007), SIVAGURU <i>et al.</i> , (2013), CANIATO <i>et al.</i> , (2014)
ScFRDL1	AB571881	<i>Secale cereale</i>	YOKOSHO <i>et al.</i> , (2010)
ScFRDL2	AB571882	<i>Secale cereale</i>	YOKOSHO <i>et al.</i> , (2010)
TaMATE1B	KC152457	<i>Triticum aestivum</i>	TOVKACH <i>et al.</i> , (2013)
ZmMATE1	FJ015156.1	<i>Zea mays</i>	MARON <i>et al.</i> , (2010), MARON <i>et al.</i> , (2013)
OsMATE1	AK242068	<i>Oryza sativa</i>	TIWARI <i>et al.</i> , 2014
NtJAT2	AB922128	<i>Nicotiana tabacum</i>	SHITAN <i>et al.</i> , 2014
MdMATE1	GU064954	<i>Malus domestica</i>	FRANK <i>et al.</i> , 2011
MdMATE2	GU064956	<i>Malus domestica</i>	FRANK <i>et al.</i> , 2011
GmFRD3a	EU591739	<i>Glycine max</i>	ROGERS <i>et al.</i> , 2009
LjMATE	AB649311	<i>Lupinus japonicus</i>	TAKANASHI <i>et al.</i> , 2013
OsPEZ2	AK102204	<i>Oryza sativa</i>	BASHIR <i>et al.</i> , 2011
LaMATE	AY631874	<i>Lupinus albus</i>	UHDE-STONE <i>et al.</i> , 2005
AtDTX50	At5g52050	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ZHANG <i>et al.</i> , 2014
EcMATE3	AB725914	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	SAWAKI <i>et al.</i> , 2013
VuMATE	KM090855	<i>Vignia umbrelata</i>	YANG <i>et al.</i> , 2011
ZmMATE2	FJ873684	<i>Zea mays</i>	MARON <i>et al.</i> , 2010; MARON <i>et al.</i> , 2013

Figura 1: Exemplos de correções na predição gênica de candidatos à membros da família *MATE* em *Coffea canephora*



Legenda: A- Divisão da predição antiga (Gene 1) em dois novos genes (Gene 1A e Gene 1B); B- Acréscimo de dois éxons e região 3' não-traduzida à predição antiga (Gene 1), gerando um novo gene maior (Gene 2).

Fonte: do autor.

CAPÍTULO 3: Caracterização dos genes homeólogos *CaMATE_C* e *CaMATE_E* envolvidos em mecanismos de tolerância ao alumínio em *Coffea arabica*

RESUMO

Dentre os fatores potenciais para propiciar avanços para a cafeicultura brasileira, a adaptação destas espécies à solos ácidos pode ser destacada pelo fato deste ser um dos ambientes mais explorados para o cultivo do cafeeiro e predominante em termos proporcionais entre os solos aráveis do planeta. A acidez destes solos potencializam a indisponibilidade de fosfatos e os efeitos tóxicos do alumínio e o desenvolvimento de cultivares tolerantes à estes fatores pode ser economicamente e sustentavelmente vantajoso em relação aos métodos de correção aplicados atualmente, que baseiam-se na modificação deste ambiente. Pode-se destacar algumas proteínas, membros da família *Multi drug and toxic compound extrusion (MATE)*, que podem favorecer a tolerância à estas condições. Visto que a espécie *Coffea arabica* é a mais explorada entre o gênero *Coffea* para fins produtivos e que esta é caracterizada como anfidiplóide, é importante distinguir a contribuição dos genes homeólogos derivados de cada subgenoma para esta característica, afim de nortear os programas de melhoramento genético. Portanto, a partir deste trabalho, objetivou-se caracterizar funcionalmente o membro da família gênica *MATE* relacionado à tolerância ao alumínio em *Coffea arabica*, através de análises genômicas, transcriptômicas e fenotípicas, bem como distinguir a contribuição dos genes homeólogos derivados de cada subgenoma neste aspecto. A partir do candidato elucidado em *C. canephora* foi possível identificar os genes homeólogos em *C. arabica* relacionados aos subgenomas derivados de *C. canephora* (*CaMATE_C*) e *C. eugenioides* (*CaMATE_E*). O ensaio em hidroponia conduzido para avaliar o efeito da toxicidade do alumínio possibilitou a constatação de sintomas anatômicos diferenciais em plantas submetidas ou não ao tratamento, porém não culminou em diferenças nutricionais em tecidos foliares. Para analisar a influência específica dos genes nesta característica, foram realizadas análises por RT-qPCR e espectrometria de massas. A expressão do gene *CaMATE_E* foi influenciada pelo estresse causado por alumínio e o perfil de expressão pôde ser comparado à exsudação do ânion citrato. A hipótese de expressão diferencial entre os homeólogos foi confirmada e vale ressaltar que estes apresentam diferenças estruturais que podem estar relacionadas à elementos cis-regulatórios, porém não foi observada a presença destes elementos de forma específica ligada à tolerância ao alumínio. Em conclusão, foi caracterizado o membro da família *MATE* possivelmente relacionado com a adaptação de espécies do gênero *Coffea* à solos ácidos, conhecimento este, relevante para os avanços genéticos necessários para aprimorar o cultivo do cafeeiro neste ambiente.

Palavras-chave: RT-qPCR; solos ácidos; citrato; melhoramento genético

ABSTRACT

Among the potential factors to improve Brazilian coffee crop cultivation, the adaptation of these species to acid soils can be highlighted, being this environment one of the most explored for this crop and prevalent in proportional terms among the arable land of the planet. This soil acidity potentializes the phosphates unavailability and the toxic effects of aluminium, so the development of tolerant crops can be sustainable and economically useful in relation to the actual methods to overcome these problems, that are based on environmental modifications. Some proteins, members of the *Multi drug and toxic compound extrusion* family, can be highlighted by favoring the tolerance to these conditions. By the fact that *Coffea arabica* is the most exploited species on *Coffea* genus for productive aims and that it is an amphidiploid plant, it is important to analyze the differential contribution by each homeolog gene for these characteristics, to guide breeding programs. So, through this work, the objective was to functionally characterize the *MATE* family member related to *Coffea arabica* aluminium tolerance, through genomic, transcriptomic and phenotypic analysis, besides of the distinguishment of homeologs contribution. By the known putative *MATE* gene *CcMATE42*, elucidated on *C. canephora* it was possible to identify the homeologs on *C. arabica* related to subgenomes derived from the *C. canephora* ancestor (*CaMATE_C*) and *Coffea eugenioides* (*CaMATE_E*). The hydroponic experiment conducted to analyze the aluminium effects allowed the findings of anatomical differential effects on plants exposed to aluminium, but didn't result on nutritional effects on leaves. To analyze the specific influence of the genes on this scenario, RT-qPCR and Mass-spectrometry assays were done. The *CaMATE_E* gene expression was affected by aluminium stress and this expression profile was compared to citrate release. The hypothesis of differential expression between homeologs was confirmed and it is important to mention that these genes have structural differences that may be associated to cis-regulatory elements, but some specific elements related to aluminium tolerance were not predominant in one gene in comparison to the other. In conclusion, the *MATE* member possibly related to the acid soil adaptation of *Coffea* species was characterized and this knowledge is relevant for the genetic advances to improve the coffee crop cultivation on this environment.

Keywords: RT-qPCR; acid soils; citrate; genetic improvement

1. INTRODUÇÃO

A cafeicultura brasileira destaca-se como importante atividade econômica para o país, com relevância no quadro de exportações (MAPA/SPA/DCRR, 2015) e predominância na produção mundial (CeCAFE, 2016). Além disso, o café faz parte da dieta diária da população e agrega valor nutricional em termos de compostos bioativos (KOEHNLEIN *et al.*, 2014).

Um dos desafios para a manutenção deste panorama, ou mesmo para o incremento da produtividade sem a geração de danos ambientais, está relacionado ao cultivo do cafeeiro em áreas marginalizadas em termos de fertilidade, como a região do cerrado, caracterizada por solos ácidos e baixa disponibilidade de fósforo, além de outros nutrientes (LOPES e COX, 1977).

Os índices altos de saturação de alumínio diminuem a disponibilidade de fosfato e são barreiras químicas para o crescimento e desenvolvimento das raízes, reduzindo a captação de água e nutrientes essenciais (LOPES e COX, 1977). A deposição de calcário é uma prática adquirida para minimizar estes problemas, porém para que haja benefícios em profundidade são necessários métodos de incorporação que podem gerar impactos ambientais (LOPES e GUILHERME, 2016), além de inapropriados para o cultivo de espécies perenes.

Neste contexto, é pertinente a compreensão dos mecanismos de adaptação das plantas à este tipo de ambiente, principalmente, em espécies cultiváveis. Em relação ao alumínio, podem ser ressaltadas a estratégia de tolerância, que consiste na incorporação do alumínio pelas plantas de modo complexado e compartimentalizado nos vacúolos de células, normalmente, das folhas e as estratégias de exclusão, baseadas na liberação de compostos orgânicos no ápice radicular para a complexação dos íons Al^{3+} e supressão de seus efeitos tóxicos (KOCHIAN *et al.*, 2015).

Dentre as estratégias de exclusão, o mecanismo de efluxo do ânion citrato mediado por proteínas de membrana da família *Multi drug and toxic compound extrusion* (MATE) é um importante objeto de estudo em detrimento dos percalços relativos ao cultivo do cafeeiro em solos ácidos, já que a exsudação deste composto minimiza os efeitos tóxicos do alumínio e pode estar envolvida com a absorção de fosfato (KOSTIC *et al.*, 2015). Além disso, já foi demonstrado o efeito positivo de genes dessa família em relação ao incremento da produção de grãos neste tipo de ambiente (CARVALHO, G., JR. *et al.*, 2016).

Há demanda de estudos moleculares relacionados à estes mecanismos de exclusão no gênero *Coffea*, pois isto pode explicar os níveis diferentes de tolerância entre as variedades (MENDONÇA *et al.*, 2007) e dar respaldo ao desenvolvimento de estratégias de melhoramento.

Para a compreensão destes processos moleculares em *Coffea arabica*, é interessante considerar que, pelo fato desta espécie ser alotetraplóide, os genes homeólogos provenientes dos dois subgenomas das espécies ancestrais ao evento de poliploidização (*Coffea canephora* e *Coffea eugenioides*) podem contribuir de maneira diferencial para o caráter (COMBES *et al.*, 2015).

A partir destas constatações, objetivou-se com este trabalho, elucidar a influência de um gene da família *MATE* candidato em potencial a estar envolvido na tolerância de *Coffea arabica* ao alumínio e, para tanto, foram estudados à nível de genômica estrutural e funcional os homeólogos deste gene provenientes dos dois subgenomas citados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Montagem do experimento em hidroponia

Para a montagem do experimento, foram utilizadas mudas da variedade *Coffea arabica*, cv. Catuaí vermelho IAC 99, provenientes de viveiro comercial localizado no município de Lavras, Minas Gerais.

Plantas com cerca de cinco pares de folhas foram retiradas do substrato e as raízes lavadas com água destilada. Estas plantas foram, então acondicionadas em recipientes plásticos opacos com solução de Hoagland à $\frac{1}{4}$ da concentração total de sais, em aeração constante por cerca de 15 dias. O pH da solução de adaptação (tabela 3) foi mantido à 5,5.

Após este período, foram selecionadas plantas com desenvolvimento homogêneo e estas foram submetidas ou não à exposição ao alumínio, fornecido na forma de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, na concentração $1,66 \text{ mmol.L}^{-1}$, de acordo com experimentos prévios. Nesta etapa, a solução foi modificada quanto à concentração de fósforo ($0,25 \text{ mmol.L}^{-1}$ de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) e ao pH, o qual foi ajustado para 4,5 e mantido neste valor mediante correções diárias a partir de adição de HCl.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 11 tratamentos, 5 tempos de coleta (6, 12, 24, 48 e 96 horas após o início do tratamento) e duas condições, com e sem adição $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, além do controle. Para cada tratamento foram estabelecidas três repetições biológicas, cada uma constituída por um *pool* de 3 plantas, acondicionadas em um recipiente opaco com 1,5 L da solução adaptada para o experimento, em aeração constante controlada por bomba pressurizada durante todo o período de duração do experimento.

Para o controle e para cada tempo de exposição ao tratamento, foram coletadas as raízes (cerca de 2 cm acima do ápice radicular) das três plantas que compunham cada *pool* para extração de RNA e cerca de 50 mL da solução à qual as plantas estavam acondicionadas para análises de exsudação do ânion citrato. Foram coletadas folhas para a análise nutricional a partir de tecidos foliares das plantas do controle e dos tratamentos de 96 horas com exposição ou não ao alumínio e, além disso, raízes das plantas do controle e das que foram expostas ao alumínio por 96 horas.

As raízes coletadas para extração de RNA foram imediatamente acondicionadas em nitrogênio líquido.

As mesmas soluções estoque, componentes da solução geral, foram utilizadas para todo o experimento. O sistema foi montado em estufa galvanizada, com umidade, temperatura e incidência luminosa controladas e cada repetição biológica foi estabelecida em dias diferentes.

Tabela 3: Descrição da solução de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950) adaptada.

NUTRIENTES	CONCENTRAÇÃO
KNO ₃	1,845 mmol/L
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1 mmol/L
NH ₄ H ₂ PO ₄	0,5 mmol/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 mmol/L
KCl	0,0005 mmol/L
H ₃ BO ₃	0,025 mmol/L
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,002 mmol/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,002 mmol/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0001 mmol/L
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,0001 mmol/L
Fe(Na)EDTA	0,01 mmol/L

2.2. Análise nutricional por tecido foliar e anatomia

As folhas coletadas para a análise foliar foram acondicionadas em sacos de papel, secas em estufa e moídas em moinho de bolas. A análise dos macro e micronutrientes foram realizadas de acordo com procedimentos pré-estabelecidos (MALAVOLTA *et al.*, 1997).

Para as análises anatômicas, os ápices radiculares foram fixados em solução FAA 70% (5% de formaldeído, 5% de etanol 70% e 90% de ácido acético glacial) durante 72 horas e posteriormente armazenadas em solução de etanol 70% até o momento da realização da análises. Para tanto, as amostras foram desidratadas em série etílica, de etanol 70% à etanol 100% e após isso infiltradas em solução de etanol e resina histológica (50%), por cerca de 12 horas.

Em seguida, as raízes foram submetidas à incubação em resina pura por 48 horas e, posteriormente emblocadas em resina Leica de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras foram seccionadas em espessura de 5 μ m em micrótomo rotativo e coradas com Azul de Evans. Por fim, as lâminas foram montadas e visualizadas em microscópio fotônico *Axio Scope.A1 (Zeiss)* acoplado à câmera.

2.3. Quantificação de citrato exsudado

Amostras de solução coletadas dos tratamentos de 6 horas sem exposição ao alumínio, 48 horas com exposição ao alumínio e 96 horas com exposição ao alumínio foram injetadas por infusão direta em espectrômetro de

massas micrOTOF Q-II (Bruker). A análise foi realizada em modo negativo, sendo as voltagens selecionadas para análise: end plate: -500V; capilar: +3500V; tubo de voo: 8600V. Para a ionização, a pressão do nebulizador foi ajustada para 0,5 Bar e o gás de secagem com fluxo de 5L/min a 180°C.

Os valores de intensidade m/z foram utilizados para a comparação entre os tratamentos referidos.

2.4. Extração de RNA, análise da integridade e tratamento com DNase

As amostras de raízes coletadas, como descrito em 2.1, para extração de RNA foram maceradas individualmente e submetidas ao protocolo de extração de acordo com as especificações do fabricante do reagente *Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen)*, com alguns ajustes relativos ao estado de oxidação de cada amostra.

Após a extração, 1µL da amostra foi submetido à eletroforese em gel de agarose à 1%, afim de possibilitar análise da integridade do RNA extraído. A eletroforese foi procedida por 30 minutos, sob voltagem de 100V. As amostras nas quais as duas subunidades do RNA ribossomal estavam nítidas, separadas e proporcionais foram consideradas íntegras.

Os materiais aprovados quanto à integridade do RNA foram quantificados em espectrofotômetro *NanoVue™ (GE-Healthcare Life Sciences)* em comprimento de onda de 260nm e analisados quanto aos parâmetros de qualidade baseados nas relações entre as absorbâncias nos comprimentos de onda de 260/280 nm e 260/230 nm para a verificação dos níveis de contaminação por proteínas, compostos fenólicos e sais, principalmente. As amostras que apresentaram valores entre 1,8 e 2,2 para estas relações foram consideradas de qualidade.

Por fim, as amostras de RNA íntegras e de qualidade foram tratadas com o kit *Turbo DNA-free* (Ambion) de acordo com as especificações do fabricante, para a eliminação do resíduo de DNA.

2.5. PCR *Housekeeping* e RT-PCR

Afim de verificar a eliminação dos vestígios de DNA contaminante nas amostras de RNA, estas foram submetidas à uma PCR com primers para o gene de referência PP2A (Apêndice, tabela 1), com as seguintes especificações quanto à ciclagem: 95 °C por 2 minutos; 95 °C por 20 segundos, 60 °C 20 segundos e 72 °C por 20 segundos (repetidos 35 vezes); 72 °C por 5 minutos e temperatura de *HOLD* de 12 °C.

Após, este material foi submetido à eletroforese em gel de agarose à 2%, por 40 minutos à 80V. As amostras nas quais não constatou-se amplificação foram consideradas aptas para o prosseguimento.

Diante disso, a conversão das amostras de RNA em cDNA foi efetuada a partir do kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), seguindo as orientações do fabricante quanto à estequiometria da reação e às especificações da ciclagem.

2.6. Desenho dos primers, análise da eficiência e análise da estabilidade dos primers para os genes de referência

Os primers foram elaborados com auxílio da ferramenta *OligoPerfect™ Designer* (Thermo Fisher Scientific) (<https://tools.thermofisher.com/content.cfm?pageid=9716&icid=fr-oligo-6?CID=fl-oligoperfect>) e os parâmetros de qualidade de acordo com as especificações da técnica de qPCR foram avaliados por intermédio do software

OligoAnalyzer3.1 (Integrated DNA Technologies) (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Quanto aos primers para os genes *CaMATE_C* e *CaMATE_E*, estes foram desenhados manualmente, afim de utilizar um *SNP* entre estas duas sequências como última base na extremidade 3' do primer *forward*.

A análise da eficiência de amplificação foi realizada individualmente para cada primer em cada amostra do experimento a partir do software *LinRegPCR* (RUIJTER *et al.*, 2009; TUOMI *et al.*, 2010).

Foram sintetizados cinco primers para genes de referência em *Coffea arabica* (Apêndice, tabela 1) e dois destes foram selecionados para normalizar os resultados dos ensaios de qPCR a partir do ranking gerado pela ferramenta *RefFinder* (<http://fulxie.0fees.us/?i=1>), de acordo com a análise de estabilidade.

2.7. Análise da expressão gênica por qPCR

As análises da expressão gênica foram realizadas em aparelho *ABI 7500 FAST* (*Applied Biosystems*) e com a utilização do agente intercalante *GoTaq[®] qPCR Master Mix* (Promega), sendo as especificações de estequiometria e ciclagem de acordo com as instruções do fabricante. O experimento foi executado em triplicata técnica, com base em um *pool* das triplicatas biológicas.

A especificidade de cada primer utilizado no experimento foi analisada por meio das respectivas curvas de *melting* e em todos os ensaios esse estágio foi mantido no ciclo para a verificação. Os resultados foram tratados de acordo com o método de Pfaffl (PFAFFL *et al.*, 2010), sendo os dados finais submetidos ao teste de Scott-Knott à 5% de significância, com auxílio do software R 3.03.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do candidato em potencial relacionado à exsudação de citrato da família *MATE* identificado em *C. canephora* (Capítulo 2), foi possível obter as sequências de dois genes em *C. arabica*, com 98% de identidade entre si à nível de sequência nucleotídica com éxons e íntrons.

Em relação à dissimilaridade de 2%, um dos genes é idêntico ao homólogo em *C. canephora* então, este foi denominado *CaMATE_C*, por ser correspondente à fração do genoma de *C. arabica* proveniente do ancestral *C. canephora*. O outro gene foi denominado *CaMATE_E* por ser respectivo à fração do genoma derivado de *C. eugenioides*, pois a espécie *C. arabica* é anfidiplóide, derivada da hibridização natural entre estas espécies anteriormente citadas (LASHERMES *et al.*, 1999).

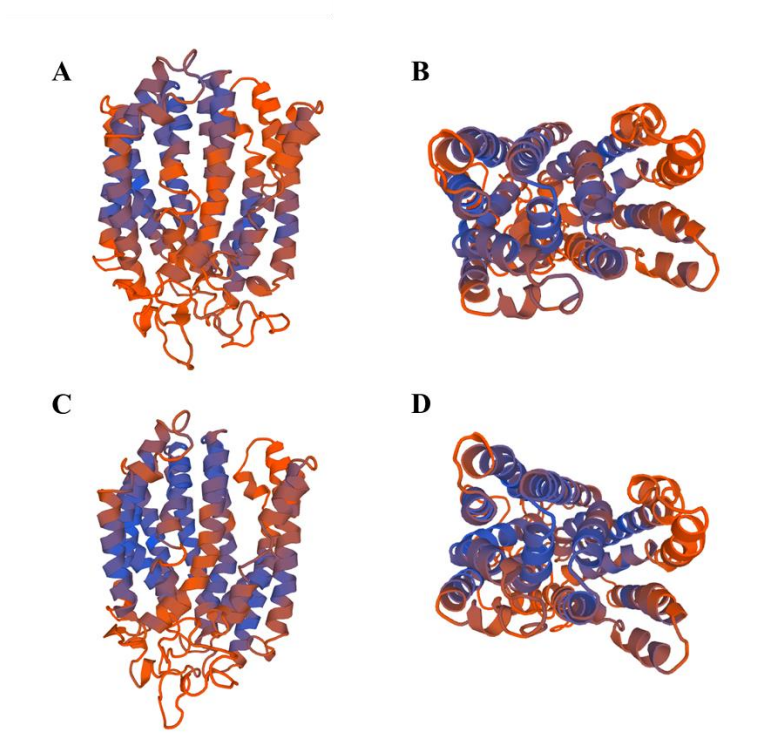
A proximidade entre o gene *CaMATE_C* e seu homólogo na espécie progenitora *CcMATE42* (99% de identidade) reforça o que é abordado na literatura sobre a possibilidade de que tenha sido recente o evento de especiação de *C. arabica* (LASHERMES *et al.*, 1999).

As duas proteínas codificadas pelos homeólogos em *C. arabica* apresentam apenas dissimilaridades em dois resíduos de aminoácidos. Na posição 10 da sequência há uma troca de tirosina (Y) por uma histina (H) e na posição 268 de valina (V) por isoleucina (I). Apenas na primeira troca há alteração na propriedade dos aminoácidos, porém nesta posição da sequência proteica não há sítios conservados entre as proteínas *MATE* que mediam o efluxo de citrato.

Vale ressaltar que estas modificações são em consequência de dois *SNPs* (*single nucleotide polymorphism*) existentes entre as sequências codantes dos respectivos genes e que, além dos dois *SNPs* que alteram estes aminoácidos, são observados 7 outros que não resultam em diferenças à nível proteico.

Assim como a proteína CcMATE42, estas proteínas identificadas em *C. arabica* são membros da família MATE potencialmente associadas ao efluxo de citrato, já que possuem tanto o *loop* interno à membrana de cerca de 100 resíduos de aminoácidos (figura 14) e a região conservada próximo ao segundo domínio transmembranar, características observadas restritamente em proteínas que desempenham esta função (LIU *et al.*, 2009).

Figura 14: Estrutura tridimensional das proteínas CaMATE_C e CaMATE_E preditas pelo software *SWISS-PROT*.



Legenda: A- CaMATE_C em perspectiva vertical; B- CaMATE_C em perspectiva horizontal; C- CaMATE_E em perspectiva vertical; D- CaMATE_E em perspectiva horizontal.

Fonte: do autor.

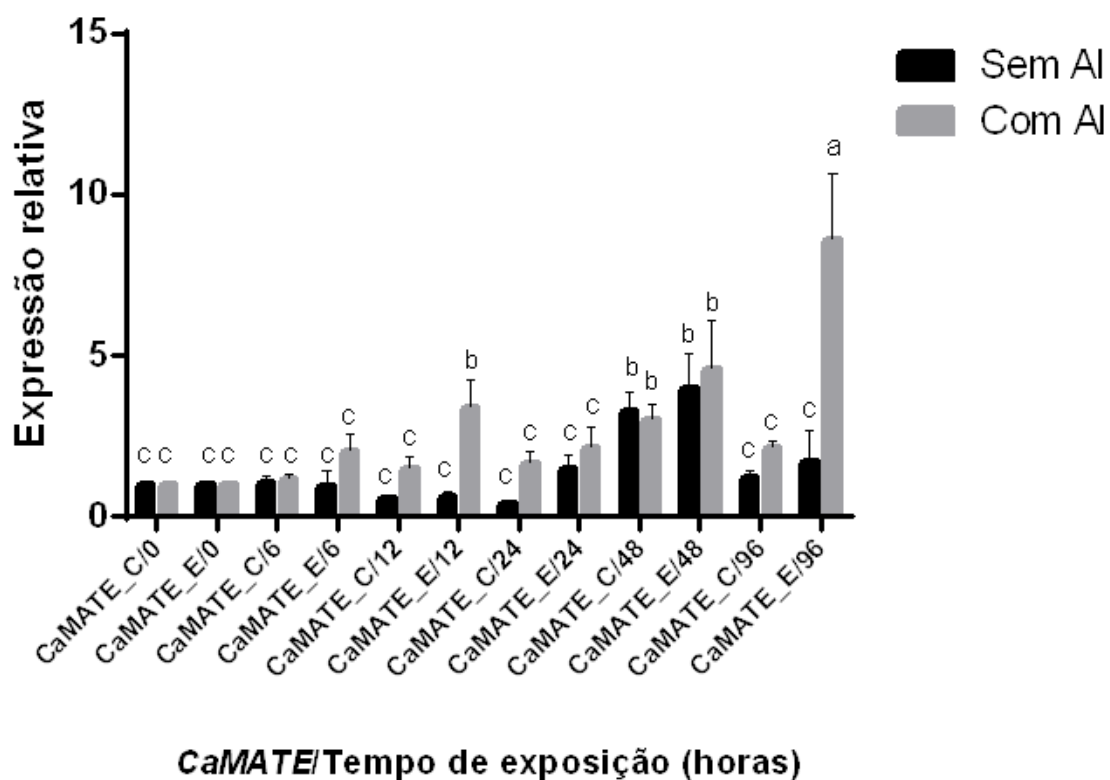
Com isso, a cultivar *Coffea arabica*, cv. Catuaí vermelho IAC 99 foi utilizada em experimento sob condições de hidroponia para validar o potencial destes membros da família *MATE* em cafeeiro, bem como verificar a hipótese de expressão diferencial por parte dos homeólogos, visto que existem dados que comprovam a exsudação de citrato por esta variedade em condições de campo (SILVA *et al.*, 2002).

Vale ressaltar que não há registros em literatura que elucidam os mecanismos pelos quais esta exsudação ocorre em cafeeiro. Porém foi demonstrado que as variedades de *Coffea arabica* Catuaí amarelo IAC 62 e Icatu vermelho IAC 4045 apresentam alterações quanto a expressão de genes relacionados ao metabolismo primário e processos oxidativos quando expostas ao alumínio tóxico (BAZZO *et al.*, 2013).

Dentre estas mudanças, pode-se destacar que o gene relativo à enzima malato desidrogenase (MDH) apresenta um pico de expressão logo uma hora após o contato da variedade Catuaí amarelo com alumínio, o que poderia indicar um mecanismo de efluxo de malato para a complexação do alumínio. No entanto, as duas cultivares apresentaram aumento gradual na expressão dos genes relacionados à enzima citrato sintase (CS) até o intervalo de 48 horas de exposição ao alumínio (tempo máximo analisado no experimento), aparentemente um indício de que a produção de citrato foi estimulada pelo estresse causado por alumínio (BAZZO *et al.*, 2013).

Este possível incremento na produção de citrato pode estar relacionado tanto com mecanismos de tolerância interna, nos quais o alumínio seria complexado e armazenado em vacúolo, quanto com mecanismos de exclusão, o que indicaria o envolvimento de proteínas *MATE* no efluxo deste ácido orgânico (KOCHIAN *et al.*, 2015) como mecanismo de tolerância do cafeeiro ao alumínio. De fato, a análise da expressão gênica dos genes da família *MATE* estudados neste trabalho suportam esta hipótese (figura 14).

Figura 15: Análise da expressão gênica relativa dos genes *CaMATE_C* e *CaMATE_E* na cultivar *Coffea arabica* cv, Catuaí vermelho IAC99



Legenda: As plantas foram expostas ou não à solução com alumínio disponível por diferentes intervalos de tempo. Como referência foram utilizados os genes *Ubiquitina* e *Actina*, considerados os mais estáveis dentre os analisados pela ferramenta *RefFinder*.

Fonte: do autor

Vale ressaltar que, à todos os primers utilizados no experimento, foi atribuída eficiência de amplificação superior à 90% (Apêndice, tabela 2) com exceção para o primer sintetizado para o gene 24S, porém este não foi utilizado para a normalização dos dados. Por análise da curva de melting, concluiu-se que todos os primers são específicos e os sintetizados para os genes de referência

aplicados ao método de comparação foram selecionados com base em *ranking* de 5 candidatos analisados com auxílio da ferramenta *RefFinder*.

A partir da análise do gráfico da figura 14, é possível afirmar que até o intervalo de 48 horas, não houve alteração significativa da expressão dos genes *CaMATE_C* e *CaMATE_E* em resposta ao alumínio. Para o tempo de 12 horas de exposição, houve um incremento na expressão do gene *CaMATE_E* em relação à presença de alumínio, porém este valor não difere do observado para o intervalo de 48 horas sem contato com alumínio.

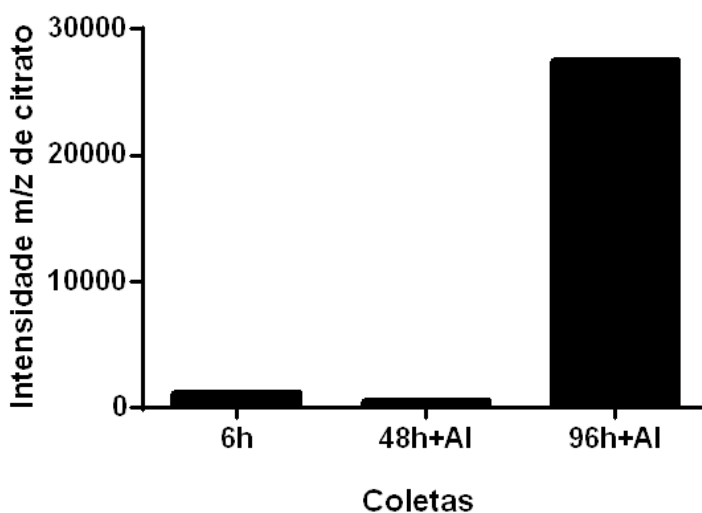
Este padrão de expressão mantém-se até às 96 horas de exposição ao alumínio para o gene *CaMATE_C*. Porém, os valores de expressão relativa do gene *CaMATE_E* sofrem um aumento significativo neste ponto para a condição de estresse com alumínio, tanto em relação à todos os outros pontos do gráfico quanto à condição sem alumínio, sendo que para esta última comparação a taxa de incremento na expressão é de 403%.

Portanto, de acordo com estes resultados, o gene *CcMATE_E* é responsivo ao estresse causado pelo alumínio e a ativação da expressão ocorre 96 horas após à exposição da planta à este metal. Apesar de não se tratarem das mesmas variedades de *Coffea arabica*, estes dados corroboram com o aumento gradual da expressão do gene respectivo à enzima CS apresentados no outro trabalho (BAZZO *et al.*, 2013) que analisa os fatores moleculares relacionados à tolerância desta espécie ao alumínio.

O tempo de exposição necessário para o incremento da expressão gênica do *CaMATE_E* é mais próximo ao observado para o gene *SbMATE* de *Sorghum bicolor* (MAGALHÃES *et al.*, 2007), dentre os genes *MATE* já estudados. Vale ressaltar que os trabalhos nos quais os genes *EcMATE3* e *BoMATE*, que estão mais próximos ao gene *CcMATE42* na árvore filogenética (figura 8, capítulo 2) avaliaram intervalos de tempo de contato com alumínio relativamente pequenos (WU *et al.*, 2014; SAWAKI *et al.*, 2013).

Interessantemente, assim como o observado para o gene *SbMATE* (MAGALHÃES *et al.*, 2007), a expressão do gene *CaMATE_E* pode estar relacionada ao incremento da exsudação do ânion citrato (figura 15).

Figura 16: Intensidade m/z de citrato por coleta de solução contendo o exsudato de plantas utilizadas no experimento.



Legenda: o ponto *6h* é relativo à coleta de solução de plantas submetidas à hidroponia por 6 horas sem contato com alumínio e os pontos *48h+Al* e *96h+Al* correspondem à coletas após 48 e 96 horas, respectivamente, de exposição ao alumínio.

Fonte: do autor.

Os valores de intensidade m/z para o ânion citrato presente nas amostras não são artifício para a relação direta com a quantidade de citrato exsudada, porém evidenciam a discrepância relativa entre a quantidade deste ácido orgânico presente na amostra coletada após 4 dias de exposição ao alumínio em relação às demais.

É possível, a partir da análise dos gráficos das figuras 14 e 15, também suportar a hipótese de que haja outros pontos entre o intervalo de tempo de 48 e 96 horas de exposição ao alumínio nos quais a expressão relativa do gene

CaMATE_E antija valores próximos ou superiores ao observado aos 4 dias de estresse. Tanto quanto esta hipótese, é válida a possibilidade de haver maiores valores de expressão relativa para este gene se as plantas permanecerem sob estresse por períodos de tempo mais prolongados.

Além da análise da figura 14 propiciar discussão da hipótese de que, a partir deste trabalho, possivelmente, foi identificado o gene membro da família *MATE* responsável pelo efluxo de citrato e relacionado com a tolerância ao estresse por alumínio em *Coffea arabica*, é pertinente a diferença nos valores de expressão relativa entre os dois homólogos *CaMATE_C* e *CaMATE_E*.

Aparentemente, a expressão do gene *CaMATE_C* não foi ativada pelo estresse causado por exposição ao alumínio no período de tempo analisado neste experimento, fato interessante, já que os dois genes coexistem no mesmo indivíduo e, portanto, estavam submetidos às mesmas condições de estresse. São necessários estudos com intervalos de tempos maiores de estresse para afirmar que o gene *CaMATE_C* não é reponsivo à esta condição, porém é evidente que o padrão de regulação transcricional entre os dois genes neste estudo é distinto.

O primeiro trabalho no qual foi abordado a expressão diferencial de homeólogos no gênero *Coffea* foi publicado em 2010 (VIDAL *et al.*, 2010).

Foi constatado que em 29% dos genes de *C. arabica* há contribuição diferencial por parte dos homeólogos (13% atribuída ao CaCc e 16% à CaCe), por ensaios baseados em *Expressed sequence tags* (EST). Aparentemente os homólogos CaCe estão ligados à funções basais enquanto que os homeólogos CaCc à respostas à estímulos. Neste contexto, foram detectadas tanto expressão diferencial entre os homeólogos para um determinado gene, como silenciamento de um dos homeólogos em alguns casos (VIDAL *et al.*, 2010).

A diferença entre o nível de expressão relativa entre os genes *CaMATE_C* e *CaMATE_E* corroboram com estes dados e embasam a hipótese da contribuição diferencial entre os homeólogos para características específicas.

Este padrão (VIDAL *et al.*, 2010) também foi observado em estudos com os homeólogos do gene *RBCS1*, que codifica a subunidade menor da enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxidase (Rubisco). Neste trabalho foi comprovada a expressão diferencial entre homeólogos associada à uma característica específica e a versão do subgenoma *CaCc* foi privilegiada neste caso (MARRACCINI *et al.*, 2011).

A partir do fato de que os dois homeólogos estudados neste trabalho, *CaMATE_E* e *CaMATE_C* foram submetidos às mesmas condições por coexistirem no mesmo indivíduo, é possível supor que os fatores delimitantes para a expressão diferencial estão associados à elementos cis- regulatórios, trans-regulatórios ou ambos.

Então, foi realizado o alinhamento múltiplo da região de 4000 pb *upstream* ao códon de início da tradução (ATG) dos dois homeólogos estudados. Esta região analisada pode ser dividida em três subregiões, uma região de 1000 pb, mais próxima ao ATG, outra seguinte de 1500 pb e a última de 1500 pb mais distante ao códon de início da tradução (valores aproximados) (figura 16). Dessa forma, a primeira e a última região apresentam maior similaridade entre os homeólogos (98% e 98%, respectivamente) e a região central de 1500 pb é a mais desigual (88% de similaridade).

Figura 17: Representação da região *upstream* ao códon de início da tradução analisada neste estudo.



Fonte: do autor

Afim de averiguar a possibilidade de influências de elementos cis-regulatórios, foi analisada a ocorrência de sítios para fatores de transcrição notoriamente associados à regulação de genes relacionados à tolerância à alumínio, como o *Al resistance transcription factor* (ART1) (TSUTSUI *et al.*, 2011), *Abscisic acid, stress and ripening 5* (ASR5) (ARENHART *et al.*, 2014), *Calmodulin binding transcription activator 2* (CAMTA2) (TOKIZAWA *et al.*, 2015) e *WRKY domain-containing protein 46* WRKY46 (DING *et al.*, 2013) (tabela 4).

Estes genes são fatores de transcrição comprovadamente envolvidos, dentre outras condições, no estresse por alumínio e em estudo com a região promotora do gene *AtALMT1*, envolvido no efluxo de malato ativado por alumínio, constatou-se que a presença de sítios de ligação para estas proteínas eram determinantes para a regulação da expressão deste gene em resposta ao estímulo (TOKIZAWA *et al.*, 2014).

A ligação das proteínas *Sensitive to proton rizotoxicity 1* (STOP1) (homóloga à ART1 e compartilha o mesmo sítio de ligação) e CAMTA2 aumentam o nível de expressão do gene em resposta ao estresse, sendo que a primeira é fundamental para a resposta ao estímulo. Já a proteína ASR5 está relacionada à expressão tecido-específica do gene *AtALMT1* no ápice radicular e, por fim, a proteína WRKY46 atua como repressora da expressão deste gene (TOKIZAWA *et al.*, 2014).

Tabela 4: Quantidade de sítios para ligação com fatores de transcrição envolvidos na resposta ao estresse causado por alumínio, na região promotora dos genes *CaMATE_C* e *CaMATE_E*.

Tipos de motif	Número de motifs	
	<i>CaMATE_C</i>	<i>CaMATE_E</i>
Sítios de ligação para ART1 (maior afinidade)	18	18
Sítios de ligação para ART1 (menor afinidade)	32	29
Sítios de ligação para ASR5	8	8
Sítios de ligação para CAMTA2	0	0
Sítios de ligação para WRKY46 (W-box)	10	10

Como pode ser observado a partir da tabela 4, os elementos cis-regulatórios conhecidamente envolvidos com a tolerância ao alumínio não variam em termos de quantidade em relação a região promotora dos dois homeólogos estudados neste trabalho. Aparentemente, este não é o fator determinante para a expressão diferencial destes genes em resposta ao estresse, porém, são necessários mais estudos para elucidar os elementos cis-regulatórios em *Coffea arabica* associados à este estímulo.

Baseado em análise de dados de RNA-seq, foi observado que elementos trans-regulatórios são determinantes para a expressão diferencial de homeólogos em *Coffea arabica*, não necessariamente relacionados à divergências em elementos cis-regulatórios. Foi demonstrado que os fatores de transcrição de um subgenoma podem atuar sobre outro subgenoma, e isto pode ocorrer de forma assimétrica, ou seja, elementos trans-regulatórios de ambos os subgenomas podem ligar-se à regiões cis-regulatórias de modo diferencial entre os alelos (COMBES *et al.*, 2015).

Além desse fato, constatou-se para o trabalho supracitado que os genes homeólogos diferencialmente expressos derivados do subgenoma de *C. canephora* eram regulados pelos fatores de transcrição derivados do subgenoma de *C. eugenioides* e também ocorria a situação inversa desta condição, sendo que

os fatores de transcrição do subgenoma de *C. eugenioides* causavam maior impacto sobre a regulação transcricional, culminando na maior expressão relativa dos genes homólogos do subgenoma de *C. canephora*.

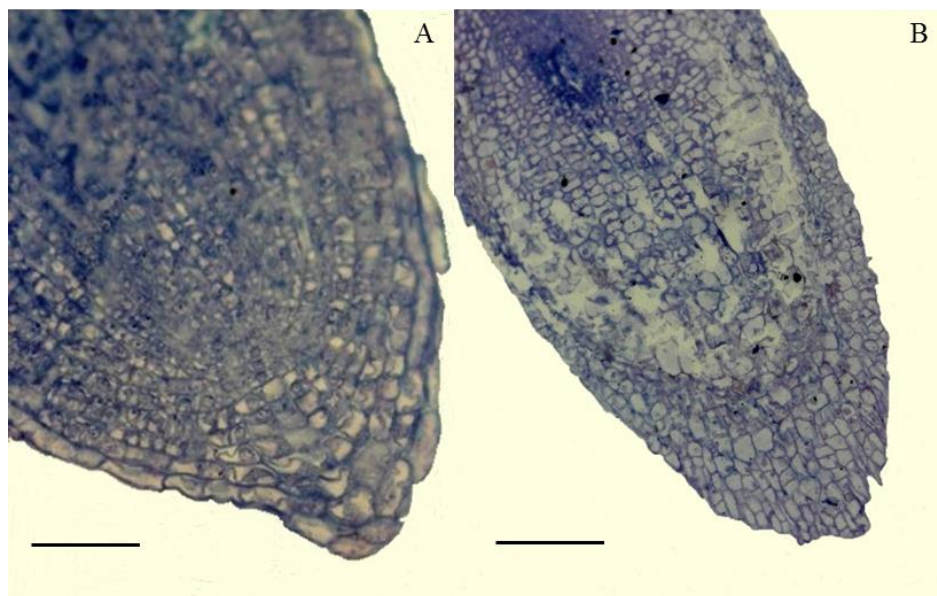
Esta observação pode ser aplicada aos genes *CaMATE_C* e *CaMATE_E*, porém é necessário avaliar a interação entre os elementos cis e trans regulatórios dos diferentes subgenomas associados ao estresse causado por alumínio.

Vale ressaltar que regiões intrônicas possuem elementos cis-regulatórios e que em estudos com o gene *SbMATE* foi constatada a existência de polimorfismos entre variedades contrastantes em relação à tolerância à alumínio no segundo íntron deste gene (MAGALHÃES *et al.*, 2007).

Vale ressaltar que os genes estudados neste trabalho apresentam polimorfismos justamente em uma região compreendida pelo segundo íntron, trata-se de uma diferença de 24 nucleotídeos e parte desta diferença é composta por repetições em tandem dos nucleotídeos *CTT*. Porém, não foi identificada nenhuma relação desta região com um fator de transcrição específico.

O tempo de exposição ao alumínio (96 horas, no total) foi suficiente para causar danos nos ápices radiculares da planta (figura 17). Os ápices radiculares, mais precisamente a zona de transição distal, são os sítios primários dos efeitos tóxicos do alumínio e, em sorgo, a maior expressão do gene *SbMATE* está justamente associada à este local (SIVAGURU *et al.*, 2013).

Figura 18: Secções longitudinais dos ápices radiculares coletados de plantas submetidas ao experimento.



Legenda: A- ápice radicular não exposto ao alumínio; B- ápice radicular após 96 horas de exposição ao alumínio. A barra horizontal na extremidade inferior esquerda denota a escala de 100 μm .

Fonte: do autor

Em ensaios com diferentes genótipos de cafeeiro, também em solução nutritiva, foi observado o acúmulo de alumínio em células epidérmicas do ápice radicular de plantas submetidas à 20h de contato com este metal, porém este intervalo de tempo e a concentração utilizada (0,296 mM) não foram suficientes para diferenciar os genótipos quanto à tolerância (BRACCINI *et al.*, 2000). Os ápices radiculares das plantas do ensaio conduzido neste trabalho estavam oxidados ao fim do experimento, em acordo com o observado na referência supracitada.

Apesar da notória diferença anatômica entre os ápices radiculares dos tratamentos experimentais após quatro dias de exposição ao alumínio, não foi observada diferença em relação à nutrição mineral via análise foliar, com

excessão para o elemento K^+ (tabela 5). Aparentemente, o tempo experimental não foi suficiente para observar os efeitos dos danos radiculares na translocação da maioria dos nutrientes até as folhas.

Tabela 5: Discriminação dos teores foliares dos nutrientes analisados de acordo com os tratamentos experimentais

Nutrientes (unidade)	Controle	96 horas sem exposição ao Al^{3+}	96 horas de exposição ao Al^{3+}
N (%)	3,22 a	3,07 a	2,99 a
P (%)	0,2 a	0,19 a	0,19 a
K (%)	1,80 a	1,29 b	1,37 b
Ca (%)	0,75 a	0,77 a	0,75 a
Mg (%)	0,25 a	0,24 a	0,25 a
S (%)	0,19 a	0,20 a	0,21 a
B (ppm)	50,60 a	51,10 a	49,30 a
Cu (ppm)	6,97 a	6,13 a	6,53 a
Mn (ppm)	47,9 a	53,16 a	44,33 a
Zn (ppm)	10,97 a	11,30 a	10,90 a
Fe (ppm)	160,20 a	133,43 a	145,83 a

NOTA: Médias seguidas de letras diferentes em linha podem ser consideradas diferentes à 5% de significância, pelo teste Scot-Knott. O controle refere-se à plantas analisadas antes da execução do experimento.

Em estudos em ambiente *in vitro*, também foi observada diminuição no conteúdo de potássio em folhas de cafeeiro submetidas ao alumínio, correlacionada com a concentração deste metal fornecida (BOJORQUEZ-QUINTAL *et al.*, 2014). No caso deste trabalho, não há como associar a diminuição da concentração de K^+ em detrimento dos efeitos tóxicos do íon

Al^{3+} , visto que tanto as plantas sob estresse e a plantas do tratamento controle apresentaram este sintoma.

Provavelmente, este sintoma deu-se por influência, tanto da nutrição no momento da realização do experimento quanto do estado nutricional das plantas anteriormente, visto que, para este elemento, a concentração foliar já estava no limiar entre deficiente e adequada (THEODORO *et al.*, 2003)

4. CONCLUSÃO

A exposição da cultivar *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho IAC 99 à solução contendo níveis tóxicos de Al^{3+} resultou em alterações anatômicas significativas, com degradação do ápice radicular das plantas submetidas à este estresse, porém não culminou em diferenças no conteúdo foliar dos macro e micronutrientes avaliados.

A partir do membro candidato da família *MATE* em *C. canephora* associado ao efluxo de citrato por análises *in silico*, foram identificados dois genes homólogos em *C. arabica*. Foi constatado que estes são homeólogos derivados dos genomas ancestrais de *C. canephora* e *C. arabica*.

Interessantemente, a expressão gênica destes homeólogos em plantas submetidas ao estresse por exposição ao alumínio foi diferencial, destacando-se o gene *CaMATE_E* (relacionado ao subgenoma de *C. eugenoides*) como mais responsivo à esta condição e com perfil de expressão condizente com a exsudação do ânion citrato. As regiões relacionadas à regulação da expressão gênica avaliadas neste trabalho (região promotora e intrônica) apresentam dissimilaridades entre os homeólogos, porém estas não correspondem à elementos cis-regulatórios distintos especificamente relacionados à resposta à condição abordada.

Portanto, foi possível caracterizar o gene em *C. arabica* possivelmente relacionado ao efluxo de citrato na rizosfera como mecanismo de tolerância ao alumínio e constatar a contribuição diferencial dos homeólogos derivados dos dois subgenomas ancestrais para esta característica. Estas constatações demonstram a pertinência do estudo destes genes para o subsídio de estratégias de melhoramento do cafeeiro que visem a adaptação à solos ácidos.

REFERÊNCIAS

- ARENHART, R. A.; BAI, Y.; DE OLIVEIRA, L. F. V.; NETO, L. B.; SCHUNEMANN, M.; MARASCHIN, F. D.; MARIATH, J.; SILVERIO, A.; SACHETTO-MARTINS, G.; MARGIS, R.; WANG, Z. Y.; MARGIS-PINHEIRO, M. New Insights into Aluminum Tolerance in Rice: The ASR5 Protein Binds the STAR1 Promoter and Other Aluminum-Responsive Genes. **Molecular Plant**, v. 7, n. 4, p. 709-721, Apr 2014.
- BAZZO, B. R.; EIRAS, A. D.; DELAAT, D. M.; SIQUEIRA, W. J.; MONDEGO, J. M. C.; COLOMBO, C. A. Gene Expression Analysis Suggests Temporal Differential Response to Aluminum in *Coffea arabica* Cultivars. **Tropical Plant Biology**, v. 6, n. 4, p. 191-198, Dec 2013.
- BOJORQUEZ-QUINTAL, J. E. D.; SANCHEZ-CACH, L. A.; KUGONZALEZ, A.; DE LOS SANTOS-BRIONES, C.; MEDINA-LARA, M. D.; ECHEVARRIA-MACHADO, I.; MUNOZ-SANCHEZ, J. A.; SOTOMAYOR, S.; ESTEVEZ, M. M. Differential effects of aluminum on in vitro primary root growth, nutrient content and phospholipase C activity in coffee seedlings (*Coffea arabica*). *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 134, p. 39-48, May 2014.
- BRACCINI, M. C. L.; MARTINEZ, H. E. P.; SILVA, E. A. M.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A. Crescimento da planta e coloração das raízes com hematoxilina como critérios de avaliação de genótipos de café quanto à tolerância à toxidez de alumínio. **Revista brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 59-68, 2000.

CARVALHO, G. *et al.* Back to Acid Soil Fields: The Citrate Transporter SbMATE Is a Major Asset for Sustainable Grain Yield for Sorghum Cultivated on Acid Soils. **G3-Genes Genomes Genetics**, v. 6, n. 2, p. 475-484, Feb 2016.

COMBES, M. C.; HUEBER, Y.; DEREEPER, A.; RIALLE, S.; HERRERA, J. C.; LASHERMES, P. Regulatory Divergence between Parental Alleles Determines Gene Expression Patterns in Hybrids. **Genome Biology and Evolution**, v. 7, n. 4, p. 1110-1121, Apr 2015.

CONSELHO DOS EXPORTADORES DE CAFÉ DO BRASIL (CeCafé). Relatório mensal, janeiro/2016, disponível em www.cecafe.com.br.

DING, Z. J.; YAN, J. Y.; XU, X. Y.; LI, G. X.; ZHENG, S. J. WRKY46 functions as a transcriptional repressor of ALMT1, regulating aluminum-induced malate secretion in Arabidopsis. **Plant Journal**, v. 76, n. 5, p. 825-835, Dec 2013.

HOAGLAND, D.R; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **Circular 347**, 1950.

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PINEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? - Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, v. 55, p. 459-493, 2004.

KOEHNLEIN, E. A.; BRACHT, A.; NISHIDA, V. S.; PERALTA, R. M. Total antioxidant capacity and phenolic content of the Brazilian diet: a real scenario. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 65, p. 293-298, 2014.

KOSTIC, L. *et al.* Liming of anthropogenically acidified soil promotes phosphorus acquisition in the rhizosphere of wheat. **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, n. 3, p. 289-298, Apr 2015

LASHERMES, P.; COMBES, M. C.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; D'HONT, A.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular and General Genetics**, v. 261, n. 2, p. 259-266, Mar 1999.

LOPES, A.S.; COX, F.R. A survey of the fertility status of surface soils under cerrado vegetation in Brazil. **Soil Science Society of America Journal**, v.41, p.742-747, 1977.

LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. GUIMARÃES. A career perspective on soil management in the Cerrado region of Brazil. **Advances in agronomy**, p. 1-35, 2016

LIU, J.; MAGALHAES, J. V.; SHAFF, J.; KOCHIAN, L. V. Aluminium-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer Arabidopsis aluminium tolerance. **The Plant Journal**, v. 57, p. 389-399, 2009.

MAGALHAES, J. V.; LIU, J.; GUIMARAES, C. T.; LANA, U. G. P.; ALVES, V. M. C.; WANG, Y. H.; SCHAFFERT, R. E.; HOEKENGA, O. A.; PINEROS, M. A.; SHAFF, J. E.; KLEIN, P. E.; CARNEIRO, N. P.; COELHO, C. M.; TRICK, H. N.; KOCHIAN, L. V. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, v. 39, n. 9, p. 1156-1161, Sep 2007.

MALAVOLTA, E.; SILVA, J.C.A.; CRUZ, A.P.; RODRIGUES, T.E.; SABINO, J.C.; GOMES, I.A.; OLIVEIRA, F.A.; DAGHLIAN, C.; GUERRINI, I.A.; MAZZA, J.A.; CORREA, L.S.; SCHIAVUZZO, M.A.; COSTA, M.P.; CABRAL, C.P.; PAVAN, L.H.S.; DARIO, L.A.; ANTONIOLLI, F.C. Estudos sobre a nutrição mineral do arroz. IX. Marcha de absorção de macronutrientes na variedade IAC-47. **Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz"**, v. 38, p. 539-549, 1981.

MARRACCINI, P.; COURJAULT, C.; CAILLET, V.; LAUSANNE, F.; LEPAGE, B.; ROGERS, W. J.; TESSERAU, S.; DESHAYES, A. Rubisco small subunit of *Coffea arabica*: cDNA sequence, gene cloning and promoter analysis in transgenic tobacco plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 17-25, Jan 2003

MARRACCINI, P.; FREIRE, L.P.; ALVES, G.S.C.; VIEIRA, N.G.; VINECKY, F.; ELBET, S.; RAMOS, H.J.O.; MONTAGNON, C.; VIEIRA, L.G.E.; LEROY, T.; POT, D.; SILVA, V.A.; RODRIGUES, G.C.; ANDRADE, A.C. *RBCS1* expression in coffee: *Coffea ortholga*, *Coffea Arabica* homeologs, and expression variability between genotypes and under drought stress. **BMC Plant Biology**, v.11, p. 1-23, 2011.

MENDONÇA, S.M.; MARTINEZ, H.E.P.; NEVES, J.C.L.; GUIMARAES, P.T.G.; PEDROSA, A.W. Coffee tree (*Coffea arabica* L.) response to limestone in soil with high aluminium saturation. **Coffee Science**, v. 2, p. 112-122, 2007.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUARIA E ABASTACIMENTO, SECRETARIA DE POLÍTICA AGRÍCOLA E DEPARTAMENTO DE CRÉDITO, RECURSOS E RISCOS. Informe estatístico do café. Setembro, 2015.

PFÄFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, p. 2002-2007, 2001

PFÄFFL M.W. *et al.* Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, 26: 509–515, 2004.

RUIJTER, J. M.; RAMAKERS, C.; HOOGAARS, W. M.; KARLEN, Y.; BAKKER, O.; van den Hoff, M. J.; MOORMAN, A. F. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research** v. 37, 2009.

SAWAKI, Y.; KIHARA-DOI, T.; KOBAYASHI, Y.; NISHIKUBO, N.; KAWAZU, T.; KOBAYASHI, Y.; KOYAMA, H.; SATO, S. Characterization of Al-responsive citrate excretion and citrate-transporting MATEs in *Eucalyptus camaldulensis*. *Planta*, v. 237, n. 4, p. 979-989, Apr 2013.

SILVA, F. A. M.; NOGUEIRA, F. D.; GUIMARÃES, P. T. G.; GODINHO, A.; MALTA, M. R. Determinação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular na rizosfera de cafeeiro por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Ciência e agrotecnologia**, edição especial, p. 1391-1395, 2002.

SIVAGURU, M.; LIU, J. P.; KOCHIAN, L. V. Targeted expression of SbMATE in the root distal transition zone is responsible for sorghum aluminum resistance. *Plant Journal*, v. 76, n. 2, p. 297-307, Oct 2013.

THEODORO, V. C. A.; CARVALHO, J. G.; CORREA, J. B.; GUIMARÃES, R. J. Avaliação do estado nutricional de agroecossistemas de café orgânico no estado de Minas Gerais. **Ciência e agrotecnologia**, v. 27, p. 1222-1230, 2003.

TOKIZAWA, M.; KOBAYASHI, Y.; SAITO, T.; KOBAYASHI, M.; IUCHI, S.; NOMOTO, M.; TADA, Y.; YAMAMOTO, Y. Y.; KOYAMA, H. SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY1, CALMODULIN BINDING TRANSCRIPTION ACTIVATOR2, and Other Transcription Factors Are Involved in ALUMINUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER1 Expression. **Plant Physiology**, v. 167, n. 3, p. 991-1003, Mar 2015.

TSUTSUI, T.; YAMAJI, N.; MA, J. F. Identification of a cis-acting element of ART1, a C2H2-type zinc-finger transcription factor for aluminium tolerance in rice. **Plant Physiology**, v. 156, p.925-931, 2011.

TUOMI, J. M.; VOORBRAAK F.; JONES, D. L.; RUIJTER, J. M. Bias in the Cq value observed with hydrolysis probe based quantitative PCR can be corrected with the estimated PCR efficiency value. **Methods**, v. 50, p. 313-322, 2010.

VIDAL, R. O.; MONDEGO, J. M. C.; POT, D.; AMBROSIO, A. B.; ANDRADE, A. C.; PEREIRA, L. F. P.; COLOMBO, C. A.; VIEIRA, L. G. E.; CARAZZOLLE, M. F.; PEREIRA, G. A. G. A High-Throughput Data Mining of Single Nucleotide Polymorphisms in Coffea Species Expressed Sequence Tags Suggests Differential Homeologous Gene Expression in the Allotetraploid Coffea arabica. **Plant Physiology**, v. 154, n. 3, p. 1053-1066, Nov 2010.

WU, X. X.; LI, R.; SHI, J.; WANG, J. F.; SUN, Q. Q.; ZHANG, H. J.; XING, Y. X.; QI, Y.; ZHANG, N.; GUO, Y. D. Brassica oleracea MATE Encodes a Citrate Transporter and Enhances Aluminum Tolerance in Arabidopsis thaliana. **Plant and Cell Physiology**, v. 55, n. 8, p. 1426-1436, Aug 2014.

Tabela 1: Descrição dos primers utilizados no experimento quanto à sequências e eficiências respectivas

PRIMER	Sequência	Eficiência
<i>CaMATE_C – FWD</i>	5'- GACTATGATGTCTGGTATCTGT-3'	93%
<i>CaMATE_C – REV</i>	5'-ATTTCCACTCCTAACTCGTC-3'	
<i>CaMATE_E – FWD</i>	5'- GACTATGATGTCTGGTATCTGC-3'	91%
<i>CaMATE_E – REV</i>	5'-ATTTCCACTCCTAACTCGTC-3'	
<i>UBIQUITINA – FWD</i>	5'-AAGACAGCTTCAACAGAGTACAGCAT-3'	92%
<i>UBIQUITINA – REV</i>	5'-GGCAGGACCTTGGCTGACTATA-3'	
<i>ACTINA – FWD</i>	5'- GCCAGATGGACAAGTGATTACCA-3'	98%
<i>ACTINA – REV</i>	5'-CAGCAGCTTCCATTCCTATGATAG-3'	
<i>24S – FWD</i>	5'-GACCAATCGTCTTCTTTCCAGAAA-3'	85%
<i>24S – REV</i>	5'-TCAACTCAGCCTTGGAAACATTAG-3'	
<i>PP2A – FWD</i>	5'-ACCTATGGGTGAAATGAAGATGGA-3'	94%
<i>PP2A – REV</i>	5'-AGGCGGCGAGATGAATCTTTT-3'	
<i>14 3 3 – FWD</i>	5'-CGCCTGATCGTGCTTGTTC-3'	90%
<i>14 3 3 – REV</i>	5'-GCACATCAGGAGTCCACAAAGTAA-3'	

Tabela 2: Ranking entre a estabilidade da expressão dos genes endógenos pela ferramenta *RefFinder*.

PRIMER	Valores de estabilidade (Ranking) - <i>RefFinder</i>
<i>UBIQUITINA</i>	1,57 (1°)
<i>ACTINA</i>	1,73 (2°)
<i>PP2A</i>	1,86 (3°)
<i>24S</i>	4,00 (4°)
<i>14 3 3</i>	5,00 (5°)