



DIEGO JÚNIOR MARTINS VILELA

**EFICIÊNCIA NO USO DO FÓSFORO, PARÂMETROS
MICROBIOLÓGICOS DO SOLO E IDENTIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DE GENES DA FAMÍLIA DAS
FOSFATASES ÁCIDAS EM CAFEEIROS**

**LAVRAS - MG
2019**

DIEGO JÚNIOR MARTINS VILELA

EFICIÊNCIA NO USO DO FÓSFORO, PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS DO SOLO E IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DA FAMÍLIA DAS FOSFATASES ÁCIDAS EM CAFEEIROS

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Pesq. Dr. Gladyston Rodrigues Carvalho
Orientador

Pesq. Dr. Cesar Elias Botelho
Coorientador

**LAVRAS - MG
2019**

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

Vilela, Diego Júnior Martins.

Eficiência no uso do fósforo, parâmetros microbiológicos do solo e identificação e caracterização de genes da família das fosfatases ácidas em cafeeiros / Diego Júnior Martins Vilela. – 2019.

116 p. : il.

Orientador: Gladyston Rodrigues Carvalho.

Coorientador: Cesar Elias Botelho.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. *Coffea arabica*. 2. Nutrição mineral. 3. Cultivares. I. Carvalho, Gladyston Rodrigues. II. Botelho, Cesar Elias. III. Título.

DIEGO JÚNIOR MARTINS VILELA

EFICIÊNCIA NO USO DO FÓSFORO, PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS DO SOLO E IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DA FAMÍLIA DAS FOSFATASES ÁCIDAS EM CAFEEIROS

EFFICIENCY IN THE USE OF PHOSPHORUS, MICROBIOLOGICAL PARAMETERS OF THE SOIL AND IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ACID PHOSPHATASES FAMILY GENES IN COFFEE TREES

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 24 de abril de 2019.

Prof. Dr. Marco Aurélio Carbone Carneiro	UFLA
Prof. Dr. Douglas Ramos Guelfi Silva	UFLA
Pesq. Dr. Rodrigo Luz da Cunha	EPAMIG
Pesq. Dr. Antonio Carlos Baião de Oliveira	EMBRAPA

Pesq. Dr. Gladyston Rodrigues Carvalho
Orientador

**LAVRAS - MG
2019**

*A Deus,
pelo dom da vida e porque sem Ele nada somos.*

AGRADEÇO

Aos meus pais, Djalma e Alice, por sempre estarem ao meu lado e nunca medirem esforços para que este momento acontecesse.

Ao meu irmão, Alysson Vinício, pela amizade e companheirismo.

A minha namorada, Tália, pelo incentivo, amor, companheirismo e compreensão.

A todos os meus amigos e familiares, em especial à tia Anna, por sempre me incentivarem e estarem comigo nos momentos mais difíceis.

OFEREÇO

Ao cafeicultor brasileiro, razão deste estudo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Departamento de Agricultura e ao Setor de Cafeicultura (INOVACAFÉ), pela oportunidade e honra de ter estudado nessa renomada instituição.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos. "O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001".

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) de Lavras, em especial aos funcionários e amigos, pela disponibilidade da área experimental, dos equipamentos e demais insumos que foram fundamentais para a realização do trabalho.

Ao Consórcio Pesquisa Café (EMBRAPA) pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Aos pesquisadores Gladyston Rodrigues Carvalho (orientador) e Cesar Elias Botelho (coorientador), pelos ensinamentos, incentivo, amizade e convivência diária ao longo destes anos.

Aos membros da banca avaliadora: ao professor Marco Aurélio Carbone Carneiro (DCS/UFLA), ao professor Douglas Ramos Guelfi Silva (DCS/UFLA), ao pesquisador Rodrigo Luz da Cunha (EPAMIG) e ao pesquisador Antonio Carlos Baião de Oliveira (EMBRAPA) pela disponibilidade e valiosas contribuições ao trabalho.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, Marli dos Santos Túlio, por toda atenção, disponibilidade e ajuda durante todo o curso.

Aos funcionários e amigos do Departamento de Ciência do Solo da UFLA, em especial aos do Laboratório de Microbiologia do Solo, Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas e Laboratório de Corretivos e Fertilizantes.

Aos amigos do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, Renan e Thiago, pela parceria, ajuda e ensinamentos.

Aos amigos do Núcleo de Estudos em Cafeicultura (NECAF), pela ajuda, disponibilidade, companheirismo e aprendizado, sem os quais este trabalho não teria sido realizado.

Aos amigos e bolsistas do grupo de pesquisa em cafeicultura da EPAMIG: André, Alessandro, Ana Flávia, Arley, Cyntia, Denis, Dyanna, Fernanda, Fernando (Capelinha), Guilherme Tassone, Heitor, João Paulo, Larissa Coelho, Larissa Fassio, Manoel, Marcelo, Maurício, Nicolas (Nerso), Pedro, Plínio, Priscila, Rafael Almeida, Rafael Jorge e Vinícius

Lemos, pela ajuda nas avaliações e condução do experimento, companheirismo e aprendizado.

Ao contribuinte brasileiro, por financiar os meus estudos e a minha pesquisa com o dinheiro dos seus impostos, o qual me proporcionou um ensino público gratuito e de qualidade.

A todos que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho, minha eterna gratidão.

MUITO OBRIGADO!

“Todos os homens consideram os limites do seu campo de visão como os limites do mundo.”

Arthur Schopenhauer

"Ao infinito... e além!"

Buzz Lightyear

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar a eficiência nutricional em fósforo, parâmetros microbiológicos do solo e identificar e caracterizar genes da família das fosfatases ácidas em cafeeiros. O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), situada no município de Lavras – MG. No Capítulo 2, o delineamento experimental foi o de blocos casualizados, em esquema fatorial 10x2 (10 genótipos de cafeeiro arábica e duas dosagens de adubação fosfatada), com quatro repetições. No Capítulo 3, o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2 (2 cultivares de cafeeiro arábica e duas dosagens de adubação fosfatada), com três repetições. Cada parcela experimental consistiu em um vaso com dez litros de solo, com uma planta. O solo utilizado foi proveniente de camada subsuperficial e não recebeu nenhum tipo de inoculação microbiológica. As adubações foram feitas por meio de soluções nutritivas. O experimento permaneceu por oito meses em casa de vegetação, e, em seguida, foi desmontado e as amostras de solo e material vegetal de cada parcela foram coletadas para as análises. Foram analisadas variáveis agronômicas, fisiológicas, químicas, microbiológicas e moleculares. As cultivares Catiguá MG2, MGS Ametista e Sarchimor MG 8840 não são eficientes e nem responsivas à adubação fosfatada. A progênie H 6-47-10 pl. 3 e a cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 não são eficientes, mas são responsivas à adubação fosfatada. As cultivares Paraíso MG H 419-1, Topázio MG 1190 e MGS Paraíso 2 são eficientes, mas não são responsivas à adubação fosfatada. As cultivares Bourbon Amarelo IAC J10 e MGS Aranãs são eficientes e responsivas à adubação fosfatada. A adubação fosfatada influencia positivamente no carbono da biomassa microbiana e negativamente na densidade de esporos de micorrizas. Genótipos de cafeeiro arábica respondem positivamente tanto com adubação fosfatada (MGS Ametista) quanto sem adubação fosfatada (MGS Paraíso 2) em atividade de fosfatase ácida. Foram identificados 29 genes da família Purple Acid Phosphatase (PAP) no genoma de *Coffea canephora*. Na cultivar MGS Paraíso 2 algumas PAPs foram mais expressadas sob privação de P (*CarPAP3*, *CarPAP11* e *CarPAP18*) e outras foram indiferentes à questão do P (*CarPAP12*). A expressão gênica de *CarPAP18* e a atividade de fosfatase ácida foi altamente significativa na cultivar MGS Paraíso 2 sob privação de P.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. Cultivares. Nutrição mineral. Biomassa microbiana. Micorrizas. PAP.

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the nutritional efficiency regarding phosphorus (P), microbiological parameters of the soil and to identify and characterize genes of the family of acid phosphatases in coffee trees. The experiment was conducted under greenhouse conditions at the Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), located in Lavras, state of Minas Gerais, Brazil. In Chapter 2, the experimental design followed a randomized complete block design, in a 10x2 factorial scheme (10 arabica coffee genotypes and two doses of phosphate fertilization), with four replications. In Chapter 3, the experimental design followed a completely randomized design, in a 2x2 factorial scheme (2 cultivars of arabica coffee and two doses of phosphate fertilization), with three replications. Each experimental plot consisted of one pot with ten liters of soil, with one plant. The soil used in the study was collected from the subsurface layer and did not receive any type of microbiological inoculation. Fertilization was carried out using nutrient solutions. The experiment lasted eight months in the greenhouse. Thereafter, the soil and plant material samples from each plot were collected for analysis. Agronomic, physiological, chemical, microbiological and molecular variables were analyzed. The cultivars Catiguá MG2, MGS Ametista and Sarchimor MG 8840 are neither efficient nor responsive to phosphate fertilization. Progeny H 6-47-10 pl. 3 and the cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 are not efficient but are responsive to phosphate fertilization. The cultivars Paraíso MG H 419-1, Topázio MG 1190 and MGS Paraíso 2 are efficient but are not responsive to phosphate fertilization. The cultivars Bourbon Amarelo IAC J10 and MGS Aranãs are efficient and responsive to phosphate fertilization. Phosphate fertilization has a positive influence on the microbial biomass carbon and negatively on mycorrhizal spores density. Genotypes of arabica coffee respond positively both with phosphate fertilization (MGS Ametista) and without phosphate fertilization (MGS Paraíso 2) in acid phosphatase activity. A total of 29 genes of the Purple Acid Phosphatase (PAP) family in the genome of *Coffea canephora* were identified. In the cultivar MGS Paraíso 2 some PAPs were more expressed under P deprivation (*CarPAP3*, *CarPAP11* and *CarPAP18*) and others were indifferent to P (*CarPAP12*). The gene expression of *CarPAP18* and the acid phosphatase activity were highly significant in the MGS Paraíso 2 cultivar under P deprivation.

Keywords: *Coffea arabica*. Cultivars. Mineral nutrition. Microbial biomass. Mycorrhiza. PAP.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1 - Relação entre massa seca total sob ausência de adubação fosfatada (MSTAP) e eficiência agronômica de uso de fósforo (EAUP) de genótipos de cafeeiro arábica em seus respectivos grupos: ER (eficientes e responsivos), ENR (eficientes e não responsivos), NER (não eficientes e responsivos) e NENR (não eficientes e não responsivos). 76

CAPÍTULO 3

- Figura 1 - Árvore filogenética de genes de fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) de quatro espécies vegetais: soja (*Glycine max*), arroz (*Oryza sativa*), arabdopsis (*Arabdopsis thaliana*) e cafeeiro robusta (*Coffea canephora*). Em destaque (sublinhado) são as cinco PAP's selecionadas para estudos funcionais *in vivo*. 101
- Figura 2 - Expressão relativa de quatro genes da família das fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) em cafeeiros arábica relacionados ao déficit de fósforo. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de agrupamento de Scott-Knott. 103
- Figura 3 - Atividade de fosfatase ácida (FFT) e carbono da biomassa microbiana (CBM) de cultivares de cafeeiros arábica relacionados ao déficit de fósforo. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de agrupamento de Scott-Knott. 104

APÊNDICE B - CAPÍTULO 3

- Imagem 1 - Perfis das amostras de RNA submetidas à eletroforese em gel de agarose. Números representam os vasos a partir dos quais as amostras foram obtidas. As duas bandas inferiores correspondentes às unidades de RNA ribossomal nítidas, separadas e proporcionais, indicando a integridade do material genético. 114
- Imagem 2 - Géis de eletroforese com produto da PCR Housekeeping. C- - controle negativo; C+ - controle positivo; números representam os vasos a partir dos quais as amostras foram obtidas. 115
- Imagem 3 - Géis de eletroforese com produto da PCR para confirmação da conversão do

RNA em cDNA. C- - controle negativo; C+ - controle positivo; números
representam os vasos a partir dos quais as amostras foram obtidas. 116

Imagem 4 - Imagem dos tratamentos (cultivares MGS Paraíso 2 e Sarchimor MG 8840
sem e com adubação fosfatada). 116

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1 - Propriedades químicas, físicas e microbiológicas do solo utilizado no experimento..... 54
- Tabela 2 - Médias de massa seca das raízes (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca total (MST), acúmulo de fósforo na raiz (APRZ), acúmulo de fósforo total na planta (APPL) e teor de fósforo na raiz da planta (PRZ) de genótipos de cafeeiro arábica. 61
- Tabela 3 - Médias da densidade de esporos de micorrizas (ESP), atividade da fosfatase ácida (FFT) e carbono da biomassa microbiana (CBM) de genótipos de cafeeiro arábica relacionados ao déficit de fósforo. 65
- Tabela 4 - Médias da densidade de esporos de micorrizas (ESP), carbono da biomassa microbiana (CBM) e atividade da fosfatase ácida (FFT) sob ausência ou presença de adubação fosfatada..... 66
- Tabela 5 - Médias de atividade da fosfatase ácida (FFT) de genótipos de cafeeiro arábica. 67
- Tabela 6 - Eficiência de uso de fósforo na raiz (EUPRZ), eficiência de uso de fósforo na parte aérea (EUPPA) e eficiência de uso de fósforo na planta (EUPPL) de genótipos de cafeeiro arábica. 71
- Tabela 7 - Coeficiente de correlação de Pearson entre as características massa seca de raízes (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca total (MST), acúmulo de fósforo na raiz (APRZ), acúmulo de fósforo na parte aérea (APPA), acúmulo de fósforo na planta (APPL), densidade de esporos de micorrizas (ESP), colonização micorrízica (COL), atividade da fosfatase ácida (FFT), carbono da biomassa microbiana (CBM), eficiência na absorção de fósforo (EAP), eficiência na translocação de fósforo (ETP), eficiência de uso de fósforo na raiz (EUPRZ), eficiência de uso de fósforo na parte aérea (EUPPA) e eficiência de uso de fósforo na planta (EUPPL) de genótipos de cafeeiro arábica relacionados ao déficit de fósforo. 73
- Tabela 8 - Massa seca total sob ausência de adubação fosfatada (MSTAP) e eficiência agrônômica de uso de fósforo (EAUP) de genótipos de cafeeiro arábica em seus respectivos grupos: ER (eficientes e responsivas), ENR (eficientes e não responsivas), NER (não eficientes e responsivas) e NENR (não eficientes e

não responsivas). 74

APÊNDICE A - CAPÍTULO 2

- Tabela 1 - Resumo da análise de variância da massa seca das raízes (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca total (MST), acúmulo de fósforo na raiz (APRZ), acúmulo de fósforo na parte aérea (APPA), acúmulo de fósforo na planta (APPL), fósforo disponível no solo (PDI), fósforo resina (PRS), fósforo remanescente no solo (PRM), teor de fósforo na raiz da planta (PRZ), teor de fósforo na parte aérea da planta (PPA), taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (g_{sw}), concentração intracelular de CO_2 (C_i) e transpiração (E) de genótipos de cafeeiro arábica relacionados ao déficit de fósforo. 85
- Tabela 2 - Médias da massa seca das raízes (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca total (MST), acúmulo de fósforo na raiz (APRZ), acúmulo de fósforo na parte aérea (APPA), acúmulo de fósforo na planta (APPL), fósforo disponível no solo (PDI), fósforo resina (PRS), fósforo remanescente no solo (PRM), teor de fósforo na parte aérea da planta (PPA) e teor de fósforo na raiz da planta (PRZ) sob ausência ou presença de adubação fosfatada. 86
- Tabela 3 - Resumo da análise de variância da densidade de esporos de micorrizas (ESP), colonização micorrízica (COL), atividade da fosfatase ácida (FFT) e carbono da biomassa microbiana (CBM) de genótipos de cafeeiro arábica relacionados ao déficit de fósforo. 87
- Tabela 4 - Resumo do desdobramento da interação da análise de variância da densidade de esporos de micorrizas (ESP), atividade da fosfatase ácida (FFT) e carbono da biomassa microbiana (CBM) de genótipos de cafeeiro arábica relacionados ao déficit de fósforo. 87
- Tabela 5 - Resumo da análise de variância da eficiência na absorção de fósforo (EAP), eficiência na translocação de fósforo (ETP), eficiência de uso de fósforo na raiz (EUPRZ), eficiência de uso de fósforo na parte aérea (EUPPA) e eficiência de uso de fósforo na planta (EUPPL) de genótipos de cafeeiro arábica relacionados ao déficit de fósforo. 88
- Tabela 6 - Médias da eficiência na absorção de fósforo (EAP), eficiência de uso de fósforo na parte aérea (EUPPA) e eficiência de uso de fósforo na planta (EUPPL) sob ausência ou presença de adubação fosfatada. 88

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Propriedades químicas, físicas e microbiológicas do solo utilizado no experimento.....	95
Tabela 2 - Descrição das sequências para cada par de primers utilizados nas análises de RT-qPCR.....	97
Tabela 3 - Relação dos genes da família PAP no genoma de <i>Coffea canephora</i>	99

APÊNDICE A - CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Resumo da análise de variância da expressão gênica relativa de fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) de cultivares de cafeeiro arábica relacionados ao déficit de fósforo.....	113
Tabela 2 - Média da expressão gênica relativa de fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) de cultivares de cafeeiro arábica relacionados ao déficit de fósforo.....	113

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL	16
1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1	Cafeicultura, cultivares de café e melhoramento genético do cafeeiro	19
2.2	Eficiência nutricional.....	20
2.3	Fungos micorrízicos arbusculares.....	22
2.4	Fosfatase ácida.....	26
2.5	Biomassa microbiana do solo	29
2.6	<i>Purple Acid Phosphatase</i> (PAPs) e sua expressão gênica.....	32
	REFERÊNCIAS	36
	CAPÍTULO 2 EFICIÊNCIA NO USO DO FÓSFORO E PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS DO SOLO EM CAFEEIROS ARÁBICA	49
1	INTRODUÇÃO	51
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	53
2.1	Caracterização do experimento	53
2.2	Avaliações	54
2.3	Análises estatísticas.....	58
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS	78
	APÊNDICE A - TABELAS.....	85
	APÊNDICE B - FIGURA	89
	CAPÍTULO 3 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DA FAMÍLIA DAS FOSFATASES ÁCIDAS EM CAFEEIROS	90
1	INTRODUÇÃO	92
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	94
2.1	Caracterização do experimento	94
2.2	Identificação de genes da família <i>Purple Acid Phosphatases</i> (PAP).....	95
2.2.1	Extração e tratamento do RNA.....	96
2.2.2	PCR Housekeeping e conversão de RNA em cDNA (RT-PCR).....	97
2.2.3	Desenho e análise da eficiência de primers e qPCR	98
2.3	Análises estatísticas.....	98
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
4	CONCLUSÕES	107
	REFERÊNCIAS	108
	APÊNDICE A - TABELAS.....	113
	APÊNDICE B – IMAGENS.....	114

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O cafeeiro necessita de vários nutrientes para completar o seu ciclo vegetativo e reprodutivo. As espécies vegetais apresentam variabilidade na sua exigência nutricional, tanto qualitativamente quanto quantitativamente. Além disso, apresentam essa variabilidade, até mesmo, dentro da própria espécie, em que diferentes cultivares podem apresentar diferentes exigências nutricionais.

A exigência nutricional e o crescimento das plantas variam de acordo com a espécie e ou a cultivar (FAGERIA, 1998; MARTINEZ et al., 1993), alguns parâmetros são utilizados para a mensuração da sua eficiência nutricional, dentre eles a eficiência de absorção (DUNCAN; BALIGAR, 1990; SANDS; MULLIGAN, 1990; SWIADER; CHYAN; FREIJI, 1994), a eficiência de translocação (DUNCAN; BALIGAR, 1990; LI; MCKEAND; ALLEN, 1991) e a eficiência do uso dos nutrientes (DUNCAN; BALIGAR, 1990; SANDS; MULLIGAN, 1990; SIDDIQI; GLASS, 1981).

Atualmente, a sustentabilidade na produção de alimentos é exigida em todo o planeta. Nesse contexto, a parte ambiental é uma das mais importantes. Os alimentos produzidos no mundo são cultivados nos mais diferentes tipos de solo. A preocupação na sua conservação e preservação aumenta a cada dia, devido ao aumento da população mundial e necessidade por mais alimentos.

A parte viva do solo, a microbiota, exerce um papel fundamental na dinâmica dos nutrientes no solo, atuando em diversos processos físicos, químicos e bioquímicos, como a decomposição de resíduos orgânicos e inorgânicos, mineralização dos elementos químicos do solo, ciclagem de nutrientes e simbioses radiculares, como a fixação biológica de nitrogênio e com os fungos micorrízicos arbusculares. A sua manutenção é um dos principais fatores de sucesso de diversos cultivos agrícolas. Diversos atributos, como a biomassa microbiana, atividades enzimáticas e estrutura da comunidade microbiana têm sido utilizadas como indicadores da qualidade do solo, empregados em programas de monitoramento (DIAS-JÚNIOR et al., 1998; RENELLA et al., 2005; VÁSQUEZ-MURRIETA et al., 2006).

A demanda por alimentos no planeta cresce de forma acentuada atualmente. Para suprir essa demanda, uma das principais alternativas na agricultura é conseguir obter cultivos mais produtivos, sem que haja a necessidade de se utilizar novas áreas para tal finalidade. Uma dessas alternativas é a utilização de cultivares mais adaptadas às diversas condições de

cultivo. Nesse quesito, plantas mais eficientes na absorção e utilização de nutrientes, além de produzirem mais, utilizam menos recursos não renováveis, como é o caso dos fertilizantes, amplamente utilizados na agricultura, mas que possuem entraves do ponto de vista ambiental e econômico. Para atingir uma situação mais sustentável de produção, algumas ferramentas podem ser utilizadas, uma delas é a melhoria na capacidade da planta em absorver os nutrientes de que precisa, diretamente dos solos, como o caso do fósforo.

O fósforo é um macronutriente essencial às plantas, é vital em diversos processos bioquímicos, constituinte dos ácidos nucleicos e do ATP, dentre outras funções. Apesar de presente em pequena quantidade na massa seca das plantas (quando comparado com os outros macronutrientes), sua dinâmica é peculiar sobremaneira pelo fato de que, na maioria dos solos do mundo, o teor de fósforo inorgânico (Pi) é inferior ao necessário para o correto suprimento à demanda das plantas, e que também grande parte do fósforo existente é encontrado na forma orgânica (Po) ou está fixada em cálcio, ferro e alumínio, que não podem ser utilizados diretamente pelas plantas. Para contornar essa situação, as plantas desenvolveram mecanismos adaptativos visando melhorar a sua eficiência de absorção e utilização do fósforo em ambientes com baixa disponibilidade, como exemplo, com o aumento na produção de enzimas denominadas fosfatases ácidas.

As Purple Acid Phosphatase (PAP), ou fosfatase ácida púrpura (FAP), são uma classe especial de fosfatase ácida (APase) que hidrolisa uma vasta quantidade de ésteres de fosfato e fosfato anidro em condições ácidas ótimas. Possui uma coloração arroxeada ou rosada em solução aquosa. As PAPs vegetais foram amplamente identificadas e caracterizadas em muitas espécies com o auxílio de tecnologias bioquímicas e moleculares, porém ainda não há trabalhos desenvolvidos dentro do gênero *Coffea*. As PAPs podem ser divididas em: fosfatases ácidas secretadas (SAPs) e fosfatases ácidas intracelulares (IAPs). A maioria das fosfatases ácidas intracelulares estão presentes no vacúolo como proteínas solúveis, enquanto as fosfatases ácidas secretadas estão localizadas na parede celular ou secretados na rizosfera (DUFF; SARATH; PLAXTON, 1994).

Espera-se que diferentes genótipos de cafeeiro apresentem variabilidade na sua eficiência nutricional, na sua interação com a microbiota do solo e na sua capacidade em produzir fosfatases ácidas. Atualmente, buscam-se genótipos mais eficientes nutricionalmente, o que pode gerar impactos significativos em toda a cadeia produtiva. A microbiota do solo pode influenciar sobremaneira na dinâmica de resposta dos genótipos frente a sua necessidade nutricional. Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar

a eficiência nutricional em fósforo, parâmetros microbiológicos do solo e a identificação e caracterização de genes da família das fosfatases ácidas em cafeeiros.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cafeicultura, cultivares de café e melhoramento genético do cafeeiro

A cafeicultura brasileira é, até os dias atuais, extremamente importante para o desenvolvimento econômico e social do país, é uma das principais atividades da pauta agrícola de muitos dos Estados brasileiros. Essa atividade é responsável por gerar milhões de empregos diretos e indiretos em toda a sua cadeia produtiva. Grande parte da sua produção é originada da agricultura familiar. O desenvolvimento de novas tecnologias permite o avanço dessa atividade, ou seja, o desenvolvimento de novas cultivares, sejam elas mais produtivas, mais adaptadas às diversas regiões produtoras e condições climáticas e, ainda, apresenta características agrônômicas de interesse, sempre objeto de estudo pelos melhoristas e desejo de toda a cadeia produtiva.

Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2018), a safra de café de 2018, ano de bialidade positiva, foi de 61,7 milhões de sacas beneficiadas, crescimento de 37,1% em relação ao ano anterior. A área total, em formação e em produção, atingiu 2.158,5 mil hectares (294,2 mil hectares em formação e 1.864,3 mil hectares em produção). Dentre as duas espécies cultivadas, a safra de arábica foi de 47,5 milhões de sacas, com crescimento de 38,6% em relação ao ano anterior; já a safra de conilon foi de 14,2 milhões de sacas, com crescimento de 32,2% em relação ao ano anterior. Esse crescimento na produção se deu devido ao ciclo de alta bialidade, sobretudo em lavouras da espécie arábica, devido às condições climáticas favoráveis e à melhoria do pacote tecnológico, principalmente de cultivares mais produtivas.

O Brasil é o segundo maior consumidor de café, permanecendo atrás somente dos Estados Unidos. A população brasileira está cada vez mais exigente pelo café comercializado, uma vez que vem conhecendo mais sobre o produto. O consumo per capita cresce a cada ano, apresentando, em 2018, um consumo de 6,02 kg de café verde ou 4,82 kg de café torrado e moído por habitante (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ - ABIC, 2018).

Apesar de conquistar significativo patamar no agronegócio, ainda existem demandas por novas tecnologias, para garantir a sustentabilidade da cafeicultura nacional. Os avanços em produtividade têm sido observados ao longo de alguns anos nas lavouras cafeeiras de Minas Gerais, com a adoção de técnicas de manejo, melhoramento genético com emprego de

novas cultivares, uso racional de fertilizantes e melhoria na qualidade dos cafés especiais (CARVALHO; PEREIRA, 2009).

Atualmente, existem no mercado várias cultivares de café que apresentam características agronômicas desejáveis, como resistência à ferrugem, são algumas delas: Paraíso MG H 419-1 e cultivares do grupo Catiguá (Catiguá MG1, Catiguá MG2 e MGS Catiguá 3) (PEREIRA et al., 2010). Em relação ao adensamento de plantio, sugerem-se cultivares como Araponga MG1, Catiguá MG1, Catiguá MG2 e MGS Catiguá 3, IAPAR 59, entre outras. Para a qualidade sensorial, destaca-se o Catiguá MG2 e cultivares do grupo Bourbon, sendo este grupo referência em potencial elevado em qualidade de bebida. Como cultivares adaptadas à colheita mecanizada, destacam-se as cultivares do grupo Acaiá (CARVALHO et al., 2008; FAZUOLI et al., 2008). Uma vertente ainda pouco estudada e explorada no melhoramento do cafeeiro é a obtenção de cultivares com diferentes perfis de comportamento em relação à fertilidade dos solos. Há demanda tanto por cultivares que apresentem alta resposta à adubação quanto para cultivares que são consideradas “menos exigentes” em nutrição, que seriam indicadas para níveis tecnológicos de produção mais baixos.

2.2 Eficiência nutricional

O termo ‘eficiência nutricional’ é utilizado para caracterizar plantas em sua capacidade de absorver e utilizar nutrientes, está relacionado à eficiência de absorção, translocação e utilização de nutrientes. A eficiência de absorção está relacionada à taxa de absorção de nutrientes por unidade de comprimento ou de massa, e pode ser avaliada em estudos de cinética de absorção de nutrientes (BALIGAR; FAGERIA, 1998).

A maior ou menor produção de frutos por unidade de nutrientes na planta pode ser explicada por diferenças na eficiência de aquisição, de translocação e/ou de utilização dos nutrientes. A aquisição de nutrientes depende da eficiência dos mecanismos de absorção e do volume de solo explorado pelas raízes, e pode ser avaliada pelas eficiências de absorção e de produção de raízes (AMARAL et al., 2011). Por sua vez, a eficiência de utilização de nutrientes depende do seu transporte para a parte aérea e de sua exigência metabólica (MARTINEZ et al., 1993), é obtida pelo quociente entre a biomassa total da planta e a concentração do nutriente (SIDDIQI; GLASS, 1981). Tradicionalmente, a eficiência de utilização de nutriente tem sido definida como a razão entre a biomassa e a quantidade total de nutriente na biomassa (TOMAZ; AMARAL, 2008).

Merece destaque saber que o conhecimento dos teores de nutrientes em vários órgãos do vegetal permite inferir sobre as exigências metabólicas desenvolvidas em cada compartimento, fornecendo base para o entendimento dessas variações e suas implicações nas respostas dos vegetais (AMARAL et al., 2011).

Um dos grandes desafios da agricultura moderna é a utilização de estratégia de adaptação de plantas a solos de baixa fertilidade. Nesses casos, há duas alternativas: elevar a fertilidade dos solos pelo uso de corretivos e fertilizantes, ou empregar cultivares nutricionalmente eficientes (POZZA et al., 2009).

Segundo Camargo et al. (2004), um genótipo com alta eficiência nutricional é uma planta altamente eficiente na utilização de nutrientes, mesmo em condições adversas, tais como de baixa fertilidade do solo, de poucos recursos hídricos ou de excesso de sais, podendo ser o caminho para a obtenção de maiores produtividades, ou mesmo na seleção de material genético superior. De acordo com Barros e Novais (1990), se uma planta apresenta alta eficiência de utilização para um determinado nutriente, isso não quer dizer que ela também apresente alta eficiência para os demais nutrientes. Como foi constatado em estudos realizados por Molica (1992), dificilmente será possível selecionar um material genético que possua alta eficiência na utilização de todos os nutrientes, o que está de acordo também com pesquisas realizadas por Paula et al. (1996, 2003), Santana, Barros e Neves (2002) e Silva et al. (2002), as quais demonstraram que vários outros fatores (genéticos, ambientais, fisiológicos, bioquímicos e qualidade dos sítios) estão interligados, e que a eficiência nutricional varia em função da espécie, das procedências e dos sítios (CAMARGO et al., 2004).

A crescente demanda de nutrientes por cultivares de café (que estão cada vez mais produtivas), assim como a expansão dessas lavouras para solos de baixa fertilidade, como os solos do Cerrado Mineiro, exige melhor compreensão da dinâmica dos nutrientes nessa cultura, evitando-se assim deficiência nutricional (REIS JÚNIOR; MARTINEZ, 2002).

Informações com relação à nutrição mineral do cafeeiro são encontradas na literatura, como questões referentes à absorção, ao transporte e à redistribuição de nutrientes, existindo a possibilidade de se melhorar ou selecionar cultivares mais eficientes quanto ao uso de nutrientes. Hoje em dia, devido às mais diversas condições de cultivo existentes e novas cultivares disponíveis aos produtores, necessitam-se de novos estudos para mensurar a eficiência nutricional dessas cultivares. Como exemplo, diferenças nas exigências nutricionais do cafeeiro, a cultivar ‘Catuaí’, comparada à ‘Mundo Novo’, é menos exigente em N e P, mais exigente em K, Ca, B, Fe, Mn e Zn e, praticamente, apresentam a mesma exigência em

Mg, S e Cu (MALAVOLTA, 1993). Pereira (1999) também discriminou linhagens de cafeeiros arábicos com base na eficiência de utilização de N e K. Em um amplo estudo, Amaral et al. (2011) testaram as exigências nutricionais de N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu e Zn na produção de raiz e de parte aérea entre diferentes cultivares de cafeeiro (Acaiaí IAC 474-19, Icatu Amarelo IAC 3282, Rubi MG 1192 e Catuaí Vermelho IAC 99) e três níveis de adubação (baixo, normal e alto), e estes concluíram que a eficiência de utilização de nutrientes para produção de raízes e uso de nutrientes pela parte aérea de cafeeiros foi diferenciada entre as cultivares. Tomaz et al. (2011) estudaram a eficiência de absorção e utilização de B, Zn, Cu e Mn em mudas enxertadas de cafeeiro, nas quais utilizou-se como enxerto quatro genótipos de *Coffea arabica* (Catuaí Vermelho IAC 15, Oeiras MG 6851 e as progênies H 419-10-3-4-4 e H 514-5-5-3) e como porta-enxerto cinco progênies de *Coffea canephora* cv. Conilon (ES 21, ES 36, ES 26, ES 23 e ES 38), a eficiência nutricional das plantas variou conforme a combinação enxerto/porta-enxerto. Paula Neto et al. (2016) estudaram a eficiência nutricional em fósforo em 21 cultivares de *Coffea arabica* e 4 cultivares de *Coffea canephora*, alguns dos resultados foram encontrados no crescimento das plantas, altamente reduzido sob privação de P; a concentração de P na massa seca foi maior nas cultivares de *Coffea canephora* e as folhas jovens acumularam mais P que quaisquer outros tecidos.

2.3 Fungos micorrízicos arbusculares

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) formam uma associação simbiótica, endofítica, biotrófica e mutualística, desenvolvida com as raízes de plantas vasculares (BRUNDRETT, 2002; SCHULZ; BOYLE, 2005; SIQUEIRA, 1993). Esses fungos colonizam o córtex das raízes, com penetração inter e intracelular, sem alterações morfológicas visuais, por meio de modificações nas hifas, formando arbúsculos, vesículas e esporos (LAMBAIS, 1996; SIQUEIRA, 1993).

Os FMAs são de ocorrência generalizada na maioria dos ecossistemas e ambientes terrestres, colonizando cerca de 85% das espécies vegetais existentes (BRUNDRETT, 2002). Todavia, a sua distribuição e a sua eficiência são bastante variáveis e desuniformes, refletindo a ampla variabilidade genética desses organismos e suas relações com as plantas hospedeiras e com o ambiente (BRUNDRETT, 1991).

A camada superficial do solo representa o principal reservatório da sua microbiota. Dessa maneira, qualquer fator que exerça impacto sobre essa parte do perfil do solo exercerá grande influência na ecologia e nas funções dos microrganismos (HABTE et al., 1988).

A micorriza é formada pela raiz da planta hospedeira, o micélio intrarradical (incluindo a interface simbiótica), o micélio extrarradical (rede de hifas do solo, arbúsculos e ocasionalmente vesículas) e os esporos fúngicos (MERRYWEATHER; FITTER, 1998), seu estabelecimento e manutenção são influenciados por fatores do solo, da planta hospedeira e do fungo. As hifas extrarradiculares podem explorar o solo em microambientes, locais onde as raízes não chegam, favorecendo a absorção de água e nutrientes pela planta hospedeira (SAGGIN-JÚNIOR et al., 1995; TRISTÃO; ANDRADE; SILVEIRA, 2006), especialmente os de baixa mobilidade no solo, como o fósforo (ALBÁN; GUERRERO; TORO, 2013). Dessa forma, a perturbação do solo pode causar impacto na micorrização, dependendo de mudanças das condições do solo, da natureza dos propágulos fúngicos e da alteração qualitativa e quantitativa da vegetação presente (BRUNDRETT et al., 1996).

A micorriza é uma simbiose mutualística entre raízes da maioria das plantas e fungos do filo Glomeromycota (SCHÜßLER; SCHWARZOTT; WALKER, 2001). Essa simbiose se caracteriza pela penetração inter e intracelular das células do córtex radicular e formação de estruturas intracelulares denominadas arbúsculos (DOUDS; MILLNER, 1999). É uma das simbioses mais importantes entre fungo e plantas (SMITH; READ, 1997) e é considerada como a mais abundante na natureza, ocorrendo na maioria das plantas. O principal benefício para a planta hospedeira nessa simbiose é o aumento da absorção de água e nutrientes, especialmente os de baixa mobilidade no solo, como o fósforo, isso devido a um aumento de sua capacidade em explorar o solo, devido as hifas extrarradiculares. A propagação das FMAs ocorre através de esporos, do micélio e de fragmentos de raízes colonizadas, que ao infectarem as raízes da planta hospedeira, podem se desenvolver e iniciar o estabelecimento da associação micorrízica (SMITH; READ, 1997).

Os FMAs são biotróficos obrigatórios, dependentes de raiz metabolicamente ativa para o fornecimento de carboidratos e para completar seus ciclos de vida (SIQUEIRA et al., 1985).

Os esporos dos FMAs são unidades biológicas em estado de quiescência, que precisam ser ativados para desencadear os processos normais da biologia celular e as funções metabólicas que sustentam sua germinação e crescimento subsequente da fase filamentosa (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Os esporos persistem no solo e germinam espontaneamente, usando suas próprias reservas, que são metabolizadas pelo metabolismo catabólico. Entretanto, o crescimento da hifa é limitado pela utilização destas baixas quantias de carbono

armazenado (BAGO et al., 1999; BAGO; PFEFFER; SHACHAR-HILL, 2000; BÉCARD; PICHÉ, 1989). Assim, após certo período de crescimento, começa a formar septos na hifa a partir do ápice, o citoplasma recua e o esporo entra em dormência novamente, evidenciando sua necessidade obrigatória às células vivas do hospedeiro. Contudo, em algumas espécies, o esporo contém reservas suficientes para realizar múltiplas germinações, aumentando as chances de encontrar um hospedeiro apropriado (KOSKE, 1981). Segundo Moreira e Siqueira (2006), não se conhece o mecanismo exato pelo qual esses esporos são ativados a germinar. No entanto, já se tem evidências de que, antes da colonização, ocorre uma troca de sinais moleculares (o fungo reconhece seu hospedeiro) e lhe responde de modo positivo em potencial, produzindo e diferenciando seu micélio assimbiótico, mesmo sem o contato físico com o hospedeiro. É na fase extrarradicular que é produzida a maioria dos esporos, isoladamente ou em esporocarpos. Os estádios fenotípicos do ciclo da simbiose iniciam-se com a germinação dos esporos e são concluídos com a produção de novos esporos que garantem a sobrevivência do fungo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os fungos micorrízicos arbusculares merecem grande atenção devido ao caráter íntimo e obrigatório que apresentam. O potencial que eles desempenham na manutenção e na dinâmica dos ecossistemas vegetais (RILLIG, 2004) é muito importante, principalmente nas regiões tropicais, onde as reservas minerais de nutrientes no solo são muito limitadas, necessitando de uma estrutura biológica bem organizada e eficiente para o seu melhor aproveitamento. Esses fungos trazem benefícios à comunidade vegetal e ao ambiente, fornecendo nutrientes e água às plantas, assim como a agregação e a estabilidade dos solos (AUGÉ et al., 2001).

Segundo Johnson, Graham e Smith (1997), a diversidade dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) tem sido frequentemente definida em termos de respostas no crescimento das plantas, que podem variar de efeitos positivos e negativos, dependendo da combinação particular entre o fungo e a planta e das condições ambientais, uma vez que essa diversidade pode ser medida pela taxa de colonização micorrízica, a absorção de nutrientes e os efeitos no crescimento das plantas.

Entre os componentes da microbiota do solo, os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são particularmente importantes para as regiões tropicais onde predominam solos de baixa fertilidade e alta fixação de fósforo. Esses fungos encontram-se amplamente distribuídos na maioria dos ecossistemas, desde os ambientes florestais aos desérticos, em regiões tropicais, zonas temperadas e árticas e representam a mais ampla associação entre plantas e fungos encontrada na natureza (SOUZA; SILVA, 1996).

Em condições naturais, a grande maioria das espécies de plantas apresenta-se colonizada pelos FMAs, que desempenham importante função na sobrevivência, no crescimento e na nutrição das plantas, seus efeitos benéficos são mais aparentes em condições limitantes de crescimento. Para Parniske (2008), a taxa de colonização das raízes diminui quando os nutrientes estão em abundância, principalmente o P.

Dentre todos os nutrientes de plantas, o fósforo apresenta uma dinâmica peculiar no solo. Sua absorção é favorecida pelos fungos micorrízicos arbusculares, por ser um íon de lenta difusão no solo (HINSINGER, 2001), e pela forte fixação com óxidos de ferro e alumínio, o que reduz a eficiência da adubação fosfatada (STÜMER; SIQUEIRA, 2013). Essa nutrição proporcionada pelos FMA aumenta a biomassa da planta (TRISTÃO; ANDRADE; SILVEIRA, 2006), e conseqüentemente a produtividade (COLOZZI-FILHO et al., 1994). Além disso, os FMA aumentam a agregação do solo (CARNEIRO et al., 2015), a tolerância a doenças e pragas (VAAST; CASWELL-CHEN; ZASOSKI, 1998) e ao déficit hídrico (ANAYA et al., 2011).

A contribuição dos FMA para a absorção de P é de grande interesse social e econômico, pois permite maior eficiência no uso de fertilizantes fosfatados, gerando redução de custos e preservação de fontes hídricas da eutrofização (COGO et al., 2017). Além do fósforo, essa simbiose contribui para o aumento da absorção de outros nutrientes, como K, Ca, Mg, S, Cu e a redução de Mn e Zn quando em níveis tóxicos (SAGGIN-JÚNIOR et al., 1995; SIQUEIRA et al., 1995), que torna a contribuição dos FMA às plantas mais importante, o que é extremamente relevante para o aumento da produtividade do café, pois a maioria dos cultivos de café está sob solos altamente intemperizados, onde os nutrientes são escassos e fósforo (P), o cobre (Cu) e zinco (Zn) apresentam baixa mobilidade (FURTINI NETO et al., 2001). A contribuição dos FMA para a absorção de nutrientes que não são muito móveis no solo tem um interesse mais prático, pois esses nutrientes, principalmente o fósforo, têm baixa acessibilidade às raízes absorventes, lenta difusão no solo, formando uma zona de esgotamento ao redor das raízes (COGO et al., 2017).

Os cafeeiros apresentam alto grau de dependência micorrízica (SIQUEIRA; COLOZZI-FILHO, 1986), principalmente em solos com baixo teor de P disponível (KAHILUOTO; KETOJA; VESTBERG, 2012). A ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em lavouras de café é comum e é naturalmente identificada em viveiro (SIQUEIRA et al., 1987) e no campo (ARIAS et al., 2012; BEENHOUWER et al., 2015).

Em uma ampla revisão por meta-análise de vários trabalhos envolvendo fungos micorrízicos arbusculares e o cafeeiro, Cogo et al. (2017) observaram que os gêneros de

fungos que mais formam a associação simbiótica com o cafeeiro são: *Glomus*, *Acaulospora*, *Scutellospora*, *Rhizophagus* e *Gigaspora*.

O cafeeiro sombreado por leguminosas estimula o número de esporos no solo em comparação com as não leguminosas (MULETA et al., 2007). O consórcio também pode aumentar o nível de colonização micorrízica e os benefícios provenientes da micorrização (BAINARD; KLIRONOMOS; GORDON, 2011). Lammel et al. (2015) obtiveram os maiores percentuais de colonização micorrízica em cafeeiros consorciados com braquiária. O sistema radicular denso de *Brachiaria sp.* aumenta as chances de associação com fungos micorrízicos arbusculares, produzindo mais propágulos diversos no solo e aumentando a possibilidade de colonizar as raízes do cafeeiro (BAINARD; KLIRONOMOS; GORDON, 2011).

2.4 Fosfatase ácida

Os microrganismos e algumas plantas são responsáveis pela produção da maioria das fosfatases ácidas encontradas no solo, e têm sua atividade fundamental no ciclo do fósforo e na liberação desse nutriente para as plantas (TARAFDAR, 1995). A produção de fosfatases tem sido descrita principalmente em fungos micorrízicos (TARAFDAR, 1995). Embora sem estabelecer uma relação significativa, Tarafdar e Jungk (1987) mostraram que o aumento da atividade das fosfatases ácidas corresponde ao aumento da comunidade de fungos e bactérias na rizosfera de várias plantas.

A rizosfera é uma região limitada do solo que é diretamente influenciada pelas secreções de fosfatases e outras enzimas pelas raízes e micorrizas, e sustenta densas populações de microrganismos associados a raízes e de vida livre (MARGALEF et al., 2017).

Dentre as propriedades bioquímicas do solo, as enzimas são importantes para catalisar inúmeras reações necessárias para decomposição de resíduos orgânicos, formação da matéria orgânica, estrutura do solo e ciclagem de nutrientes (MENDES; VIVALDI, 2001). Devido à sensibilidade às variações bióticas e abióticas, estes atributos bioquímicos são considerados como indicadores da qualidade do solo. As fosfatases são fundamentais nos processos de transformação de compostos de fósforo orgânico e disponibilizando fontes inorgânicas de P para as plantas (AMADOR et al., 1997).

As fosfatases são enzimas que estão amplamente distribuídas na natureza, encontradas em organismos procaríotos e eucaríotos (GUIMARÃES et al., 2004). Essas enzimas são responsáveis por hidrolisar ésteres e anidridos de ácido fosfórico e participam de vários processos bioquímicos do solo, tais como, assimilação de fósforo, metabolismo intermediário

e sinalização celular. Elas catalisam a hidrólise de ésteres fosfatados produzindo fósforo solúvel e são responsáveis pela mineralização de fosfato orgânico e baixos níveis de fosfato inorgânico livre (AOYAMA et al., 2003). A atividade da fosfatase desempenha um papel fundamental na transformação de P da matéria orgânica do solo em formas disponíveis (CALDWELL, 2005).

Segundo Nahas, Centurion e Assis (1994a), as fosfatases liberadas pelas raízes das plantas e microrganismos catalisam a conversão da forma orgânica em fósforo solúvel. Em fungos, a hidrólise, absorção e armazenamento de nutrientes depende da síntese e da secreção de enzimas específicas para cada nutriente (TORRIANI-GORINI, 1994). Tarafdar, Yadav e Meena (2001) demonstraram que a atividade da fosfatase ácida de origem microbiana é mais eficiente na hidrólise dos compostos orgânicos, tais como fitinas, lecitinas e glicerofosfatos presentes no solo, quando comparada com a enzima de origem vegetal.

As fosfatases são produzidas por bactérias, fungos e raízes de plantas e servem para clivar um grupo fosfato de seus substratos, transformando formas complexas e por vezes indisponíveis de P orgânico em fosfato assimilável (MARGALEF et al., 2017).

Em Nahas, Centurion e Assis (1994b), o número de fungos produtores de fosfatase ácida no solo superou em 150% o número de fungos produtores de fosfatase alcalina; constatou ainda que os fungos possuem maior atividade da fosfatase ácida, enquanto as bactérias possuem maior atividade da fosfatase alcalina.

Grande parte do fósforo que é aplicado no solo como fertilizante rapidamente se torna indisponível para as plantas, acumulando-se em frações de fósforo inorgânico, que é fixado por absorção, precipitação química e frações de fósforo orgânico, que são imobilizados na matéria orgânica (SANYAL; DATTA, 1991). Sharpley (1985) concluiu que as plantas podem usar fosfato orgânico mais eficientemente quando o solo é enriquecido com fosfatases provenientes, por exemplo, de organismos micorrízicos. A produção de fosfatase depende da combinação da demanda de P de plantas e microrganismos, da disponibilidade de substratos orgânicos de P e da limitação de P do solo (MARGALEF et al., 2017).

O intemperismo diminui progressivamente a quantidade de formas inorgânicas primárias de P (RICHARDSON et al., 2004) até que, ultimamente, as fontes orgânicas e os minerais secundários se tornam os únicos reservatórios desse nutriente (MARGALEF et al., 2017). Nesses solos velhos e fortemente intemperizados, a atividade da fosfatase torna-se crucial para acelerar a ciclagem de P entre a matéria orgânica do solo e a absorção da planta, e é uma boa medida da capacidade dos ecossistemas para neutralizar a limitação P (TURNER; CONDRON, 2013). Evidências sugerem que a atividade da fosfatase tem importantes

consequências ecológicas e pode estar intimamente relacionada à produtividade das plantas e à diversidade de biomas. As atividades da fosfatase no solo têm sido amplamente estudadas (NANNIPIERI et al., 2011; TABATABAI, 1994).

Em muitos solos, a fração de fósforo orgânico é maior do que a inorgânica. O P orgânico pode representar até 90% do total de P em alguns solos velhos e intemperizados (JONER; VAN AARLE; VOSATKA, 2000). Por essa razão, a disponibilidade desse elemento para as plantas torna-se dependente da mineralização dos compostos orgânicos, papel este desempenhado pelas fosfatases. Essas enzimas são excretadas tanto pelas raízes das plantas quanto pelos microrganismos. No entanto, as de origem microbiana são as que predominam nos solos. Essas enzimas são induzíveis e, portanto, são sintetizadas predominantemente em condições de baixa disponibilidade de fósforo no solo (RÖSSNER et al., 1996).

Embora os mecanismos envolvidos não sejam ainda totalmente explicados, a dinâmica das frações fosfatadas liberadas pelas plantas está relacionada com a atividade de fosfatases (FERNANDES et al., 2000).

Ferreira-Nozawa et al. (2003) relatam que em fungos, a síntese e secreção de fosfatase, além de estar diretamente relacionada com os mecanismos adaptativos, tais como a condição de fósforo limitante, é influenciada também pela presença de outros elementos, como o nitrogênio, fontes de carbono e circuitos reguladores do pH. Esses mecanismos reguladores asseguram que as enzimas extracelulares somente serão sintetizadas em pH onde possam ter atividade hidrolítica efetiva.

Segundo Margalef et al. (2017), o solo contém grandes quantidades de fosfatases intracelulares (em células microbianas vivas) e fosfatases extracelulares (secreções de células vivas ou material celular morto).

Segundo Besford (1979), a determinação da atividade de fosfatases para algumas espécies vegetais pode ser utilizada como uma ferramenta de diagnose nutricional, prevendo deficiência de P nas plantas antes do aparecimento dos sintomas visuais de deficiência. No entanto, para ser utilizada como ferramenta de diagnose da nutrição fosfatada, é necessário o estabelecimento de padrões para as diversas espécies de plantas e a parte da planta a ser amostrada (ASCENCIO, 1994). Segundo Ascencio (1994), a idade, o estágio de crescimento, o número de dias sob estresse e o tempo após o início do estresse metabólico de P devem ser considerados para que a atividade da fosfatase seja utilizada como uma ferramenta de diagnose da nutrição fosfatada.

As atividades de fosfatase são ainda correlacionadas com a quantidade de matéria orgânica do solo, com a composição das comunidades microbianas, profundidade do solo e

estágio de sucessão ecológica (CALDWELL, 2005; TSCHERKO et al., 2003; WALDROP; BALSER; FIRESTONE, 2000). Distúrbios do solo, como o fogo (e a consequente redução da biomassa microbiana) e o desmatamento, também afetam negativamente a atividade dessa enzima (BOERNER; DECKER; SUTHERLAND, 2000; EIVAZI; BAYAN, 1996).

Estudando os efeitos da adubação com nitrogênio (N), fósforo (P) e a combinação de NP em 34 estudos, Marklein e Houlton (2012) descobriram que a adubação com N aumentou e a adubação com P diminuiu a atividade da fosfatase em diferentes biomas. As mudanças na atividade da fosfatase da adubação NP dependem das proporções de N e P adicionadas, em que diferentes limiares são exibidos nos diferentes biomas (ALLISON; VITOUSEK, 2005; MARKLEIN; HOULTON, 2012).

2.5 Biomassa microbiana do solo

De acordo com Moreira e Siqueira (2006), a biomassa microbiana do solo (BMS) é a parte viva da matéria orgânica do solo, composta por todos os organismos menores que $5 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$, é a principal fonte de enzimas no solo e a responsável praticamente por toda a atividade biológica, atuando como catalisador nas transformações bioquímicas, fonte e dreno de C e troca de nutrientes entre a atmosfera e o ecossistema.

Segundo Jenkinson e Powlson (1976), a biomassa microbiana do solo faz parte do componente vivo da MOS e representa de 1 a 4% do C total e 5% do N total do solo. A BMS é composta por bactérias, actinomicetos, fungos, algas e protozoários (JENKINSON; LADD, 1981). As bactérias e os fungos respondem por cerca de 90% da atividade da biomassa microbiana (SIQUEIRA et al., 1994). O tamanho da comunidade microbiana e a sua atividade determinam a intensidade com que os processos bioquímicos acontecem (CARVALHO, 2005).

A matéria orgânica do solo (MOS) representa o principal reservatório de energia para os microrganismos e de nutrientes para as plantas. Seu declínio ou acréscimo serve para avaliar a preservação dos ecossistemas naturais e os desequilíbrios dos agros ecossistemas, podendo ser utilizado como critério na avaliação da sustentabilidade desses ambientes (KAISER; MARTENS; HEINEMEYER, 1995). A matéria orgânica do solo afeta diretamente as características biológicas do solo, pois atua como fonte de carbono, energia e nutrientes para os microrganismos quimio-heterotróficos (MIELNICZUK, 1999).

A biomassa microbiana está relacionada aos processos de decomposição da matéria orgânica, interagindo com a dinâmica dos nutrientes e a regeneração da estabilidade dos agregados do solo (COTRUFO et al., 2013; VELASQUEZ; LAVELLE; ANDRADE, 2007).

A biomassa microbiana do solo é o principal componente da parte viva da matéria orgânica do solo e tem sido utilizada como indicador de alterações e de qualidade do solo. Esse uso deve-se, principalmente, à sua relação com as funções ecológicas do ambiente, bem como à capacidade que ela apresenta de refletir as mudanças no uso do solo (ARAÚJO; MELO, 2010; JACKSON et al., 2003). A BMS representa a fração mais ativa e biodegradável da matéria orgânica do solo (ROSCOE et al., 2006). Sua quantificação permite avaliar as mudanças iniciais no conteúdo da MO, causadas pelas práticas de cultivo (MERCANTE et al., 2008), refletindo tendências de mudanças na ciclagem de nutrientes, no fluxo de energia, na estrutura dos agregados do solo e, na produtividade do sistema (TÓTOLA; CHAER, 2002).

Vários atributos biológicos têm potencial para serem utilizados como indicadores da qualidade do solo. A atividade microbiana pode ser usada para entender os processos de mineralização do solo, a intensidade do fluxo de energia e monitorar a decomposição da matéria orgânica (SCHMIDT et al., 2011). A biomassa microbiana do solo tem sido destacada como um indicador sensível para a detecção de alterações ambientais em função do manejo adotado, podendo orientar o planejamento das práticas agrícolas mais sustentáveis (MATSUOKA; MENDES; LOUREIRO, 2003).

Apesar de representar pequena parte do carbono orgânico do solo, a biomassa é um indicador sensível de mudanças nesse ecossistema e os menores valores são geralmente encontrados em áreas degradadas, em comparação com áreas bem preservadas e com vegetação natural (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Turco, Kennedy e Jawson (1994) mencionaram que os organismos do solo contribuem para a manutenção da qualidade do solo pelo controle da decomposição de resíduos de animais e plantas, na participação nos ciclos de nutrientes e na formação da sua estrutura. Os autores consideram, ainda, que os microrganismos do solo são, potencialmente, um dos mais importantes marcadores biológicos disponíveis e úteis na classificação de sistemas contaminados e perturbados. Segundo Smith e Paul (1990), um sistema inicia sua recuperação não apenas devido à recolonização pelas plantas, mas é dependente da fertilidade promovida pelos microrganismos que acarretam mudanças físico-químicas nas propriedades do solo, necessárias para o crescimento das plantas.

Em um solo equilibrado, as plantas crescem em um ambiente ativo e o conteúdo mineral do solo e sua estrutura física são muito importantes para o seu desenvolvimento. Não obstante, é a vida do solo que alimenta os seus ciclos e proporciona a sua fertilidade, onde um grande número de microorganismos, que naturalmente residem no solo, executam uma ampla gama de funções essenciais (DWIVEDI; SONI, 2011).

Numerosos processos bioquímicos ocorrem no solo devido à atividade microbiana, com efeitos sobre as propriedades físicas e químicas do solo e reflexos sobre o desenvolvimento das plantas, a produtividade agrícola e a qualidade do ambiente. A biomassa microbiana representa o compartimento central do ciclo de carbono no solo e, de acordo com as condições edafoclimáticas do ecossistema e da composição dos resíduos vegetais sobre sua superfície, pode funcionar como compartimento de reserva ou como um catalisador na decomposição da matéria orgânica (MERCANTE, 2001). Dessa maneira, o carbono contido na biomassa microbiana compõe uma importante reserva de energia e pode servir de indicador para avaliar o tamanho da comunidade microbiana do solo (RICE; MOORMAN; BEARE, 1996).

Tanto a quantidade como a qualidade dos resíduos vegetais nos sistemas produtivos provocam alterações na comunidade microbiana, influenciando sua taxa de decomposição. Os microorganismos são sensíveis às modificações do solo, tornando-os adequados como indicadores biológicos. Estimativas a respeito da biomassa microbiana possibilitam associar a quantidade de nutrientes imobilizados com a fertilidade e potencial produtivo do sistema (MERCANTE, 2001).

A agricultura moderna tem demandado uma crescente necessidade de estimar de modo eficiente e rápido as modificações que ocorrem no solo. De forma geral, os indicadores, sejam eles químicos, físicos ou biológicos, servem para monitorar a qualidade do solo. A medição de diferentes propriedades ou processos que ocorrem no solo é feita de acordo com a função para a qual o solo é avaliado (SCHMITZ, 2003). A biomassa microbiana do solo pode fornecer informações importantes sobre a dinâmica de um reservatório lábil da matéria orgânica do solo (HUNGRIA; ARAÚJO, 1994).

No que diz respeito à disponibilidade de nutrientes, no metabolismo dos microorganismos ocorrem transformações que possibilitam a liberação de elementos essenciais ao desenvolvimento das plantas, representando um significativo suprimento em solos com baixa fertilidade (SILVA, 2008). A biomassa microbiana do solo é uma fonte potencial de nutrientes, em que um maior nível de biomassa microbiana do solo é um indicador de fertilidade do solo (DWIVEDI; SONI, 2011).

2.6 Purple Acid Phosphatase (PAPs) e sua expressão gênica

O fósforo (P) é um macronutriente essencial que desempenha um papel importante no crescimento e desenvolvimento das plantas (MARSCHNER; RIMMINGTON, 1988; VANCE, 2001).

Todavia, na maioria dos solos, o teor de fósforo inorgânico (Pi) é muito inferior ao necessário para o crescimento das plantas. A maioria do fósforo existente é encontrado na forma orgânica (Po) ou está fixada em cálcio, ferro e alumínio, que não podem ser utilizados diretamente pelas plantas (GEORGE; RICHARDSON, 2008).

Para sobreviver em ambientes de baixa disponibilidade de fósforo, as plantas desenvolveram uma ampla gama de respostas adaptativas para melhorar a eficiência de utilização do fósforo (CHIOU; LIN, 2011; WU et al., 2013), como o aumento da fosfatase ácida (HUR et al., 2010; LIANG et al., 2010; XIAO et al., 2006).

A fosfatase ácida púrpura (PAP) é um tipo de fosfatase ácida e contém um centro de íon metálico binuclear, que hidrolisa uma vasta quantidade de ésteres de fosfato e fosfato anidro em condições ácidas ótimas. As PAPs possuem cinco motifs conservados (**DXG/GDXXY/GNH(D/E)/VXXH/GHXXH**, letras em negrito representam resíduos invariantes), que podem coordenar o centro metálico binuclear para hidrolisar o fósforo orgânico (Po) (BOZZO; RAGHOTHAMA; PLAXTON, 2004; OLCZAK; MORAWIECKA; WATOREK, 2003; SCHENK et al., 1999). Os sete resíduos invariantes D, DY, N, H e HH foram respectivamente distribuídos nos cinco motifs conservados (LI et al., 2002; SCHENK et al., 2000).

A fosfatase ácida púrpura (PAP) é uma classe especial de fosfatase ácida (APase) que exhibe características distintas, incluindo uma cor roxa ou rosa em solução aquosa, atividade que é insensível à inibição pelo L-tartarato, e um sítio bimetálico ativo (TIAN; LIAO, 2015). As PAPs vegetais foram amplamente identificadas e caracterizadas em muitas espécies com o auxílio de tecnologias bioquímicas e moleculares. A caracterização de vários componentes moleculares, bioquímicos e aspectos funcionais das PAPs são fundamentais para entender completamente suas funções no metabolismo do fósforo (TIAN; LIAO, 2015).

Acredita-se que as PAPs desempenham um papel importante no metabolismo do P em plantas através da hidrólise dos componentes orgânicos intra e extracelulares, especialmente sob condições de baixa disponibilidade de P (DUFF; SARATH; PLAXTON, 1994; TRAN; HURLEY; PLAXTON, 2010). Tem sido sugerido que as PAPs secretadas ou associadas à parede celular captam o Pi de compostos orgânicos localizados na rizosfera, ou podem

reciclar Pi de fosfomonoésteres endógenos que extravasaram do citoplasma através da membrana plasmática (HURLEY et al., 2010; ROBINSON et al., 2012; SHANE et al., 2014; TRAN et al., 2010; VELJANOVSKI et al., 2006). Alguns outros estudos documentaram a relação positiva entre o nível de tolerância da planta à privação de P e a quantidade de PAPs liberados das raízes das plantas na rizosfera. Essas enzimas catalisam a decomposição de fosfatos orgânicos e adicionam o P dos fertilizantes ao Pi. As PAPs são altamente induzidas na privação de fósforo e podem ser secretadas ou localizadas nas organelas celulares para utilizar o Pi disponível externamente no solo ou reciclá-lo, a partir de fontes de P intracelulares (ODABAS et al., 2014).

Dentre várias estratégias para a aquisição de fósforo, considera-se a melhoria da atividade das fosfatases ácidas uma das que mais permite às plantas utilizar o fósforo orgânico (Po) extracelular e intracelular (KAIDA et al., 2010; SUN et al., 2013; WANG et al., 2014). Também, as fosfatases ácidas catalisam a clivagem do fósforo inorgânico (Pi) de uma ampla gama de fosfomonoésteres e anidridos com alta atividade abaixo de pH 7,0. Elas estão presentes em todos os organismos e participam em muitos processos fisiológicos e metabólicos, particularmente na ciclagem do fósforo (TIAN; LIAO, 2015).

A liberação de Pi de ésteres é o passo chave na utilização do Po. Fosfatases ácidas catalisam a hidrólise de Pi a partir de uma ampla gama de fosfomonoésteres e atuam otimamente em pH ácido (NANNIPIERI et al., 2011). As fosfatases tendem a ser não específicas, ou a especificidade do substrato pode ser definida, mas não estrita, e enzimas deste último tipo podem desempenhar um papel metabólico específico (DUFF; SARATH; PLAXTON, 1994, VELJANOVSKI et al., 2006). Com base na função, as fosfatases ácidas podem ser divididas em fosfatases ácidas secretadas (SAPs) e fosfatases ácidas intracelulares (IAPs). A maioria das fosfatases ácidas intracelulares estão presentes no vacúolo como proteínas solúveis, enquanto as fosfatases ácidas secretadas estão localizadas na parede celular ou secretadas na rizosfera (DUFF; SARATH; PLAXTON, 1994). Algumas fosfatases ácidas, como AtPAP26, parecem possuir ambas as funções (SAP e IAP) (VELJANOVSKI et al., 2006; TRAN et al., 2010). Todas as isoenzimas conhecidas de SAP e IAP pertencem à família das fosfatase ácidas púrpuras (PAP) (BOZZO; RAGHOTHAMA; PLAXTON, 2002, 2004).

Algumas das funções biológicas das PAPs têm sido descritas, incluindo a aquisição e utilização de P (RAVICHANDRAN et al., 2013, 2015), peroxidação (ZHANG et al., 2008) e resposta a tolerância salina (LI; SHAO; LAM, 2008; LIAO et al., 2003). Entre essas funções,

a aquisição e utilização de P é amplamente estudada e considerada o foco mais importante das pesquisas (HOLME et al., 2016; HURLEY et al., 2010; KAIDA et al., 2010).

Famílias multigênicas de PAPs vegetais têm sido relatadas em *Arabidopsis* (LI et al., 2002), arroz (ZHANG et al., 2011), soja (LI et al., 2012) e milho (GONZALEZ-MUNOZ et al., 2015). Esses estudos indicaram que há um número relativamente grande de membros da família PAP em diversas espécies de plantas. No total, o número de isoenzimas de PAP foi estimado em 29 em *Arabidopsis* (LI et al., 2002), 26 em arroz (ZHANG et al., 2011) e 35 em soja (LI et al., 2012). Além disso, vários deles tem sido estudados e demonstraram participar na utilização e mobilização do fósforo orgânico (Po). Em *Arabidopsis*, o gene AtPAP26 foi induzido na privação de fósforo inorgânico (Pi) e sua capacidade de utilizar o fósforo orgânico (Po) tem sido bem caracterizada. Plantas mutantes no gene AtPAP26 cresceram muito menores do que as plantas selvagens sob condições de deficiência de P (HURLEY et al., 2010; VELJANOVSKI et al., 2006). O AtPAP10 é outro gene da fosfatase ácida que é induzido durante a privação do fósforo inorgânico (Pi) e desempenha um papel importante na tolerância da planta à limitação do Pi (WANG et al., 2011). Em arroz, os genes OsPAP10a e OsPAP10c são induzidos na privação de Pi, e a sua super expressão aumenta as atividades de fosfatase ácida e melhora a utilização de Po externo, sugerindo que eles são importantes genes de fosfatase ácida em arroz (LU et al., 2016; TIAN et al., 2012). No milho, 33 membros da família PAP foram identificados e uma análise dos dados do transcriptoma (RNA-seq) revelou que os genes PAP foram expressados em diferentes tecidos vegetais em múltiplos estágios de desenvolvimento, sugerindo que eles são geralmente importantes, ao longo do ciclo de vida da planta (GONZALEZ-MUNOZ et al., 2015).

A purificação e caracterização de isoenzimas de fosfatase ácida expressadas pela privação de Pi revelaram que a maioria das isoenzimas de fosfatase ácida responsivas pertencem à família PAP (TIAN; LIAO, 2015). Alguns exemplos incluem LeSAP1 e LeSAP2 em tomate (BOZZO; RAGHOTHAMA; PLAXTON, 2002), NtPAP em tabaco (LUNG et al., 2008), PvPAP3 em feijão (LIANG et al., 2010), AtPAP17, AtPAP10, AtPAP12, AtPAP25 e AtPAP26 em *Arabidopsis* (DEL POZO et al., 1999; DEL VECCHIO et al., 2014; TRAN et al., 2010; VELJANOVSKI et al., 2006; WANG et al., 2011, 2014).

As duas isoenzimas PAP predominantes secretadas em meio de cultura e de paredes celulares durante a privação de Pi das células em suspensão de *Arabidopsis* foram purificadas e identificadas como AtPAP12 e AtPAP26 através de microsequenciamento N-terminal e fingerprinting em massa de peptídeos via espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz - tempo de voo (MALDI-TOF MS) (DEL VECCHIO et al., 2014;

TRAN et al., 2010). Com as sequências completas do genoma, agora disponíveis, para várias espécies de plantas, análises amplas no genoma de expressão de PAP foram conduzidas para dissecar sistematicamente suas respostas à privação de Pi (LI et al., 2002, 2012; ZHANG et al., 2011). Em *Arabidopsis*, transcritos de pelo menos quatro membros da AtPAP (AtPAP10, AtPAP11, AtPAP12, AtPAP17 e AtPAP25) são expressadas pela privação de Pi (DEL POZO et al., 1999; DEL VECCHIO et al., 2014; LI et al., 2002; ROBINSON et al., 2012; WANG et al., 2011;). No arroz, dez OsPAPs foram super expressadas e duas foram reprimidas em resposta à privação de Pi (ZHANG et al., 2011). Na soja, 23 membros de GmPAP foram super expressadas pela deficiência de P, enquanto a expressão foi reprimida por três outros membros (LI et al., 2012). Vistos de maneira conjunta esses resultados sugerem uma conservação da regulação transcricional dos genes PAP em resposta à deficiência de P em diferentes espécies vegetais.

REFERÊNCIAS

- ALBÁN, R.; GUERRERO, R.; TORO, M. Interactions between a root knot nematode (*Meloidoyne exigua*) and arbuscular mycorrhizae in coffee plant development (*Coffea arabica*). **American Journal of Plant Sciences**, Irvine, v. 4, n. 7, p. 19-23, Jan. 2013.
- ALLISON, S. D.; VITOUSEK, P. M. Responses of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 37, n. 2, p. 937–944, May 2005.
- AMADOR, J. A. A. et al. Spatial distribution of soil phosphatase activity within a riparian forest. **Soil Science**, Baltimore, v. 162, n. 11, p. 808-825, Nov. 1997.
- AMARAL, J. F. et al. Eficiência de utilização de nutrientes por cultivares de cafeeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 4, p. 621-629, abr. 2011.
- ANAYA, M. L. A. et al. Biofertilización de café orgánico en etapa de vivero en Chiapas, México. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, Texcoco, v. 2, n. 31, p. 417-431, May/June 2011.
- AOYAMA, H. et al. Proteínas tirosinas fosfatases: propriedades e funções biológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 896-900, São Paulo, nov./dez. 2003.
- ARAÚJO, A. S. F.; MELO, W. J. Soil microbial biomass in organic farming system. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 11, p. 2419-2426, nov. 2010.
- ARIAS, R. M. et al. Diversity and abundance of arbuscular mycorrhizal fungi spores under diferente coffee production systems and in a tropical montane cloud forest patch in Veracruz, Mexico. **Agroforestry Systems**, Dorchecht, v. 85, n. 1, p. 179-193, May 2012.
- ASCENCIO, J. Acid phosphatase as a diagnostic tool. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 25, n. 9/10, p. 1553-1564, June 1994.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ (ABIC). **Indicadores da indústria de café - 2018**. Rio de Janeiro: ABIC, 2018. Disponível em: <<http://abic.com.br/estatisticas/indicadores-da-industria/indicadores-da-industria-de-cafe-2018/>>. Acesso em: 9 mar. 2019.
- AUGÉ, R. M. et al. Moisture retention properties of a mycorrhizal soil. **Plant and Soil**, The Hague, v. 230, n. 1, p. 87-97, Mar. 2001.
- BAGO, B. et al. Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 121, n. 1, p. 263-272, Sept. 1999.
- BAGO, B.; PFEFFER, P. E.; SHACHAR-HILL, Y. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 124, p. 949-958, 2000.

BAINARD, L. D.; KLIRONOMOS, J. N.; GORDON, A. M. Arbuscular mycorrhizal fungi in tree-based intercropping systems: a review of their abundance and diversity. **Pedobiologia**, Jena, v. 54, n. 2, p. 57-61, Mar. 2011.

BALIGAR, V. C.; FAGERIA, N. K. Plant nutrient efficiency: towards the second paradigm. In: SIQUEIRA, J. O. et al. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Lavras: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1998. p. 183-204.

BARROS, N. F.; NOVAIS, R. F. **Relação solo-eucalipto**. Viçosa: Folha de Viçosa, 1990. 330 p.

BÉCARD, G.; PICHÉ, Y. New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 112, n. 1, p. 77-83, May 1989.

BEENHOUWER, M. et al. DNA pyrosequencing evidence for large diversity differences between natural and managed coffee mycorrhizal fungal communities. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 35, n. 1, p. 241-249, Jan. 2015.

BESFORD, R. T. Phosphorus nutrition and acid phosphatase activity in the leaves of seven plant species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 30, n. 3, p. 281-285, Mar. 1979.

BOERNER, R. E. J.; DECKER, K. L. M.; SUTHERLAND, E. K. Prescribed burning effects on soil enzyme activity in a southern Ohio hardwood forest: a landscape-scale analysis. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 32, n. 7, p. 899-908, July 2000.

BOZZO, G. G.; RAGHOTHAMA, K. G.; PLAXTON, W. C. Purification and characterization of two secreted purple acid phosphatase isozymes from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 269, n. 24, p. 6278-6286, Dec. 2002.

_____. Structural and kinetic properties of a novel purple acid phosphatase from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures. **The Biochemical Journal**, London, v. 377, n. 2, p. 419-428, Jan. 2004.

BRUNDRETT, M. C. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. **New Phytologist**, Cambridge, v. 154, n. 2, p. 275-304, May 2002.

_____. Mycorrhizas in natural ecosystems. **Advances in Ecological Research**, London, v. 21, p. 171-213, 1991.

BRUNDRETT, M. C. et al. **Working with mycorrhizas in forestry and agriculture**. Canberra: ACIAR, 1996. 374 p.

CALDWELL, B. A. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: a review. **Pedobiologia**, Jena, v. 49, n. 6, p. 637-644, Nov. 2005.

CAMARGO, M. L. P. et al. Considerações sobre eficiência nutricional em *Eucalyptus*. **Científica**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 191-196, 2004.

CARNEIRO, M. A. C. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi in soil aggregates from fields of 'murundus' converted to agriculture. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 4, p. 313-321, abr. 2015.

CARVALHO, C. H. S. et al. Cultivares de Café Arábica de porte baixo. In: CARVALHO, C. H. S. (Ed.). **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília: Embrapa Café, 2008. p. 157-226.

CARVALHO, F. **Atributos bioquímicos como indicadores da qualidade de solo em florestas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. no Estado de São Paulo**. 2005. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

CARVALHO, J. S.; PEREIRA, R. T. G. Implantação de um sistema público de certificação de propriedades cafeeiras: o caso do programa certifica Minas Café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 35., 2009, Araxá. **Anais...** Rio de Janeiro: MAPA/PROCAFÉ, 2009. p. 333-334.

CHIOU, T. J.; LIN, S. I. Signaling network in sensing phosphate availability in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 62, p. 185–206, 2011.

COGO, F. D. et al. Arbuscular mycorrhiza in *Coffea arabica* L.: review and meta-analysis. **Coffee Science**, Lavras, v. 12, n. 3, p. 419-443, jul./set. 2017.

COLOZZI-FILHO, A. et al. Efetividade de diferentes fungos endomicorrízicos na formação, crescimento pós-transplante e produção do cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 9, p. 1397-1406, set. 1994.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Observatório agrícola. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Café**, Brasília, v. 5, n. 4, quarto levantamento, p. 1-84, dez. 2018.

COTRUFO, M. F. et al. The Microbial Efficiency-Matrix Stabilization (MEMS) framework integrates plant litter decomposition with soil organic matter stabilization: do labile plant inputs form stable soil organic matter? **Global Change Biology**, Oxford, v. 19, n. 4, p. 988-995, Apr. 2013.

DEL POZO, J. C. et al. A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilising/oxidative stress conditions. **The Plant Journal**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 579–589, Sept. 1999.

DEL VECCHIO, H. A. et al. The cell-wall targeted purple acid phosphatase AtPAP25 is critical for acclimation of *Arabidopsis thaliana* to nutritional phosphorus-deprivation. **The Plant Journal**, Oxford, v. 80, n. 4, p. 569–581, Nov. 2014.

DIAS-JÚNIOR, H. E. et al. Metais pesados, densidade e atividade microbiana em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 22, n. 4, p. 631-640, nov. 1998.

- DOUDS, D. D.; MILLNER, P. D. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Oxford, v. 74, n. 1/3, p. 77-93, June 1999.
- DUFF, S. M. G.; SARATH, G.; PLAXTON, W. C. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 90, n. 4, p. 791–800, Apr. 1994.
- DUNCAN, R. R.; BALIGAR, V. C. Genetics and physiological basis of nutrient uptake and use efficiency. In: BALIGAR, V. C.; DUNCAN, R. R. (Ed.). **Crops as enhancers of nutrient use**. New York: Academic Press, 1990. p. 3-35.
- DWIVEDI, V.; SONI, P. A review on the role of soil microbial biomass in ecorestoration of degraded ecosystem with special reference to mining areas. **Journal of Applied and Natural Science**, Bethesda, v. 3, n. 1, p. 151-158, June 2011.
- EIVAZI, F.; BAYAN, M. R. Effects of long-term prescribed burning on the activity of select soil enzymes in an oak-hickory forest. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 26, n. 10, p. 1799–1804, Feb. 1996.
- FAGERIA, N. K. Otimização da eficiência nutricional na produção das culturas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 2, n. 1, p. 6-16, jan./abr. 1998.
- FAZUOLI, L. C. et al. Cultivares de Café Arabica de Porte Alto. In: CARVALHO, C. H. S. (Ed.). **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília: Embrapa Café, 2008. p. 227-254.
- FERNANDES, L. A. et al. Frações de fósforo e atividade da fosfatase ácida em plantas de feijoeiro cultivadas em solos de várzea. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, n. 3, p. 561-571, set. 2000.
- FERREIRA-NOZAWA, M. S. et al. The dermatophyte *Trichophyton rubrum* secretes an EDTA-sensitive alkaline phosphatase on high-phosphate medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 161-164, abr./jun. 2003.
- FURTINI NETO, A. E. et al. **Fertilidade do solo**. Lavras: FAEPE, 2001. 252 p.
- GEORGE, T. S.; RICHARDSON, A. E. Potential and limitations to improving crops for enhanced phosphorus utilization. In: HAMMOND, J. P.; WHITE, P. J. (Ed.). **The ecophysiology of plant-phosphorus interactions**. Dordrecht: Springer, 2008. p. 247–270.
- GONZALEZ-MUNOZ, E. et al. The maize (*Zea mays* ssp. *mays* var. B73) genome encodes 33 members of the purple acid phosphatase family. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, p. 341, May 2015.
- GUIMARÃES, L. H. S. et al. Characterization and properties of acid phosphatases with phytase activity produced by *Aspergillus caespitosus*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, San Diego, v. 40, n. 2, p. 201-207, Oct. 2004.

- HABTE, M. et al. Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with erosion in an oxisol. **Applied of Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 4, p. 945-950, Apr. 1988.
- HINSINGER, P. Biology availability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. **Plant and Soil**, The Hague, v. 237, n. 2, p. 173-195, Jan. 2001.
- HOLME, I. B. et al. Barley HvPAPhy_a as transgene provides high and stable phytase activities in mature barley straw and in grains. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 15, n. 4, p. 415–422, Apr. 2016.
- HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. Manual de métodos empregados em estudos de Microbiologia Agrícola. In: WARDLE, D. A. **Metodologia para quantificação da biomassa microbiana do solo**. Brasília: Embrapa, 1994. cap. 21, p. 419-436.
- HUR, Y. J. et al. Molecular characterization of OsPAP2: transgenic expression of a purple acid phosphatase up-regulated in phosphate-deprived rice suspension cells. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 32, n. 1, p. 163–170, Jan. 2010.
- HURLEY, B. A. et al. The dual-targeted purple acid phosphatase isozyme AtPAP26 is essential for efficient acclimation of *Arabidopsis* to nutritional phosphate deprivation. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 153, n. 3, p. 1112–1122, July 2010.
- JACKSON, L. E. et al. Responses of soil microbial processes and community structure to tillage events and implications for soil quality. **Geoderma**, Amsterdam, v. 114, n. 3/4, p. 305-317, June 2003.
- JENKINSON, D. S.; LADD, J. N. Microbial biomass in soils: measurement and turnover. In: PAUL, E. A.; LADD, J. N. (Ed.). **Soil biochemistry**. New York: Dekker, 1981. v. 5, p. 415-471.
- JENKINSON, D. S.; POWLSON, D. S. The effect of biocidal treatments on metabolism in soil – V: a method of measuring soil biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 8, n. 3, p. 209-213, 1976.
- JOHNSON, N. C.; GRAHAM, J. H.; SMITH, F. A. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. **New Phytologist**, Cambridge, v. 135, n. 4, p. 575-585, Apr. 1997.
- JONER, E. J.; VAN AARLE, I. M.; VOSATKA, M. Phosphatase activity of extra-radical arbuscular mycorrhizal hyphae: a review. **Plant and Soil**, The Hague, v. 226, n. 2, p. 199-210, Nov. 2000.
- KAHILUOTO, H.; KETOJA, E.; VESTBERG, M. Plant-available P supply is not the main factor determining the benefit from arbuscular mycorrhiza to crop P nutrition and growth in contrasting cropping systems. **Plant and Soil**, The Hague, v. 350, n. 1/2, p. 85-98, Jan. 2012.
- KAIDA, R. et al. Potential role for purple acid phosphatase in the dephosphorylation of wall proteins in tobacco cells. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 153, n. 2, p. 603–610, June 2010.

KAISER, E. A.; MARTENS, R.; HEINEMEYER, O. Temporal changes in soil microbial biomass carbon in an arable soil: consequences for soil sampling. **Plant and Soil**, The Hague, v. 170, n. 2, p. 287-295, Mar. 1995.

KOSKE, R. Multiple germination by spores of *Gigaspora gigantea*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 76, n. 2, p. 328-330, Feb. 1981.

LAMBAIS, M. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da relação fungo-planta em micorrizas arbusculares. In: SIQUEIRA, J. O. (Ed.). **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras: Ed. UFLA, 1996. p. 5-38.

LAMMEL, D. R. et al. Microbiological and faunal soil attributes of coffee cultivation under different management systems in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 75, n. 4, p. 894-905, nov. 2015.

LI, B.; MCKEAND, S. E.; ALLEN, H. L. Genetic variation in nitrogen use efficiency of loblolly pine seedlings. **Forest Science**, Bethesda, v. 37, n. 2, p. 613-626, June 1991.

LI, C. et al. Identification of soybean purple acid phosphatase genes and their expression responses to phosphorus availability and symbiosis. **Annals Botany**, Oxford, v. 109, n. 1, p. 275-285, Jan. 2012.

LI, D. et al. Purple acid phosphatases of *Arabidopsis thaliana*. Comparative analysis and differential regulation by phosphate deprivation. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 31, p. 27772-27781, Aug. 2002.

LI, W. Y.; SHAO, G.; LAM, H. M. Ectopic expression of GmPAP3 alleviates oxidative damage caused by salinity and osmotic stresses. **New Phytologist**, London, v. 178, n. 1, p. 80-91, 2008.

LIANG, C. et al. Biochemical and molecular characterization of PvPAP3, a novel purple acid phosphatase isolated from common bean enhancing extracellular ATP utilization. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 152, n. 2, p. 854-865, Feb. 2010.

LIAO, H. et al. GmPAP3, a novel purple acid phosphatase-like gene in soybean induced by NaCl stress but not phosphorus deficiency. **Gene**, Amsterdam, v. 318, p. 103-111, Oct. 2003.

LU, L. et al. OsPAP10c, a novel secreted acid phosphatase in rice, plays an important role in the utilization of external organic phosphorus. **Plant Cell & Environment**, Oxford, v. 39, n. 10, p. 2247-2259, Oct. 2016.

LUNG, S. C. et al. Phytase activity in tobacco (*Nicotiana tabacum*) root exudates is exhibited by a purple acid phosphatase. **Phytochemistry**, Oxford, v. 69, n. 2, p. 365-373, Jan. 2008.

MALAVOLTA, E. **Nutrição mineral e adubação do cafeeiro**: colheitas econômicas máximas. São Paulo: Agronômica Ceres, 1993. 43 p.

MARGALEF, O. et al. Global patterns of phosphatase activity in natural soils. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 1337, p. 1-13, Dec. 2017.

MARKLEIN, A. R.; HOULTON, B. Z. Nitrogen inputs accelerate phosphorus cycling rates across a wide variety of terrestrial ecosystems. **New Phytologist**, London, v. 193, n. 3, p. 696–704, Feb. 2012.

MARSCHNER, H.; RIMMINGTON, G. Mineral nutrition of higher plants. **Plant Cell & Environment**, Oxford, v. 11, p. 147–148, 1988.

MARTINEZ, H. E. P. et al. Comportamento de variedades de soja cultivadas sob diferentes níveis de fósforo. II. Translocação do fósforo absorvido e eficiência nutricional. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 239-244, 1993.

MATSUOKA, M.; MENDES, I. C.; LOUREIRO, M. F. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste – MT. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 425-433, maio/jun. 2003.

MENDES, I. C.; VIVALDI, L. Dinâmica da biomassa e atividade microbiana em uma área sob mata de galeria na região do DF. In: RIBEIRO, J. F.; FONSECA, C. E. L.; SOUSASILVA, J. C. (Ed.). **Cerrado: caracterização e recuperação de Matas de Galeria**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 2001. p. 664-687.

MERCANTE, F. M. Biomassa e atividade microbiana: indicadores de qualidade do solo. **Direto no Cerrado**, Brasília, p. 9-10, 2001.

MERCANTE, F. M. et al. Biomassa microbiana, em um Argissolo Vermelho, em diferentes coberturas vegetais, em área cultivada com mandioca. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 4, p. 479-485, out./dez. 2008.

MERRYWEATHER, J. W.; FITTER, A. The arbuscular mycorrhizal fungi of *hyacinthoides non-scripta*: II: seasonal and spatial patterns of fungal populations. **New Phytologist**, Cambridge, v. 138, n. 1, p. 131-142, Jan. 1998.

MIELNICZUK, J. Matéria orgânica e a sustentabilidade de sistemas agrícolas. In: SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. (Ed.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo, ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Genesis, 1999. p. 1-8.

MOLICA, S. G. **Produção de biomassa e eficiência nutricional de híbridos interespecíficos de eucalipto, em duas regiões bioclimáticas de Minas Gerais**. 1992. 84 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1992.

MOREIRA, F. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia bioquímica do solo**. 2. ed. atual. e ampl. Lavras: Ed. UFLA, 2006. 729 p.

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

NAHAS, E.; CENTURION, J. F.; ASSIS, L. C. Efeito das características químicas dos solos sobre os microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 18, p. 49-53, 1994a.

_____. Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 18, p. 43-48, 1994b.

NANNIPIERI, P. et al. Role of phosphatase enzymes in soil. In: BUNEMANN, E. K.; OBERSON, A.; FROSSARD, E. (Ed.). **Phosphorus in action**. Berlin: Springer, 2011. p. 215–243.

ODABAS, M. S. et al. Quantifying impact of droughts on barley yield in North Dakota, USA using multiple linear regression and artificial neural network. **Neural Network World**, Cambridge, v. 24, n. 4, p. 343–355, Sept. 2014.

OLCZAK, M.; MORAWIECKA, B.; WATOREK, W. Plant purple acid phosphatases-genes, structures and biological function. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 50, n. 4, p. 1245–1256, 2003.

PARNISKE, M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. **Nature**, London, v. 6, n. 10, p. 763-775, Oct. 2008.

PAULA NETO A. et al. Analysis of phosphorus use efficiency traits in *Coffea* genotypes reveals *Coffea arabica* and *Coffea canephora* have contrasting phosphorus uptake and utilization efficiencies. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, p. 408, Mar. 2016.

PAULA, R. C. et al. Controle genético da eficiência de utilização de fósforo em famílias de meios-irmãos de *Eucalyptus grandis*, em casa de vegetação. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 12, n. 1, p. 25-34, jan./fev. 2003.

_____. Estimativas de parâmetros genéticos em famílias de meios-irmãos de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. II. Eficiência de utilização de nutrientes. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 20, n. 4, p. 483- 493, 1996.

PEREIRA, A. A. et al. Cultivares: origem e suas características. In: REIS, P. R.; CUNHA, R. L. (Ed.). **Café arábica do plantio a colheita**. Lavras: EPAMIG, 2010. p. 163-222.

PEREIRA, J. B. D. **Eficiência nutricional de nitrogênio e de potássio em plantas de café (*Coffea arabica* L.)**. 1999. 99 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

POZZA, A. A. A. et al. Suprimento do silicato de cálcio e a eficiência nutricional de variedades de cafeeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1705-1714, dez. 2009.

RAVICHANDRAN, S. et al. Optimal level of purple acid phosphatase5 is required for maintaining complete resistance to *Pseudomonas syringae*. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, p. 568, Aug. 2015.

_____. Purple Acid Phosphatase5 is required for maintaining basal resistance against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. **BMC Plant Biology**, London, v. 13, p. 107, July 2013.

REIS JÚNIOR, R. A.; MARTINEZ, H. E. P. Adição de Zn e absorção, translocação e utilização de Zn e P por variedades de cafeeiro. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 3, p. 537-542, jul./set. 2002.

RENELLA, G. et al. Microbial activity and hydrolase synthesis in long-term Cd-contaminated soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 37, n. 1, p. 133-139, Jan. 2005.

RICE, C. W.; MOORMAN, T. B.; BEARE, M. Role of microbial biomass carbon and nitrogen in soil quality. In: DORAN, J. W.; JONES, A. J. (Ed.). **Methods for assessing soil quality**. Madison: SSSA, 1996. p. 203-215. (SSSA Special Publications, 39).

RICHARDSON, S. J. et al. Rapid development of phosphorus limitation in temperate rainforest along the Franz Josef soil chronosequence. **Oecologia**, Berlin, v. 139, n. 2, p. 267–276, Apr. 2004.

RILLIG, M. C. Arbuscular mycorrhizae and terrestrial ecosystem processes. **Ecology Letters**, Oxford, v. 7, n. 8, p. 740-754, Aug. 2004.

ROBINSON, W. D. et al. The secreted purple acid phosphatase isozymes AtPAP12 and AtPAP26 play a pivotal role in extracellular phosphate-scavenging by *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 18, p. 6531–6542, 2012.

ROSCOE, R. et al. Biomassa microbiana do solo: fração mais ativa da matéria orgânica. In: ROSCOE, R.; MERCANTE, F. M.; SALTON, J. C. (Ed.). **Dinâmica da matéria orgânica do solo em sistemas conservacionistas: modelagem matemática e métodos auxiliares**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2006. p. 163-198.

RÖSSNER, H. et al. Indirect estimation of microbial biomass. In: SCHINNER, F. et al. (Ed.). **Methods in soil biology**. Heidelberg: Springer Verlag, 1996. p. 47-75.

SAGGIN-JÚNIOR, O. J. et al. Avaliação da eficiência simbiótica de fungos endomicorrízicos para o cafeeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 221-228, 1995.

SANDS, R.; MULLIGAN, D. R. Water and nutrient dynamics and tree growth. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 30, n. 1/4, p. 91-111, Feb. 1990.

SANTANA, R. C.; BARROS, N. F.; NEVES, J. C. L. Eficiência de utilização de nutrientes e sustentabilidade da produção em procedências de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus saligna* em sítios florestais do Estado de São Paulo. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 4, p. 447-457, jul./ago. 2002.

SANYAL, S. K.; DATTA, de S. K. Chemistry of phosphorus transformation in soil. In: STEWART, B. A. (Ed.). **Advances in Soil Science**. New York: Springer Verlag, 1991. p. 1-120.

SCHENK, G. et al. Binuclear metal centers in plant purple acid phosphatases: Fe–Mn in sweet potato and Fe–Zn in soybean. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 370, n. 2, p. 183–189, Oct. 1999.

_____. Identification of mammalian-like purple acid phosphatases in a wide range of plants. **Gene**, Amsterdam, v. 250, n. 1/2, p. 117–125, May 2000.

SCHMIDT, M. W. et al. Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. **Nature**, London, v. 478, n. 7367, p. 49-56, Oct. 2011.

SCHMITZ, J. A. K. **Indicadores biológicos de qualidade do solo**. 2003. 233 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, n. 6, p. 661-686, June 2005.

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

SHANE, M. W. et al. Senescence-inducible cell-wall and intracellular purple acid phosphatases: implications for phosphorus remobilization in *Hakea prostrata* (Proteaceae) and *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 20, p. 6097–6106, Nov. 2014.

SHARPLEY, A. N. Phosphorus cycling in unfertilized and fertilized agricultural soils. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 49, n. 4, p. 905–911, July 1985.

SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M. Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 4, n. 3, p. 289-302, 1981.

SILVA, L. G. **Uso e monitoramento de indicadores microbiológicos para avaliação da qualidade dos solos de cerrado sob diferentes agroecossistemas**. 2008. 121 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

SILVA, S. R. et al. Eficiência nutricional de potássio e crescimento de eucalipto influenciados pela compactação do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 26, n. 4, p. 1001-1010, out./dez. 2002.

SIQUEIRA, J. O. **Biologia do solo**. Lavras: Ed. UFLA/FAEPE, 1993. 230 p.

SIQUEIRA, J. O. et al. Influência do substrato de formação e da micorriza no crescimento de mudas de caféiro transplantadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 12, p. 1417-1425, dez. 1995.

_____. **Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental**. Brasília: Embrapa–SPI, 1994. 142 p. (Documentos, 45).

_____. Spores, germination, and germ tubes of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 31, n. 11, p. 965–997, 1985.

SIQUEIRA, J. O.; COLOZZI-FILHO, A. Micorrizas vesículo-arbusculares em mudas de cafeeiro: II., efeito do fósforo no estabelecimento e funcionamento da simbiose. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 10, n. 3, p. 207-211, 1986.

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

SMITH, J. L.; PAUL, E. A. The significance of soil microbial biomass estimations. In: BOLLAG, J. M.; STOTZKY, G. (Ed.). **Soil biochemistry**. New York: M. Dekker, 1990. p. 357-396.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 2. ed. New York: Academic Press, 1997. 604 p.

SOUZA, F. A.; SILVA, E. M. R. Micorrizas arbusculares na revegetação de áreas degradadas. In: SIQUEIRA, J. O. (Ed.). **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras: Ed. UFLA/DCS/DCF, 1996. p. 255-290.

STÜMER, S. L.; SIQUEIRA, J. O. Fungos micorrízicos. In: MOREIRA, F. S. (Ed.). **O ecossistema solo**. Lavras: Ed. UFLA, 2013. p. 289-310.

SUN, F. et al. Global transcriptome analysis of AtPAP2–overexpressing *Arabidopsis thaliana* with elevated ATP. **BMC Genomics**, London, v. 14, p. 752, Nov. 2013.

SWIADER, J. M.; CHYAN, Y.; FREIJI, F. G. Genotypic differences in nitrate uptake and utilization efficiency in pumpkin hybrids. **Journal of Plant Nutrition**, Alexandria, v. 17, n. 10, p. 1687-1699, 1994.

TABATABAI, M. A. Enzymes. In: WEAVER, R. W. et al. (Ed.). **Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 775-833.

TARAFDAR, J. C. Visual demonstration of in vivo acid phosphatases activity of VA mycorrhizal fungi. **Current Science**, Columbus, v. 69, n. 6, p. 541-543, Sept. 1995.

TARAFDAR, J. C.; JUNGK, A. Phosphatase in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 3, n. 4, p. 199–204, Dec. 1987.

TARAFDAR, J. C.; YADAV, R. S.; MEENA, S. C. Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 164, n. 3, p. 279-282, June 2001.

TIAN, J. et al. Overexpression of OsPAP10a, a root-associated acid phosphatase, increased extracellular organic phosphorus utilization in rice. **Journal of Integrative Plant Biology**, Carlton South, v. 54, n. 9, p. 631–639, Sept. 2012.

- TIAN, J.; LIAO, H. The role of intracellular and secreted purple acid phosphatases in plant phosphorus scavenging and recycling. In: PLAXTON, W. C.; LAMBERS, H. (Ed.). **Annual plant reviews: phosphorus metabolism in plants**. Hoboken: J. Wiley & Sons, 2015. v. 48, p. 265–288.
- TOMAZ, M. A. et al. Eficiência de absorção e utilização de boro, zinco, cobre e manganês em mudas enxertadas de cafeeiro. **Ceres**, Viçosa, v. 58, n. 1, p. 108-114, fev. 2011.
- TOMAZ, M. A.; AMARAL, J. F. T. Eficiência nutricional em plantas. In: POLANCZYK, R. A. et al. **Estudos avançados em produção vegetal**. Alegre: Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, 2008. v. 1, p. 23-41.
- TORRIANI-GORINI, A. Introduction: regulation of phosphate metabolism and transport. In: TORRIANI-GORINI, A.; YAGIL, E.; SILVER, S. (Ed.). **Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994. p. 1-4.
- TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: ALVAREZ V., V. H. et al. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do solo, 2002. v. 2, p. 195-276.
- TRAN, H. T. et al. Biochemical and molecular characterization of AtPAP12 and AtPAP26: the predominant purple acid phosphatase isozymes secreted by phosphate-starved *Arabidopsis thaliana*. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 33, n. 11, p. 1789–1803, Nov. 2010.
- TRAN, H. T.; HURLEY, B. A.; PLAXTON, W. C. Feeding hungry plants: the role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition. **Plant Science**, Limerick, v. 179, n. 1/2, p. 14–27, July/Aug. 2010.
- TRISTÃO, F. S. M.; ANDRADE, S. A. L.; SILVEIRA, A. P. D. Fungos micorrízicos arbusculares na formação de mudas de cafeeiro, e, substrato orgânico comerciais. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 4, p. 649-658, 2006.
- TSCHERKO, D. et al. Functional diversity of the soil microflora in primary succession across two glacier forelands in the Central Alps. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 54, n. 4, p. 685–696, Dec. 2003.
- TURCO, R. F.; KENNEDY, A. C.; JAWSON, M. D. Microbial indicators of soil quality. In: DORAN, J. W. et al. (Ed.). **Defining soil quality for a sustainable environment**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 73-90.
- TURNER, B. L.; CONDRON, L. M. Pedogenesis, nutrient dynamics, and ecosystem development: the legacy of T.W. Walker and J.K. Syers. **Plant and Soil**, The Hague, v. 367, n. 1, p. 1-10, June 2013.
- VAAST, P.; CASWELL-CHEN, E. P.; ZASOSKI, R. J. Influences of a root-lesion nematode, *Pratylenchus coffeae*, and two arbuscular mycorrhizal fungi, *Acaulospora mellea* and *Rhizophagus clarus* on coffee (*Coffea arabica* L.). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 26, n. 2, p. 130-135, Dec. 1998.

VANCE, C. P. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 127, n. 2, p. 390–397, Oct. 2001.

VÁSQUEZ-MURRIETA, M. S. et al. C and N mineralization and microbial biomass in heavy-metal contaminated soil. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 42, n. 2, p. 89-98, Apr./June 2006.

VELASQUEZ, E.; LAVELLE, P.; ANDRADE, M. GISQ, a multifunctional indicator of soil quality. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n. 12, p. 3066-3080, Dec. 2007.

VELJANOVSKI, V. et al. Biochemical and molecular characterization of AtPAP26, a vacuolar purple acid phosphatase up-regulated in phosphate-deprived *Arabidopsis* suspension cells and seedlings. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 142, n. 3, p. 1282–1293, Nov. 2006.

WALDROP, M.; BALSER, T.; FIRESTONE, M. Linking microbial community composition to function in a tropical soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 32, n. 13, p. 1837–1846, Nov. 2000.

WANG, L. et al. Comparative genetic analysis of *Arabidopsis* purple acid phosphatases AtPAP10, AtPAP12, and AtPAP26 provides new insights into their roles in plant adaptation to phosphate deprivation. **Journal of Integrative Plant Biology**, Carlton South, v. 56, n. 3, p. 299–314, Mar. 2014.

_____. The *Arabidopsis* purple acid phosphatase AtPAP10 is predominantly associated with the root surface and plays an important role in plant tolerance to phosphate limitation. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 157, n. 3, p. 1283–1299, Nov. 2011.

WU, P. et al. Improvement of phosphorus efficiency in rice on the basis of understanding phosphate signaling and homeostasis. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 16, n. 2, p. 205–212, May 2013.

XIAO, K. et al. Improved phosphorus acquisition and biomass production in *Arabidopsis* by transgenic expression of a purple acid phosphatase gene from *M. truncatula*. **Plant Science**, Limerick, v. 170, n. 2, p. 191–202, Feb. 2006.

ZHANG, Q. et al. Identification of rice purple acid phosphatases related to phosphate starvation signaling. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 13, n. 1, p. 7–15, Jan. 2011.

ZHANG, W. et al. An *Arabidopsis* purple acid phosphatase with phytase activity increases foliar ascorbate. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 146, n. 2, p. 431–440, Feb. 2008.

CAPÍTULO 2 EFICIÊNCIA NO USO DO FÓSFORO E PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS DO SOLO EM CAFEIROS ARÁBICA

RESUMO

Eficiência nutricional é um termo utilizado para caracterizar plantas em sua capacidade de absorver e utilizar nutrientes, e está relacionado à eficiência de absorção, translocação e utilização dos nutrientes. A parte viva do solo exerce um papel fundamental em diversos processos físicos, químicos e bioquímicos nos solos. Espera-se que diferentes genótipos de cafeeiro apresentem variabilidade na sua eficiência nutricional e na sua interação com a microbiota do solo. Objetivou-se com este trabalho avaliar a eficiência nutricional em fósforo e parâmetros microbiológicos do solo em cafeeiros arábica. O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), situada no município de Lavras – MG. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, em esquema fatorial 10x2 (10 genótipos de cafeeiro arábica e duas dosagens de adubação fosfatada), com quatro repetições. Cada parcela experimental consistiu em um vaso com dez litros de solo, com uma planta. O solo utilizado foi proveniente de camada subsuperficial e não recebeu nenhum tipo de inoculação microbiológica. As adubações foram feitas por meio de soluções nutritivas. O experimento permaneceu por oito meses em casa de vegetação, e, em seguida, desmontado e as amostras de solo e material vegetal de cada parcela foram coletadas para as análises. Foram analisadas as variáveis: massa seca, fósforo disponível no solo por extrator Mehlich-1, fósforo disponível no solo por extrator “resina trocadora de íons”, fósforo remanescente no solo, teor de fósforo na raiz da planta, teor de fósforo na parte aérea da planta, acúmulo de fósforo na raiz, acúmulo de fósforo na parte aérea, acúmulo de fósforo na planta, taxa fotossintética líquida, condutância estomática, concentração intracelular de CO₂, transpiração, densidade de esporos de micorrizas, colonização micorrízica, atividade da fosfatase ácida e carbono da biomassa microbiana. Também foram calculados alguns índices de eficiência nutricional como: eficiência na absorção de fósforo, eficiência na translocação de fósforo, eficiência de uso de fósforo na raiz, eficiência de uso de fósforo na parte aérea, eficiência de uso de fósforo na planta e eficiência agrônômica de uso de fósforo. As cultivares Catiguá MG2, MGS Ametista e Sarchimor MG 8840 não são eficientes e nem responsivas à adubação fosfatada. A progênie H 6-47-10 pl. 3 e a cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 não são eficientes, mas são responsivas à adubação fosfatada. As cultivares Paraíso MG H 419-1, Topázio MG 1190 e MGS Paraíso 2 são eficientes, mas não são responsivas à adubação fosfatada. As cultivares Bourbon Amarelo IAC J10 e MGS Aranãs são eficientes e responsivas à adubação fosfatada. A adubação fosfatada influencia positivamente no carbono da biomassa microbiana e negativamente na densidade de esporos de micorrizas. Genótipos de cafeeiro arábica respondem positivamente tanto com adubação fosfatada (MGS Ametista) quanto sem adubação fosfatada (MGS Paraíso 2) em atividade de fosfatase ácida.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. Cultivares. Nutrição mineral. Biomassa microbiana. Micorrizas. Fosfatase ácida.

ABSTRACT

Nutritional efficiency is a term used to characterize plants in their capacity to uptake and use nutrients, being related to the efficiency of absorption, translocation and utilization of nutrients. The living part of the soil plays a fundamental role in several physical, chemical and biochemical processes in soils. Different coffee genotypes are expected to exhibit variability in their nutritional efficiency and in their interaction with the soil microbiota. This work aimed to evaluate the nutritional efficiency in phosphorus and soil microbiological parameters in arabica coffee. The experiment was conducted in a greenhouse of the Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), located in the municipality of Lavras – Minas Gerais, Brazil. The experimental design was a randomized complete block design, in a 10x2 factorial scheme (10 arabica coffee genotypes and two dosages of phosphate fertilization), with four replications. Each experimental plot consisted of one pot with ten liters of soil, with one plant. The soil used came from subsurface layer and did not receive any type of microbiological inoculation. Fertilization was done through nutrient solutions. The experiment lasted for eight months in a greenhouse and was then dismantled and the soil and plant material samples from each plot were collected for analysis. The following variables were analyzed: dry mass, available phosphorus in the soil by Mehlich-1 extractor, available soil phosphorus by "ion exchange resin" extractor, remaining phosphorus in soil, phosphorus content in plant root, phosphorus content in shoot of the plant, accumulation of phosphorus in the root, accumulation of phosphorus in the shoot, accumulation of phosphorus in the plant, net photosynthetic rate, stomatal conductance, intracellular CO₂ concentration, transpiration, mycorrhizal spore density, mycorrhizal colonization, acid phosphatase activity and microbial biomass carbon. Also, some nutritional efficiency indexes were calculated, such as: phosphorus absorption efficiency, phosphorus translocation efficiency, phosphorus use efficiency in the root, phosphorus use efficiency in the shoot, phosphorus use efficiency in the plant, and agronomic efficiency of phosphorus use. The cultivars Catiguá MG2, MGS Ametista and Sarchimor MG 8840 are neither efficient nor responsive to phosphate fertilization. Progeny H 6-47-10 pl. 3 and the cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 are not efficient but are responsive to phosphate fertilization. The cultivars Paraíso MG H 419-1, Topázio MG 1190 and MGS Paraíso 2 are efficient but are not responsive to phosphate fertilization. The cultivars Bourbon Amarelo IAC J10 and MGS Aranãs are efficient and responsive to phosphate fertilization. Phosphate fertilization has a positive influence on the microbial biomass carbon and negatively on mycorrhizal spores density. Genotypes of arabica coffee respond positively both with phosphate fertilization (MGS Ametista) and without phosphate fertilization (MGS Paraíso 2) in acid phosphatase activity.

Keywords: *Coffea arabica*. Cultivars. Mineral nutrition. Microbial biomass. Mycorrhiza. Acid phosphatase.

1 INTRODUÇÃO

O cafeeiro, assim como qualquer planta, necessita de vários nutrientes para completar o seu ciclo vegetativo e reprodutivo. As espécies vegetais apresentam variabilidade na sua exigência nutricional, tanto qualitativamente quanto quantitativamente e, além disso, apresentam essa variabilidade até mesmo dentro da própria espécie, em que diferentes cultivares podem apresentar exigências nutricionais específicas.

Um genótipo com alta eficiência nutricional é uma planta altamente eficiente na utilização de nutrientes, mesmo em condições adversas, tais como de baixa fertilidade do solo, de poucos recursos hídricos ou de excesso de sais, podendo ser o caminho para a obtenção de maiores produtividades, ou mesmo na seleção de material genético superior (CAMARGO et al., 2004). Um dos grandes desafios da agricultura moderna é a utilização de estratégia de adaptação de plantas a solos de baixa fertilidade. Nesses casos, há duas alternativas: elevar a fertilidade dos solos pelo uso de corretivos e fertilizantes, ou empregar cultivares eficientes no uso de nutrientes (POZZA et al., 2009).

A crescente demanda de nutrientes por cultivares de café (que estão cada vez mais produtivas), assim como a expansão dessas lavouras para solos de baixa fertilidade, exige melhor compreensão da dinâmica dos nutrientes nessa cultura, evitando-se, assim, deficiência nutricional (REIS JÚNIOR; MARTINEZ, 2002).

Informações com relação à nutrição mineral do cafeeiro são encontradas na literatura, como questões referentes à absorção, ao transporte e à redistribuição de nutrientes, existindo a possibilidade de melhorar ou selecionar cultivares mais eficientes quanto ao uso de nutrientes. Hoje em dia, porém, devido às mais diversas condições de cultivo existentes e com novas cultivares disponíveis aos produtores, necessita-se de novos estudos para mensurar a eficiência nutricional dessas novas cultivares.

Como exemplo, diferenças nas exigências nutricionais do cafeeiro, a cultivar ‘Catuaí’, comparada à ‘Mundo Novo’, é menos exigente em N e P, mais exigente em K, Ca, B, Fe, Mn e Zn e, praticamente, apresentam a mesma exigência em Mg, S e Cu (MALAVOLTA, 1993). Pereira (1999) também discriminou linhagens de cafeeiros arábicos com base na eficiência de utilização de N e K. Em um amplo estudo, Amaral et al. (2011) testaram as exigências nutricionais de N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu e Zn na produção de raiz e de parte aérea entre diferentes cultivares de cafeeiro (Acaiaí IAC 474-19, Icatu Amarelo IAC 3282, Rubi MG 1192 e Catuaí Vermelho IAC 99) e três níveis de adubação (baixo, normal e alto), concluíram que a eficiência de utilização de nutrientes para produção de raízes e uso de nutrientes pela parte

aérea de cafeeiros foi diferenciada entre as cultivares. Tomaz et al. (2011) estudaram a eficiência de absorção e utilização de B, Zn, Cu e Mn em mudas enxertadas de cafeeiro, onde utilizou-se como enxerto quatro genótipos de *Coffea arabica* (Catuaí Vermelho IAC 15, Oeiras MG 6851 e as progênes H 419-10-3-4-4 e H 514-5-5-3) e como porta-enxerto cinco progênes de *Coffea canephora* cv. Conilon (ES 21, ES 36, ES 26, ES 23 e ES 38), e a eficiência nutricional das plantas variou conforme a combinação enxerto/porta-enxerto. Paula Neto et al. (2016) estudaram a eficiência nutricional em fósforo em 21 cultivares de *Coffea arabica* e 4 cultivares de *Coffea canephora*, alguns dos resultados foram encontrados no crescimento das plantas, altamente reduzido sob privação de P; a concentração de P na massa seca foi maior nas cultivares de *Coffea canephora* e as folhas jovens acumularam mais P que quaisquer outros tecidos.

A grande maioria dos alimentos produzidos no mundo são cultivados nos mais diferentes tipos de solo. A preocupação pela conservação e preservação desses solos aumenta a cada dia, devido ao aumento da população mundial e à necessidade de mais alimentos. A parte viva do solo, a microbiota, exerce um papel fundamental, atuando em diversos processos físicos, químicos e bioquímicos, e a sua manutenção é um dos principais fatores do sucesso para uma agricultura mais sustentável.

Diversos atributos biológicos, dentre os quais a biomassa microbiana, atividades enzimáticas e estrutura da comunidade microbiana têm sido utilizadas como indicadores da qualidade do solo e são empregados em programas de monitoramento (DIAS-JÚNIOR et al., 1998; RENELLA et al., 2005; VÁSQUEZ-MURRIETA et al., 2006). Os fungos micorrízicos arbusculares e a atividade enzimática do solo podem indicar alterações impostas ao ambiente do solo por técnicas de manejo (ANDRADE et al., 2009; BALOTA; CHAVES, 2010).

A importância dos atributos biológicos do solo para a sustentabilidade do solo é consensual (CHAER; MYROLD; BOTTOMLEY, 2009; RUTGERS et al., 2012).

Espera-se que diferentes genótipos de cafeeiro apresentem variabilidade na sua eficiência nutricional e na sua interação com a microbiota do solo. Genótipos mais eficientes nutricionalmente são altamente desejados, frente à crescente demanda por alimentos e necessidade de formas mais sustentáveis de produção. A microbiota do solo, devido ao seu caráter muito dinâmico e peculiar, pode exercer um papel muito preponderante nessa questão. Dessa forma, objetivou-se com este trabalho avaliar a eficiência nutricional em fósforo e parâmetros microbiológicos do solo em cafeeiros arábica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), situada no município de Lavras – MG, localizada na latitude de 21°14'30" Sul e longitude de 45°00'10" Oeste e altitude de 918,8 m. A temperatura e umidade relativa média da casa de vegetação no período experimental foram de 23°C e 65%, respectivamente.

O solo utilizado no experimento foi classificado como Latossolo Vermelho Distrófico típico argiloso e muito argiloso (EMBRAPA, 2006). O solo foi peneirado e homogeneizado antes de se aplicarem quaisquer tratamentos. Também, o solo utilizado foi proveniente de camada subsuperficial e não recebeu nenhum tipo de inoculação microbológica. Foi feita uma calagem para a correção da acidez do solo e elevação da saturação por bases para 70%. Os vasos foram molhados duas vezes por semana e permaneceram por 30 dias em período de incubação, para reação do calcário. As mudas utilizadas no experimento foram produzidas com substrato comercial Plantmax® e transplantadas quando apresentaram três pares de folhas.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, em esquema fatorial 10x2 (10 genótipos de cafeeiro e duas dosagens de adubação fosfatada), com quatro repetições. Cada parcela experimental consistiu em um vaso com dez litros de solo, com uma planta. Os genótipos utilizados foram: as cultivares Paraíso MG H 419-1, Catuaí Vermelho IAC 144, Catiguá MG2, Topázio MG 1190, Bourbon Amarelo IAC J10, Sarchimor MG 8840, MGS Aranãs, MGS Ametista, MGS Paraíso 2 e a progênie H 6-47-10 pl. 3. As duas dosagens de adubação fosfatada foram a dose zero (sem adubação fosfatada) e a dose de 200 mg dm⁻³ de P por vaso. A adubação fosfatada, nas parcelas experimentais que a recebeu foi realizada em uma única aplicação, uma semana antes do transplantio das mudas nos vasos. Ainda, cada vaso recebeu 300 mg dm⁻³ de N e 200 mg dm⁻³ de K, parcelados em cinco vezes, aplicados a cada trinta dias, com a primeira aplicação feita na data do transplantio das mudas para os vasos. As dosagens utilizadas foram adaptadas de Novais, Neves e Barros (1991). Todas as adubações foram feitas por meio de soluções nutritivas. Os vasos foram irrigados de 3-4 vezes por semana, variando com o crescimento das plantas ao longo dos meses, e o volume de água adicionado foi calculado para que não houvesse escoamento por excesso.

O experimento permaneceu por oito meses em casa de vegetação. Em seguida, foi desmontado e as amostras de solo e material vegetal (raízes e parte aérea) de cada parcela foram coletadas para as análises.

As propriedades químicas, físicas e microbiológicas do solo utilizado no experimento, antes de receberem quaisquer dos tratamentos, estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Propriedades químicas, físicas e microbiológicas do solo utilizado no experimento.

Característica	Unidade	Valores
pH	-	5,80
P - Mehlich-1	mg dm ⁻³	0,28
P - Resina	mg dm ⁻³	2,27
P- Remanescente	mg L ⁻¹	1,52
K	mg dm ⁻³	22,0
Ca ²⁺	cmol _c dm ⁻³	0,30
Mg ²⁺	cmol _c dm ⁻³	0,10
S.SO ₄	mg dm ⁻³	7,82
Cu ²⁺	mg dm ⁻³	0,57
B	mg dm ⁻³	0,56
Zn ²⁺	mg dm ⁻³	0,59
Fe ²⁺	mg dm ⁻³	34,67
Mn ²⁺	mg dm ⁻³	4,30
Al ³⁺	cmol _c dm ⁻³	0,00
(H+Al)	cmol _c dm ⁻³	0,84
Soma de bases (SB)	cmol _c dm ⁻³	0,46
CTC efetiva (t)	cmol _c dm ⁻³	0,46
CTC potencial (T)	cmol _c dm ⁻³	1,30
Saturação por alumínio (m)	%	0,00
Saturação por bases (V)	%	35,11
Matéria orgânica	g kg ⁻¹	0,40
Areia	%	18
Silte	%	15
Argila	%	67
Densidade de esporos de micorrizas	nº 100 cm ⁻³	112
Atividade da fosfatase ácida	µg p-nitrofenol g ⁻¹ h ⁻¹	68,55
Carbono da biomassa microbiana	µg C g ⁻¹	52,39

Fonte: Do autor (2019).

Nota: pH = água ; P-Mehlich, K, Fe, Zn, Mn e Cu = Extrator Mehlich-1; P-Resina = extrator Resina; Ca²⁺, Mg²⁺ e Al³⁺ = Extrator KCl (1 mol L⁻¹); S.SO₄ = Extrator fosfato monocálcico em ácido acético; (H+Al) = Extrator SMP; Matéria orgânica: oxidação com Na₂Cr₂O₇ 4N + H₂SO₄ 10N; B = Extrator água quente.

2.2 Avaliações

Foram analisados as seguintes variáveis: a massa seca, o fósforo disponível no solo por extrator Mehlich-1, o fósforo disponível no solo por extrator “resina trocadora de íons”, o fósforo remanescente no solo, o teor de fósforo na raiz da planta, o teor de fósforo na parte

aérea da planta, o acúmulo de fósforo na raiz, o acúmulo de fósforo na parte aérea, o acúmulo de fósforo na planta, a taxa fotossintética líquida, a condutância estomática, a concentração intracelular de CO₂ e a transpiração. Também, foram analisados os atributos microbiológicos do solo: a densidade de esporos de micorrizas, a colonização micorrízica, a atividade da fosfatase ácida e o carbono da biomassa microbiana. Também, foram calculados alguns índices de eficiência nutricional, tais como: eficiência na absorção de fósforo, eficiência na translocação de fósforo, eficiência de uso de fósforo na raiz, eficiência de uso de fósforo na parte aérea, eficiência de uso de fósforo na planta e eficiência agrônômica de uso de fósforo.

Na parte fisiológica, foram realizadas mensurações em folhas completamente expandidas do terceiro ou quarto par de folhas, a partir do ápice dos ramos plagiotrópicos das plantas, em folhas sem danos aparentes causados por pragas ou doenças. Foram realizadas avaliações de trocas gasosas, utilizando-se o analisador de gás por infravermelho (LI-6400XT Portable Photosynthesis System, LI-COR, Lincoln, USA). O equipamento foi calibrado antes de ser utilizado, conforme as normas de calibração descritas no manual (LI-COR ENVIRONMENTAL, 2012). Todas as avaliações foram realizadas entre 8 e 11 horas da manhã, com utilização de fonte artificial de radiação fotossinteticamente ativa (PAR), em câmara fechada fixada em 1500 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Blue + Red LED LI-6400-02B, LI-COR, Lincoln, USA). A taxa de assimilação de CO₂ na câmara foi medida com a concentração ambiente de CO₂. As características avaliadas foram: taxa fotossintética líquida (A - $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_{sw} - $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentração intracelular de CO₂ (C_i - $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) e transpiração (E - $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). A avaliação foi feita dois dias antes do experimento ser desmontado.

Para a densidade de esporos de micorrizas, amostras de 100 g de solo foram processadas mediante a associação de dois métodos: o método de decantação e peneiramento úmido (GERDEMANN; NICOLSON, 1963) e da centrifugação e flutuação em sacarose (JENKINS, 1964). A quantificação dos esporos foi realizada em placas de acrílico com anéis concêntricos em microscópio estereoscópico. Os resultados foram expressos pelo número de esporos para cada 100 cm^3 de solo seco.

Para a colonização micorrízica, as raízes foram lavadas em água corrente, clarificadas e coloridas segundo a metodologia desenvolvida por Phillips e Hayman (1970) e modificada por Koske e Gemma (1989). Logo em seguida, foram levadas ao microscópio estereoscópico para serem avaliadas quanto à colonização radicular, conforme a metodologia de Giovanetti e Mosse (1980), os resultados foram expressos em porcentual de colonização.

A atividade da fosfatase ácida foi determinada segundo metodologia descrita por Tabatabai e Bremner (1969), ou seja, foi incubado 1 g de solo seco com a mistura de 1 mL de ρ -nitrofenil fosfato e 4 mL de tampão universal MUB modificado (pH 6,5). A incubação foi realizada por 1 hora a 37°C em erlenmeyers de 150 mL, seguida da adição de 1 mL CaCl_2 (0,5 mol L⁻¹) e 4 mL de NaOH (0,5 mol L⁻¹), seguindo-se de uma filtração da mistura em papel filtro Whatman nº 42. A atividade da fosfatase ácida foi obtida pela quantificação do ρ -nitrofenol liberado na mistura filtrada em espectrofotômetro a 410 nm. Os resultados foram expressos em μg de ρ -nitrofenol g⁻¹ solo h⁻¹. Para cada parcela experimental, foram feitas quatro análises, uma duplicata da amostra em si e uma duplicata do seu respectivo controle.

Para a determinação do carbono da biomassa microbiana, seguiu-se a metodologia de fumigação-extração proposta por Vance, Brookes e Jenkinson (1987), tendo como princípio a extração do carbono microbiano após a morte dos microrganismos e lise celular pelo ataque com clorofórmio e liberação dos constituintes celulares. O carbono da biomassa microbiana foi calculado pela diferença obtida entre o carbono extraído do solo fumigado (atacado com clorofórmio) com o do solo não fumigado (controle). Cada parcela foi analisada seis vezes (uma triplicata fumigada e uma triplicata não fumigada). Os resultados foram expressos μg de C g⁻¹ solo.

Para determinação da massa seca, cada parte da planta (raiz, caule e folhas) foi devidamente separada e processada. Todas as partes foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 65°C até obtenção de peso constante. Após a secagem, as amostras foram pesadas em balança de precisão, em seguida moídas em moinho do tipo Wiley e armazenadas para determinação da sua concentração de fósforo. A massa da parte aérea (MSPA) e a massa seca total (MST) foram calculadas da seguinte maneira:

- a) Massa seca da parte aérea (MSPA): obtida pelo somatório da massa seca das folhas e do caule;
- b) Massa seca total (MST): obtida pelo somatório da massa seca das raízes, do caule e das folhas;

A partir dos resultados da massa seca total (MST) para cada tratamento em cada repetição, calculou-se também, em separado, a massa seca total das plantas com adubação fosfatada e a massa seca total das plantas sem adubação fosfatada (MSTAP).

Para determinar a concentração de fósforo disponível no solo (PDI), utilizou-se o extrator Mehlich-1, segundo a metodologia descrita por Novais e Smith (1999). O fósforo

remanescente (PRM) foi obtido segundo Alvarez et al. (2000). Também, para determinar a concentração de fósforo no solo e como efeito de comparação entre diferentes extratores, utilizou-se o extrator “resina trocadora de íons” (PRS), segundo a metodologia proposta por Van Raij e Quaggio (1983). Já o teor de fósforo nas raízes (PRZ) e teor de fósforo na parte aérea (caule e folhas) da planta (PPA) foram determinados por digestão nitroperclórica, de acordo com Sarruge e Haag (1974). Os teores de P tanto no solo quanto nos tecidos vegetais foram determinados por colorimetria (espectrofotometria), segundo Tedesco et al. (1995).

Também, calculou-se o acúmulo de fósforo nas diferentes partes da planta. Os acúmulos foram calculados da seguinte maneira:

- a) Acúmulo de fósforo na raiz (APRZ): [teor de fósforo nas raízes (PRZ) x massa seca das raízes (MSR)];
- b) Acúmulo de fósforo na parte aérea (APPA): [teor de fósforo na parte aérea (PPA) x massa seca da parte aérea (MSPA)];
- c) Acúmulo de fósforo na planta (APPL): [acúmulo de fósforo na raiz (APRZ) + acúmulo de fósforo na parte aérea (APPA)];

A partir dos resultados do acúmulo de fósforo na planta (APPL) para cada tratamento em cada repetição, calculou-se também, em separado, o acúmulo de fósforo na planta com adubação fosfatada e o acúmulo de fósforo na planta sem adubação fosfatada.

Em relação aos índices de eficiência nutricional, eles foram calculados da seguinte forma:

- a) Eficiência na absorção de fósforo (EAP): (acúmulo de fósforo na planta / massa seca da raiz), segundo Swiader, Chyan e Freiji (1994);
- b) Eficiência na translocação de fósforo (ETP): [(acúmulo de fósforo na parte aérea / acúmulo de fósforo na planta) x 100], segundo Li, Mckeand e Allen (1991);
- c) Eficiência de uso de fósforo na raiz (EUPRZ): (massa seca da raiz² / acúmulo de fósforo na planta), segundo Siddiqi e Glass (1981);
- d) Eficiência de uso de fósforo na parte aérea (EUPPA): (massa seca da parte aérea² / acúmulo de fósforo na planta), segundo Siddiqi e Glass (1981);
- e) Eficiência de uso de fósforo na planta (EUPPL): (massa seca total² / acúmulo de fósforo na planta), segundo Siddiqi e Glass (1981);

- f) Eficiência agrônômica de uso de fósforo (EAUP): [(massa seca total com adubação fosfatada - massa seca total sem adubação fosfatada) / (acúmulo de fósforo na planta com adubação fosfatada - acúmulo de fósforo na planta sem adubação fosfatada)], de acordo com a metodologia adaptada de Oliveira et al. (1987).

Com a eficiência agrônômica de uso de fósforo (EAUP) e com a massa seca total das plantas sem adubação fosfatada (MSTAP), e como forma de separar os genótipos de cafeeiro quanto a sua resposta e eficiência à adubação fosfatada, elaborou-se um gráfico, de acordo com o proposto por Gerloff (1977), há genótipos que são classificados como:

- a) Eficientes e responsivos (ER);
- b) Eficientes e não responsivos (ENR);
- c) Não eficientes e responsivos (NER);
- d) Não eficientes e não responsivos (NENR);

As médias gerais, tanto da eficiência agrônômica de uso de fósforo (EAUP), como da massa seca total das plantas sem adubação fosfatada (MSTAP), foram os parâmetros utilizados para tracejar as linhas de referência, ou linhas de corte, para a classificação dos genótipos quanto a sua eficiência e responsividade.

2.3 Análises estatísticas

Os dados obtidos no experimento foram submetidos à análise de variância (teste F). As médias foram comparadas pelo teste de agrupamento de Scott-Knott, ao nível de significância de 5%. Foi realizada também uma análise de correlação de Pearson entre as variáveis respostas. O software estatístico utilizado foi o GENES (CRUZ, 2013).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo da análise de variância das características: massa seca das raízes, massa seca da parte aérea, massa seca total, acúmulo de fósforo na raiz, acúmulo de fósforo na parte aérea, acúmulo de fósforo na planta, fósforo disponível no solo, fósforo resina, fósforo remanescente no solo, teor de fósforo na parte aérea da planta, teor de fósforo na raiz da planta, taxa fotossintética líquida, condutância estomática, concentração intracelular de CO₂ e transpiração de genótipos de cafeeiro relacionados ao déficit de fósforo encontra-se em Tabela 1 do Apêndice A.

Como resultado comum, não houve significância na interação genótipos e doses para nenhuma das características. Para o fator dose, houve significância para todos os caracteres avaliados, com exceção da taxa fotossintética líquida, condutância estomática, concentração intracelular de CO₂ e transpiração. Já no fator cultivares, houve significância para a massa seca das raízes, massa seca da parte aérea, massa seca total, acúmulo de fósforo na raiz, acúmulo de fósforo na planta e teor de fósforo na raiz da planta.

Em relação ao fator dose, pelo fato de haver somente dois níveis desse fator, houve a formação de dois grupos. A adubação fosfatada influenciou de maneira significativa nos resultados, apresentando comportamento superior quando comparada com onde não houve a adubação fosfatada.

Em valor porcentual, o incremento foi: massa seca das raízes (45,2%), massa seca da parte aérea (22,3%), massa seca total (31,5%), acúmulo de fósforo na raiz (85,9%), acúmulo de fósforo na parte aérea (123,8%), acúmulo de fósforo na planta (111,1%), fósforo disponível no solo (542,3%), fósforo resina (621,5%), fósforo remanescente no solo (21,7%), teor de fósforo na raiz da planta (83,6%) e teor de fósforo na parte aérea da planta (32,7%) (TABELA 2, APÊNDICE A).

Em estudo conduzido por Paula Neto et al. (2016), no qual os autores estudaram cultivares de cafeeiro com e sem adubação fosfatada, chegou-se a resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho, ou seja, as características altura, massa seca, teor de fósforo na parte aérea da planta e teor de fósforo na raiz da planta apresentaram resultados superiores onde houve adubação fosfatada. O fósforo desempenha diversas funções na planta, não obstante foi classificado como um macronutriente primário, e sua exigência na adubação, para a maioria das culturas, é bastante elevada. Dentre algumas de suas funções, o fósforo apresenta um relevante papel na formação molecular de DNA e do RNA, bem como do ATP - adenosina trifosfato (SANDIM et al., 2008). Durante a síntese de proteínas e de aminoácidos,

é utilizado o nitrogênio, porém para a conclusão desse processo, é necessária a presença de fósforo na forma de poder redutor e de nucleotídeos (ALVIM; BOTREL, 2001). Devido à importância do fósforo no metabolismo das plantas, é esperado que sua limitação possa afetar o desenvolvimento, principalmente do sistema radicular. De maneira geral, as plantas aumentam a atividade do sistema de absorção de fósforo de alta afinidade na membrana plasmática (RAGHOTHAMA; KARTHIKEYAN, 2005), com isso, a velocidade de absorção pode aumentar de duas a quatro vezes, dependendo da espécie (KERBAUY, 2004).

Na Tabela 2, estão as médias de massa seca das raízes, massa seca da parte aérea, massa seca total, acúmulo de fósforo na raiz, acúmulo de fósforo na planta e teor de fósforo na raiz da planta de genótipos de cafeeiro.

Para a massa seca das raízes, houve a formação de dois grupos, onde as cultivares Bourbon Amarelo IAC J10, Topázio MG 1190, MGS Aranãs e Paraíso MG H 419-1 apresentaram comportamento igual entre si e superior às demais. Já para a massa seca da parte aérea, houve a formação de três grupos, onde as cultivares Paraíso MG H 419-1 e Bourbon Amarelo IAC J10 apresentaram comportamento igual entre si e superior às demais. Para a massa seca total também houve a formação de três grupos, onde as cultivares Bourbon Amarelo IAC J10 e Paraíso MG H 419-11 apresentaram comportamento igual entre si e superior às demais.

No acúmulo de fósforo na raiz, houve a formação de dois grupos, nos quais as cultivares Paraíso MG H 419-1, Bourbon Amarelo IAC J10, Catuaí Vermelho IAC 144, MGS Aranãs, Catiguá MG2 e Topázio MG 1190 apresentaram comportamento igual entre si e superior às demais. Já no acúmulo de fósforo na planta, também houve a formação de dois grupos, nos quais as cultivares Paraíso MG H 419-1 e Bourbon Amarelo IAC J10 apresentaram comportamento igual entre si e superior às demais.

Para o teor de fósforo na raiz da planta, houve a formação de dois grupos, e as cultivares Catiguá MG2, Catuaí Vermelho IAC 144, MGS Ametista, Paraíso MG H 419-1 e Sarchimor MG 8840 apresentaram comportamento igual entre si e superior às demais.

Em relação a todas as cultivares, a cultivar Paraíso MG H 419-1 destacou-se dentre as demais, uma vez que apresentou comportamento superior em todas as características avaliadas. Por outro lado, a progênie H 6-47-10 pl. 3 apresentou comportamento oposto ao da cultivar Paraíso MG H 419-1, foi destaque, porém negativo, para todas as características avaliadas. Estudos como os de Carvalho et al. (2010), Ferreira et al. (2014) e Paula Neto et al. (2016) demonstraram que as diversas cultivares de cafeeiro disponíveis, atualmente, apresentam comportamento agrônomo de crescimento e desenvolvimento diferentes, e

avaliações de parâmetros como esses auxiliam na classificação dessas cultivares quanto ao seu desempenho agrônomo, inclusive, de produtividade.

Tabela 2 - Médias de massa seca das raízes (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca total (MST), acúmulo de fósforo na raiz (APRZ), acúmulo de fósforo total na planta (APPL) e teor de fósforo na raiz da planta (PRZ) de genótipos de cafeeiro arábica.

Genótipos	MSR (g)	MSPA (g)	MST (g)	APRZ (mg)	APPL (mg)	PRZ (g kg⁻¹)
Bourbon Amarelo IAC J10	32,19 a	39,96 a	72,15 a	18,87 a	62,00 a	0,58 b
Catiguá MG2	20,75 b	29,41 c	50,16 c	16,05 a	50,75 b	0,80 a
Catuaí Vermelho IAC 144	23,19 b	29,12 c	52,31 c	16,40 a	43,91 b	0,66 a
MGS Ametista	18,82 b	26,22 c	45,05 c	13,66 b	45,70 b	0,71 a
MGS Aranaãs	25,99 a	34,89 b	60,89 b	16,26 a	48,59 b	0,63 b
MGS Paraíso 2	23,23 b	35,03 b	58,26 b	13,25 b	47,14 b	0,56 b
Paraíso MG H 419-1	25,87 a	43,33 a	69,20 a	19,80 a	65,09 a	0,76 a
H 6-47-10 pl. 3	20,68 b	27,73 c	48,41 c	10,21 b	39,40 b	0,52 b
Sarchimor MG 8840	17,96 b	29,90 c	47,86 c	12,78 b	49,32 b	0,67 a
Topázio MG 1190	30,61 a	28,97 c	59,58 b	15,85 a	45,29 b	0,51 b

Fonte: Do autor (2019).

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de agrupamento de Scott-Knott.

O resumo da análise de variância das características: densidade de esporos de micorrizas, colonização micorrízica, atividade da fosfatase ácida e carbono da biomassa microbiana de genótipos de cafeeiro arábica relacionados ao déficit de fósforo encontra-se na Tabela 3 do Apêndice A.

Dentre os parâmetros avaliados, observou-se significância estatística na interação entre genótipos e doses para a densidade de esporos de micorrizas, atividade da fosfatase ácida e carbono da biomassa microbiana (TABELA 4, APÊNDICE A). Para o fator genótipos, houve significância para a densidade de esporos de micorrizas, atividade da fosfatase ácida e carbono da biomassa microbiana. Já no fator dose, houve significância para a densidade de esporos de micorrizas e carbono da biomassa microbiana. Não houve significância para a colonização micorrízica em nenhum dos fatores nem na interação entre eles.

As médias da densidade de esporos de micorrizas, atividade da fosfatase ácida e carbono da biomassa microbiana estão apresentadas na Tabela 3.

A densidade de esporos de micorrizas, de uma maneira geral, foi maior onde não houve adubação fosfatada. Os esporos de micorrizas são considerados estruturas de reprodução, resistência e sobrevivência do fungo, e a tendência é que no ambiente onde houve adubação fosfatada, por não haver estresse de fósforo, a densidade de esporos seja menor.

Vários são os fatores que interferem na maior ou menor taxa de infecção e na eficiência dessa micorrização, tais como: o pH e nível de fertilidade do solo (principalmente quanto à disponibilidade de P); fatores físicos, como a umidade, a aeração, a luminosidade e a temperatura; as interações entre fungos micorrízicos arbusculares e outros organismos do solo; o manejo do solo e das culturas; fatores inerentes à planta hospedeira, como o grau de micotrofia da planta, dentre outros fatores (MCGONIGLE; MILLER, 1999; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Várias substâncias que estimulam os propágulos dos fungos micorrízicos arbusculares têm sido encontradas nos exsudados das raízes de plantas suscetíveis à micorrização, indicando a presença de substâncias estimulantes nas plantas deficientes, que serão mais suscetíveis à micorrização (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Nessa linha, foi identificado em raízes de trevo cultivadas em condições de deficiência de fosfato o isoflavonóide formononetina (7- hidróxi, 4'-metoxi isoflavona) (NAIR; SAFIR; SIQUEIRA, 1991).

O solo que foi utilizado no experimento apresentava uma densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares de 112 por 100 cm⁻³ (TABELA 1). Na presença e na ausência de adubação fosfatada, houve um acréscimo médio nos genótipos de 19% (133 por 100 cm⁻³) e 202% (338 por 100 cm⁻³), respectivamente (TABELA 4). Na interação da cultivar Bourbon Amarelo IAC J10 sem adubação fosfatada (TABELA 3), houve um pico na produção de esporos de 414,3% a mais em relação à amostra original (576 por 100 cm⁻³). Lammel et al. (2015), trabalhando com diferentes sistemas de manejo do solo em cafeeiros, encontrou valores de densidade de esporos de micorrizas variando de 205,7 a 274,4 esporos por 100 cm⁻³ de solo.

O cafeeiro é uma planta que pode ser utilizada para auxiliar na recuperação da microbiota do solo, podendo ser indicada em sistemas de manejo considerados mais conservacionistas e que visam a uma produção mais sustentável. A perturbação dos solos de forma intencional, como exemplo por um cultivo agrícola, é uma das maiores fontes de alterações nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (ABBOTT; GAZEY, 1994). Uma das atividades que mais exerce efeito sobre os fungos micorrízicos arbusculares é o uso e o manejo do solo, podendo causar modificações na estrutura das comunidades fúngicas, alterando a sua distribuição e a dominância das espécies (SIQUEIRA; COLOZZI-FILHO; OLIVEIRA, 1989). As respostas diferenciadas dos fungos micorrízicos arbusculares às interferências nos ecossistemas resultam da complexa interação fungo-planta-ambiente, a qual é determinada pela plasticidade ecológica desses fungos em adaptar-se às alterações e

colonizar as raízes, e pela eficiência da simbiose em promover o crescimento vegetal (SMITH; READ, 1997).

Em relação ao carbono da biomassa microbiana, houve uma tendência de aumento significativo nesse parâmetro em todos os tratamentos. O solo que foi utilizado no experimento apresentou um teor de carbono da biomassa microbiana de $52,39 \mu\text{g C g}^{-1}$ de solo, além também de um teor de matéria orgânica muito baixo ($0,40 \text{ g kg}^{-1}$ de solo) (TABELA 1), houve um incremento médio nas cultivares de 53,3% ($80,32 \mu\text{g C g}^{-1}$ de solo) e 78,6% ($93,56 \mu\text{g C g}^{-1}$ de solo), onde não foi realizada a adubação fosfatada e onde ela foi realizada, respectivamente (TABELA 4). Esse resultado evidencia a melhoria na microbiota do solo, a partir da introdução de uma espécie vegetal. Essa melhoria foi potencializada ainda mais com a adubação fosfatada.

Segundo Moreira e Siqueira (2006), a biomassa microbiana do solo é favorecida em solos com vegetação, especialmente naqueles com teores mais elevados de argila, geralmente é reduzida nos solos cultivados pelo sistema convencional, nos solos arenosos, degradados por erosão ou contaminados. A temperatura, umidade e aeração do solo, assim como a disponibilidade de nutrientes e quantidade de substratos orgânicos exercem influência na comunidade microbiana do solo (CATTELAN; VIDOR, 1990). Todos esses fatores podem ser modificados pelo sistema de manejo adotado (VARGAS; SCHOLLES, 2000). Os microrganismos têm sido cada vez mais associados à qualidade do solo, tanto por seu papel fundamental na manutenção dos ecossistemas, como por sua sensibilidade a variações nos muitos fatores que compõem os ambientes (SILVEIRA; FREITAS, 2007).

Lopes et al. (2013) elaboraram uma tabela de interpretação de bioindicadores de solo em Latossolos Vermelhos Argilosos de Cerrado (camada de 0-10 cm) com base no teor de matéria orgânica e consideraram solos com atividade de carbono da biomassa microbiana menor que $205 \mu\text{g C g}^{-1}$ solo como baixos, uma vez que valores acima de $405 \mu\text{g C g}^{-1}$ solo seriam os valores considerados adequados. Dessa maneira, mesmo com a notável melhoria desse atributo, os valores de carbono da biomassa microbiana do solo ainda estão abaixo do que se pode ser considerado ideal. Lammel et al. (2015), trabalhando com diferentes sistemas de manejo do solo em cafeeiros, encontrou valores de carbono da biomassa microbiana variando de 273,4 a $449,6 \mu\text{g C g}^{-1}$.

Os teores de biomassa microbiana no solo têm sido utilizados para avaliar os efeitos sobre o manejo do solo na reabilitação de áreas degradadas (CARNEIRO et al., 2008a; SILVEIRA; MELLONI; MELLONI, 2006). Segundo Powelson, Brookes e Christensen (1987), a avaliação da biomassa microbiana é útil para prover informações rápidas sobre

mudanças nas propriedades orgânicas do solo, detectar mudanças causadas por cultivos, devastação de florestas ou determinar a regeneração de solos após a remoção da camada superficial e avaliar os efeitos de contaminação por elementos-traço e pesticidas. Modificações mensuráveis na biomassa microbiana do solo têm sido observadas em razão de diversas ações antrópicas, como as práticas de preparo de solo e o manejo de plantas e adubações (MARCHIORI JUNIOR; MELO, 2000). O carbono da biomassa microbiana responde rapidamente às modificações dos teores de matéria orgânica no solo, podendo funcionar como um indicador da qualidade dos solos, servindo como um instrumento de aferição da sustentabilidade de sistemas de produção (FAUCI; DICK, 1994; MELE; CARTER, 1993).

O carbono da biomassa microbiana pode ser usado como um indicador de sistemas de manejo mais sustentáveis na produção de café. Isso é reforçado pelo fato de que entre alguns atributos biológicos do solo, Partelli et al. (2012) encontraram no carbono da biomassa microbiana a variável com maior contribuição relativa para a discriminação entre o sistema de produção convencional e orgânico em *Coffea canephora*. Em estudo envolvendo diferentes sistemas de cultivo, os menores valores de carbono da biomassa microbiana encontrados por Guimarães et al. (2017) foram em cafeeiros cultivados em sistema de monocultivo, quando comparado com cafeeiros consorciados com espécies arbóreas e gramíneas, cafeeiros consorciados somente com gramíneas, área em pousio e fragmento florestal. Em outro trabalho, Almeida et al. (2007), avaliando a influência de um sistema agroflorestal na biomassa microbiana do solo, verificaram que os maiores teores de carbono da biomassa microbiana foram encontrados em áreas de cultivo de café em sistema agroflorestal e sob mata nativa. Glaeser et al. (2010) avaliaram o carbono da biomassa microbiana em diferentes sistemas de cultivo do cafeeiro e em duas épocas do ano e observaram que os maiores valores encontrados foram em vegetação nativa, em cafeeiros adensados e em cafeeiros consorciados com bananeira (*Musa spp.*) e acácia (*Acacia sp.*).

Tabela 3 - Médias da densidade de esporos de micorrizas (ESP), atividade da fosfatase ácida (FFT) e carbono da biomassa microbiana (CBM) de genótipos de cafeeiro arábica relacionados ao déficit de fósforo.

Genótipos	ESP (nº 100 cm ⁻³)		FFT (µg p-nitrofenol g ⁻¹ h ⁻¹)		CBM (µg C g ⁻¹)	
	- P	+ P	- P	+ P	- P	+ P
Bourbon Amarelo IAC J10	576 a	161 b	81,75 a	54,39 a	55,02 a	58,66 a
Catiguá MG2	278 a	90 b	63,57 a	83,31 a	74,37 b	136,04 a
Catuaí Vermelho IAC 144	233 a	124 a	77,05 a	85,34 a	123,14 a	62,02 b
MGS Ametista	276 a	89 b	66,23 b	190,77 a	45,91 b	91,37 a
MGS Aranãs	431 a	245 b	95,67 a	57,47 a	115,50 a	90,79 a
MGS Paraíso 2	294 a	29 b	142,34 a	46,13 b	63,21 b	103,08 a
Paraíso MG H 419-1	421 a	88 b	123,29 a	94,23 a	61,18 b	99,34 a
H 6-47-10 pl. 3	353 a	113 b	98,25 a	120,52 a	80,59 a	86,00 a
Sarchimor MG 8840	169 a	85 a	47,52 a	48,16 a	125,91 a	64,56 b
Topázio MG 1190	350 a	312 a	92,29 a	98,43 a	58,39 b	143,76 a

Fonte: Do autor (2019).

Médias seguidas da mesma letra na linha, dentro de cada variável resposta, não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de agrupamento de Scott-Knott.

Já para a atividade da fosfatase ácida, o comportamento apresentado foi semelhante ao que ocorreu com o carbono da biomassa microbiana. O solo que foi utilizado no experimento apresentava uma atividade da fosfatase ácida foi de 68,55 µg p-nitrofenol g⁻¹ h⁻¹ (TABELA 1), havendo um acréscimo médio nas cultivares de 30,73% (89,63 µg p-nitrofenol g⁻¹ h⁻¹) e 26,97% (87,04 µg p-nitrofenol g⁻¹ h⁻¹), sem e com adubação fosfatada, respectivamente (TABELA 4). Lammel et al. (2015), trabalhando com diferentes sistemas de manejo do solo em cafeeiros, encontrou valores de fosfatase ácida variando de 4,6 a 8,3 mg p-nitrofenol g⁻¹ h⁻¹.

Lopes et al. (2013) elaboraram uma tabela de interpretação de bioindicadores de solo em Latossolos Vermelhos Argilosos de Cerrado (camada de 0-10 cm) com base no teor de matéria orgânica e consideraram solos com atividade da fosfatase ácida menor que 640 µg p-nitrofenol g⁻¹ solo h⁻¹ como baixos. Valores acima de 1.150 µg p-nitrofenol g⁻¹ solo h⁻¹ seriam os valores considerados adequados para a atividade dessa enzima. O mesmo comportamento foi observado para o carbono da biomassa microbiana. Em relação aos dados apresentados no experimento, fica evidente que, apesar do incremento que houve na atividade da fosfatase ácida pelos tratamentos utilizados, o seu teor no solo se encontra bem abaixo do que é considerado ideal, podendo a fosfatase ácida aumentar a sua atividade, dependendo das condições de cultivo.

De acordo com Dick (1994), a atividade enzimática de um solo é o resultado do somatório da atividade enzimática dos organismos vivos (microrganismos, animais e plantas)

e das enzimas associadas à fração não viva (enzimas abiômicas que se acumulam no solo protegidas da ação das proteases através da adsorção em partículas de argila e na matéria orgânica). Na maioria dos fungos estudados, as fosfatases ácidas estão sujeitas à repressão por altas concentrações de fosfato inorgânico (ALEKSIEVA; MICHEVA-VITEVA, 2000; BERNARD et al., 2002). A secreção de enzimas extracelulares é diretamente correlacionada com a extensão e crescimento das hifas (HIDAYAT; ERIKSEN; WIEBE, 2006). A atividade enzimática pode ser afetada pelas práticas de manejo do solo, ocorrendo reduções em sistemas de manejo convencional, quando comparado com o manejo conservacionista (AON et al., 2001). Isso explica o fato de áreas de mata nativa ou mais preservadas possuírem maiores concentrações de fosfatase (CARNEIRO et al., 2008b; JAKELAITIS et al., 2008).

Tabela 4 - Médias da densidade de esporos de micorrizas (ESP), carbono da biomassa microbiana (CBM) e atividade da fosfatase ácida (FFT) sob ausência ou presença de adubação fosfatada.

Dose	ESP (n° 100 cm ⁻³)	CBM (µg C g ⁻¹)	FFT (µg p-nitrofenol g ⁻¹ h ⁻¹)
- P	338 a	80,32 b	89,63 a
+ P	133 b	93,56 a	87,04 a

Fonte: Do autor (2019).

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de agrupamento de Scott-Knott.

Analisando os dados apresentados na Tabela 3, nota-se que a cultivar MGS Ametista apresentou atividade da fosfatase ácida maior onde houve adubação fosfatada. Na cultivar MGS Paraíso 2, o comportamento foi o oposto. A explicação para a maior atividade da fosfatase ácida onde houve adubação fosfatada foi devido à melhoria que houve no ambiente de cultivo devido à adição do fósforo, que é muito importante no metabolismo de todos os seres vivos, incluindo os microrganismos do solo (fungos e bactérias, principalmente). Um parâmetro que reforça essa afirmação foi que o carbono da biomassa microbiana apresentou esse mesmo comportamento na cultivar MGS Ametista (aumentou com a adição de P), evidenciando que a melhoria do ambiente propiciou um incremento da atividade microbiana do solo, a grande responsável pela produção de fosfatase ácida nos solos.

Em um amplo estudo com compilado de dados sobre pesquisas com fosfatases, Margalef et al. (2017) encontraram correlação entre carbono microbiano e P orgânico. Também, os autores encontraram relação entre o aumento de carbono microbiano com o aumento de fosfatase ácida, ou seja, o aumento da atividade de fosfatase ácida está intimamente ligado ao aumento na biomassa microbiana.

De acordo com Dick e Tabatabai (1993), os microrganismos seriam as fontes mais expressivas de fosfatases no solo, por causa da sua grande biomassa, alta atividade metabólica e curto tempo de vida, com várias gerações, permitindo assim, a produção e a liberação de quantidades elevadas de enzimas extracelulares, quando comparado com as plantas. Em trabalho realizado por Fernandes et al. (2000), os autores também encontraram maior atividade da fosfatase ácida em dois tipos de solo com doses crescentes de P. A menor atividade verificada nas doses mais baixas de P aplicadas é devida, provavelmente, às alterações no metabolismo normal das plantas, decorrentes da nutrição fosfatada.

Já para a cultivar MGS Paraíso 2, a explicação para a maior atividade da fosfatase ácida onde não houve adubação fosfatada se deve à capacidade da própria cultivar em produzir e exsudar fosfatase ácida na sua rizosfera. Analisando de maneira isolada o resultado da atividade da fosfatase ácida no fator genótipo, verifica-se que essa cultivar se enquadrou no grupo superior de atividade desta enzima (TABELA 5). As fosfatases podem ser constitutivas ou repressíveis por fosfato. As fosfatases constitutivas são sintetizadas independentemente da composição do meio em que atuam; as repressíveis são sintetizadas apenas na presença de concentrações limitantes de fosfato (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004). À medida que se diminui o suprimento de P para as plantas, ocorre um aumento da atividade dessas enzimas (BIELESKI; FERGUNSON, 1983). Alguns trabalhos têm relatado a relação entre deficiência de P e atividade de fosfatases (ASCENCIO, 1994; FERNANDES et al., 1998; FERNANDEZ; ASCENCIO, 1994; SILVA; BASSO, 1993). Segundo Rössner et al. (1996), as fosfatases ácidas são excretadas tanto pelas raízes das plantas quanto pelos microrganismos do solo. Essas enzimas são induzíveis e, portanto, são sintetizadas predominantemente em condições de baixa disponibilidade de fósforo no solo.

Tabela 5 - Médias de atividade da fosfatase ácida (FFT) de genótipos de cafeeiro arábica.

Genótipos	FFT ($\mu\text{g p-nitrofenol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
Bourbon Amarelo IAC J10	68,07 b
Catiguá MG2	73,44 b
Catuai Vermelho IAC 144	81,19 b
MGS Ametista	128,50 a
MGS Aranãs	76,57 b
MGS Paraíso 2	94,23 a
Paraíso MG H 419-1	108,76 a
H 6-47-10 pl. 3	109,39 a
Sarchimor MG 8840	47,84 b
Topázio MG 1190	95,36 a

Fonte: Do autor (2019).

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de agrupamento de Scott-Knott.

A partir destes resultados, pode-se dizer que o cafeeiro é altamente responsivo à melhoria nas condições da microbiota do solo, refletindo nos rápidos acréscimos nos parâmetros avaliados.

De maneira geral, nos genótipos avaliados, o carbono da biomassa microbiana foi favorecido pelo fornecimento de fósforo, mostrando incrementos significativos em curto período de avaliação. Com a densidade de esporos de micorrizas o comportamento apresentado foi o oposto.

Em relação à colonização micorrízica, o valor médio encontrado (13,62%) é considerado muito baixo. Lammel et al. (2015), trabalhando com diferentes sistemas de manejo do solo em cafeeiros, encontrou valores de colonização micorrízica variando de 18,8 a 31,4 %. Esse resultado baixo de colonização é justificado por alguns fatores, dentre eles: o preparo do solo para o experimento (peneiramento, correção da acidez), o curto período de cultivo, a baixa densidade de esporos de micorrizas inicial do solo, a ausência de uma inoculação com micorrizas simbióticas com o cafeeiro, etc. A colonização micorrízica depende de vários fatores, como das espécies de fungos micorrízicos presentes na área, das condições edafoclimáticas, da cultivar da planta e do uso e manejo da terra (ANDRADE et al., 2009). Diferenças no manejo da cultura podem influenciar o número de esporos e os níveis de colonização micorrízica (BAINARD; KLIRONOMOS; GORDON, 2011). Além disso, dependendo da planta hospedeira e das espécies de fungos micorrízicos arbusculares, pode haver diferentes estratégias de colonização e esporulação e, às vezes, uma alteração em um desses fatores poderia alterar o comportamento de colonização (LAMMEL et al., 2015).

Já a fosfatase ácida se comportou de maneira mais dinâmica, havendo diferenças no comportamento dos genótipos frente à ausência ou presença de adubação fosfatada. Esse resultado mostra que a variabilidade genética dentro dos genótipos de cafeeiro é relevante no estudo das fosfatases ácidas, uma vez que houve incremento na atividade dessa enzima tanto no ambiente que foi adubado com fósforo quanto no ambiente onde a adubação não foi realizada.

O resumo da análise de variância das características: eficiência na absorção de fósforo, eficiência na translocação de fósforo, eficiência de uso de fósforo na raiz, eficiência de uso de fósforo na parte aérea e eficiência de uso de fósforo na planta de genótipos de cafeeiro arábica relacionados ao déficit de fósforo encontra-se na Tabela 5 do Apêndice A.

Também, conforme aconteceu com os resultados das características relacionadas na Tabela 1 do Apêndice A, não houve significância da interação genótipos e doses para nenhuma das características. Para o fator dose, houve significância para a eficiência na

absorção de fósforo, eficiência de uso de fósforo na parte aérea e eficiência de uso de fósforo na planta. Já para o fator genótipos, houve significância para a eficiência de uso de fósforo na raiz, eficiência de uso de fósforo na parte aérea e eficiência de uso de fósforo na planta. Não houve significância para a característica eficiência na translocação de fósforo para os níveis de probabilidades adotados.

Em relação ao fator dose, também pelo fato de haver somente dois níveis desse fator, houve a formação de dois grupos (TABELA 6, APÊNDICE A).

Para a eficiência na absorção de fósforo, a maior eficiência foi observada onde houve adubação fosfatada, estando o nutriente mais prontamente disponível para ser absorvido pelas raízes do cafeeiro e acumulado em toda a planta. Também a massa seca das raízes foi maior onde houve adubação fosfatada, o que reforça esse resultado obtido. O percentual de incremento foi de 55%, quando comparado entre onde houve adubação fosfatada contra onde não houve.

Já para a eficiência de uso de fósforo na parte aérea e eficiência de uso de fósforo na planta, os maiores valores foram observados onde não houve adubação fosfatada, sinalizando que as plantas foram realmente mais eficientes em produzir massa seca mesmo estando sob baixa disponibilidade de fósforo. Os percentuais de incremento entre onde não houve adubação fosfatada para onde houve foi de 41,5% e 20,3%, respectivamente. Esse comportamento de o cafeeiro ser mais eficiente em utilizar o fósforo mesmo em condições de baixa disponibilidade desse nutriente foi também encontrado por Paula Neto et al. (2016).

Na Tabela 6, estão as médias de eficiência de uso de fósforo na raiz, eficiência de uso de fósforo na parte aérea e eficiência de uso de fósforo na planta de genótipos de cafeeiro arábica.

Para a eficiência de uso de fósforo na raiz, houve a formação de dois grupos, onde as cultivares Bourbon Amarelo IAC J10 e Topázio MG 1190 apresentaram comportamento igual entre si e superior às demais. Na eficiência de uso de fósforo na parte aérea, houve a formação de dois grupos, nos quais as cultivares Bourbon Amarelo IAC J10, MGS Aranãs, MGS Paraíso 2 e Paraíso MG H 419-1 apresentaram comportamento igual entre si e superior às demais. Já para a eficiência de uso de fósforo na planta, houve a formação de dois grupos, nos quais as cultivares Bourbon Amarelo IAC J10, MGS Aranãs, MGS Paraíso 2, Paraíso MG H 419-1 e Topázio MG 1190 apresentaram comportamento igual entre si e superior às demais.

Como destaque, vale ressaltar que somente a cultivar Bourbon Amarelo IAC J10 apresentou eficiência superior nas três características avaliadas, foi considerada eficiente na utilização de fósforo. Outro destaque, porém, negativo, foi que cinco dos dez genótipos

estudados (as cultivares Catiguá MG2, Catuaí Vermelho IAC 144, MGS Ametista, Sarchimor MG 8840 e a progênie H 6-47-10 pl. 3) apresentaram comportamento oposto ao mostrado pela cultivar Bourbon Amarelo IAC J10, ou seja, são cultivares menos eficientes quanto ao uso do fósforo. Outros autores, como Amaral et al. (2011), Paula Neto et al. (2016), Pozza et al. (2009) e Reis Júnior e Martinez (2002) também estudaram a eficiência fosfatada em cafeeiros, esses autores viram que há diferenças significativas entre as cultivares e também entre as espécies (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*).

O termo eficiência nutricional pode ser expresso como a relação entre a produção obtida e os insumos aplicados para obter essa produção, ou seja, isso significa que a eficiência nutricional é a quantidade de matéria seca ou grãos produzidos por unidade de nutriente aplicado (FAGERIA, 1998). Vários são os mecanismos relacionados às características morfológicas e fisiológicas da planta que contribuem para o uso eficiente de nutrientes, como: sistema radicular extensivo (que possibilita uma maior exploração de volume de solo), alta relação entre raízes e parte aérea, habilidade do sistema radicular em modificar a rizosfera (possibilitando superar baixos teores de nutrientes), maior eficiência de absorção ou de uso de nutrientes, capacidade de manter o metabolismo normal com baixo teor de nutrientes nos tecidos e altas taxas fotossintéticas (FAGERIA; BALIGAR, 1993). Plantas com alta eficiência de absorção de fósforo apresentam não só alta taxa de absorção do nutriente por unidade de massa de raiz, mas também alta relação parte aérea/raiz (FÖHSE et al., 1991). Outros fatores também exercem influência na eficiência nutricional, dentre eles a interação da planta com fatores ambientais de solo e clima, como temperatura, radiação solar, índice pluviométrico, pH do solo, teor de matéria orgânica, teor de alumínio no solo, entre outros (FAGERIA, 1998).

Tabela 6 - Eficiência de uso de fósforo na raiz (EUPRZ), eficiência de uso de fósforo na parte aérea (EUPPA) e eficiência de uso de fósforo na planta (EUPPL) de genótipos de cafeeiro arábica.

Genótipos	EUPRZ (g² mg⁻¹)	EUPPA (g² mg⁻¹)	EUPPL (g² mg⁻¹)
Bourbon Amarelo IAC J10	19,05 a	28,92 a	92,31 a
Catiguá MG2	11,86 b	20,99 b	63,17 b
Catuaí Vermelho IAC 144	13,08 b	23,36 b	69,77 b
MGS Ametista	8,38 b	18,83 b	51,20 b
MGS Aranãs	14,76 b	27,12 a	81,36 a
MGS Paraíso 2	13,77 b	29,94 a	83,72 a
Paraíso MG H 419-1	11,96 b	32,80 a	82,56 a
H 6-47-10 pl. 3	12,52 b	21,18 b	64,85 b
Sarchimor MG 8840	7,72 b	21,34 b	54,68 b
Topázio MG 1190	24,66 a	20,85 b	90,05 a

Fonte: Do autor (2019).

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de agrupamento de Scott-Knott.

Na Tabela 7, estão os valores dos coeficientes de correlação de Pearson. Dentre eles, a eficiência de uso de fósforo na planta se correlacionou com a eficiência de uso de fósforo na raiz (0,82) e com a eficiência de uso de fósforo na parte aérea (0,68). A eficiência de uso de fósforo na planta é calculada por meio do somatório de alguns dados que geraram os dois últimos índices. A eficiência de uso de fósforo na planta também se correlacionou com a massa seca de raízes (0,93), com a massa seca da parte aérea (0,67) e com a massa seca total (0,89). Todos esses parâmetros de massa seca estão diretamente relacionados no cálculo da eficiência de uso de fósforo na planta, o que enfatiza os resultados obtidos. Ademais, a eficiência de uso de fósforo na planta se correlacionou com a densidade de esporos de micorrizas (0,75). As micorrizas desempenham um papel muito importante nos processos de aquisição do fósforo do solo pelas plantas, uma vez que uma maior taxa de simbiose entre as micorrizas e as plantas significa um maior potencial de aquisição de fósforo e consecutivamente uma melhor eficiência nutricional.

A eficiência de uso de fósforo na parte aérea se correlacionou com a massa seca da parte aérea (0,95), com a massa seca total (0,83), com o acúmulo de fósforo na parte aérea (0,67) e com o acúmulo de fósforo na planta (0,71). Esses parâmetros são inter-relacionados, o que auxilia na interpretação dos resultados. Também, isso é um indicativo de que plantas mais eficientes nutricionalmente conseguem acumular mais nutriente nos seus tecidos.

A eficiência de uso de fósforo na raiz se correlacionou negativamente com a eficiência na absorção de fósforo (-0,75), pois a eficiência na absorção de fósforo foi maior onde houve adubação fosfatada e as eficiências no uso de fósforo na parte aérea e na planta foram maiores onde não houve adubação fosfatada (TABELA 6, APÊNDICE A), apesar do fato de que a

eficiência de uso de fósforo na raiz não ter apresentado significância estatística para o fator dose (TABELA 5, APÊNDICE A). Além disso, a eficiência de uso de fósforo na raiz se correlacionou com a massa secas das raízes (0,89) e com a densidade de esporos de micorrizas (0,77). Também, assim como na eficiência de uso de fósforo na parte aérea, esses parâmetros são inter-relacionados. Um sistema radicular com um maior volume de raízes está diretamente relacionado com o sucesso de um determinado cultivo agrícola. Logo, plantas que possuem um sistema radicular mais volumoso tendem a serem mais eficientes nutricionalmente, pois conseguirão explorar melhor todo o solo para a aquisição de água e nutrientes.

O carbono da biomassa microbiana se correlacionou negativamente com a colonização micorrízica (-0,69). O que poderia explicar esse resultado é o fato de que houve um aumento do carbono da biomassa microbiana com o incremento de fósforo via adubação (TABELA 4) e a colonização micorrízica ser influenciada negativamente com essa prática, pois em solos onde a concentração de fósforo disponível é elevada, a simbiose não apresentaria muitas vantagens para a planta.

A densidade de esporos de micorrizas se correlacionou com a massa seca de raízes (0,88) e com a massa seca total (0,73). O processo de simbiose dos fungos micorrízicos com as plantas acontece do contato direto desses fungos com as raízes, logo, com um sistema radicular mais desenvolvido, as chances de a simbiose ocorrer aumentam, o que amplia e em muito o volume de solo que pode ser explorado pela planta.

O acúmulo de fósforo na planta se correlacionou com a massa seca da parte aérea (0,88), com a massa seca total (0,78), com o acúmulo de fósforo na raiz (0,82) e com o acúmulo de fósforo na parte aérea. O acúmulo de fósforo na parte aérea se correlacionou com a massa seca da parte aérea (0,84) e com a massa seca total (0,67). O acúmulo de fósforo na raiz se correlacionou com a massa seca das raízes (0,66), com a massa seca da parte aérea (0,72) e com a massa seca total (0,78). Também, a massa seca total se correlacionou com a massa seca das raízes (0,86) e com a massa seca da parte aérea (0,91). Os acúmulos são calculados, a partir da massa seca e do teor do nutriente de cada parte planta. Os resultados observados reforçam que esses parâmetros são inter-relacionados e concisos.

Tabela 7 - Coeficiente de correlação de Pearson entre as características massa seca de raízes (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca total (MST), acúmulo de fósforo na raiz (APRZ), acúmulo de fósforo na parte aérea (APPA), acúmulo de fósforo na planta (APPL), densidade de esporos de micorrizas (ESP), colonização micorrízica (COL), atividade da fosfatase ácida (FFT), carbono da biomassa microbiana (CBM), eficiência na absorção de fósforo (EAP), eficiência na translocação de fósforo (ETP), eficiência de uso de fósforo na raiz (EUPRZ), eficiência de uso de fósforo na parte aérea (EUPPA) e eficiência de uso de fósforo na planta (EUPPL) de genótipos de cafeeiro arábica relacionados ao déficit de fósforo.

	MSR	MSPA	MST	APRZ	APPA	APPL	ESP	COL	FFT	CBM	EAP	ETP	EUPRZ	EUPPA	EUPPL
MSR	-----	0,57	0,86**	0,66*	0,30	0,46	0,88**	-0,03	-0,09	-0,20	-0,54	-0,48	0,89**	0,49	0,93**
MSPA		-----	0,91**	0,72*	0,84**	0,88**	0,44	0,14	-0,12	-0,35	0,25	0,04	0,19	0,95**	0,67**
MST			-----	0,78**	0,67*	0,78**	0,73*	0,07	-0,12	-0,32	-0,12	-0,22	0,57	0,83**	0,89**
APRZ				-----	0,62	0,82**	0,52	-0,12	-0,15	-0,14	0,09	-0,60	0,35	0,59	0,58
APPA					-----	0,96**	0,23	0,27	-0,17	-0,47	0,61	0,18	-0,07	0,67*	0,31
APPL						-----	0,35	0,16	-0,18	-0,40	0,48	-0,09	0,07	0,71*	0,44
ESP							-----	-0,25	0,01	-0,17	-0,52	-0,39	0,77**	0,32	0,75*
COL								-----	-0,17	-0,69*	0,15	0,49	-0,15	0,19	0,00
FFT									-----	-0,33	-0,09	0,04	-0,04	-0,05	-0,08
CBM										-----	-0,12	-0,40	0,05	-0,30	-0,11
EAP											-----	0,39	-0,75*	0,15	-0,48
ETP												-----	-0,56	0,11	-0,34
EUPRZ													-----	0,15	0,82**
EUPPA														-----	0,68*
EUPPL															-----

Fonte: Do autor (2019).

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t; **: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.

Outros índices de eficiência que corroboram a seleção e classificação dos genótipos de cafeeiro arábica quanto à sua eficiência nutricional estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Massa seca total sob ausência de adubação fosfatada (MSTAP) e eficiência agrônômica de uso de fósforo (EAUP) de genótipos de cafeeiro arábica em seus respectivos grupos: ER (eficientes e responsivas), ENR (eficientes e não responsivas), NER (não eficientes e responsivas) e NENR (não eficientes e não responsivas).

Genótipos	MSTAP (g)	EAUP (g MS mg ⁻¹ P)
ER		
Bourbon Amarelo IAC J10	56,84	0,97
MGS Aranãs	52,14	0,63
ENR		
Paraíso MG H 419-1	67,38	0,22
Topázio MG 1190	52,71	0,42
MGS Paraíso 2	51,82	0,45
NER		
H 6-47-10 pl. 3	44,35	0,76
Catuaí Vermelho IAC 144	41,52	0,60
NENR		
Catiguá MG2	42,56	0,28
MGS Ametista	39,08	0,46
Sarchimor MG 8840	38,77	0,46
Média	48,72	0,52

Fonte: Do autor (2019).

As médias são usadas como parâmetro de referência (linha de corte) para classificação das cultivares, como mostrado na Figura 1.

A representação gráfica dos dados da Tabela 8 estão apresentados na Figura 1, conforme proposto por Gerloff (1977). As cultivares Bourbon Amarelo IAC J10 e MGS Aranãs foram classificadas como eficientes e responsivas, ou seja, são eficientes na produção de massa seca em condições de baixo suprimento de fósforo e respondem em incremento de massa seca caso seja fornecido adubação fosfatada. As cultivares Paraíso MG H 419-1, Topázio MG 1190 e MGS Paraíso 2 foram classificadas como eficientes e não responsivas, ou seja, são eficientes na produção de massa seca em condições de baixo suprimento de fósforo, porém não respondem em incremento de massa seca caso seja fornecido adubação fosfatada. A progênie H 6-47-10 pl. 3 e a cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 foram classificadas como não eficientes e responsivas, ou seja, não são eficientes na produção de massa seca em condições de baixo suprimento de fósforo, mas respondem em incremento de massa seca caso seja fornecido adubação fosfatada. As cultivares Catiguá MG2, MGS Ametista e Sarchimor MG 8840 foram classificadas como não eficientes e não responsivas, ou seja, não são

eficientes na produção de massa seca em condições de baixo suprimento de fósforo e não respondem em incremento de massa seca caso seja fornecido adubação fosfatada.

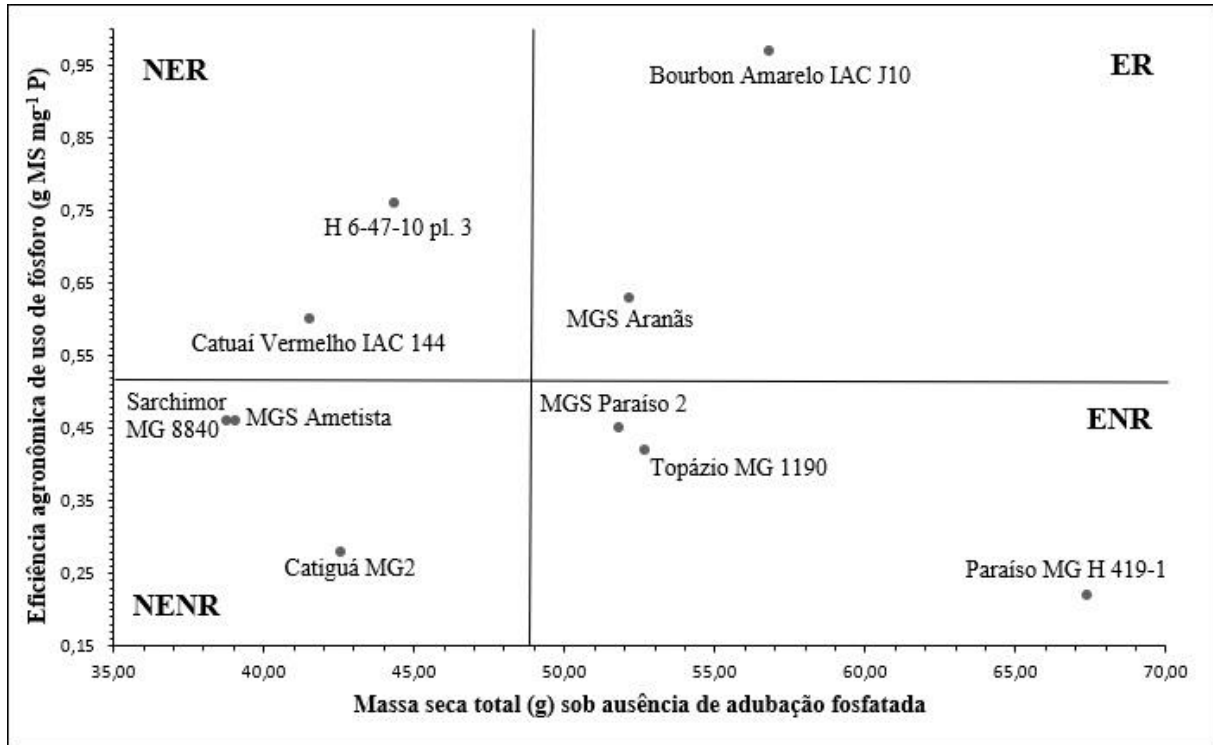
Em estudo conduzido por Paula Neto et al. (2016), os autores encontraram resultados divergentes ao deste estudo, e para as cultivares Bourbon Amarelo IAC J19 e Catuaí Vermelho IAC 144 a classificação foi como eficientes e não responsivas (ENR).

A relação próxima entre os diferentes índices de eficiência adotados pode ser observada quando verificamos que as cultivares que foram eficientes agronomicamente (responsivas ou não ao fósforo aplicado) são as mesmas que foram eficientes no uso de fósforo na planta, o comportamento com as não eficientes (também responsivas ou não ao fósforo aplicado) foi igual (TABELA 6). Isso enfatiza que esses índices são seguros e concisos na discriminação da eficiência.

A cultivar Bourbon Amarelo IAC J10 é notoriamente reconhecida pela sua predisposição a bebidas de qualidade superior, porém também é caracterizada por apresentar baixo vigor vegetativo e alta suscetibilidade à principal doença da cultura, a ferrugem, sofrendo com intenso depauperamento, caso disponha de nutrição inadequada e medidas de controle da doença não sejam adotadas. Nesse caso, em relação à nutrição fosfatada, é evidente que a cultivar Bourbon Amarelo IAC J10 necessita de uma atenção em especial, comportamento que deve ser estendido para a cultivar MGS Aranãs.

Já as cultivares Paraíso MG H 419-1, Topázio MG 1190 e MGS Paraíso 2 foram classificadas como eficientes na produção de massa seca e não responsivas ao fornecimento de fósforo, podendo ser utilizadas em solos com uma fertilidade fosfatada mais baixa ou em condições de cultivo onde o fornecimento de fósforo via adubação é inferior ao nível requerido pelas cultivares que são responsivas ao fornecimento do mesmo. No caso da cultivar MGS Paraíso 2, um outro fato que reforça esse resultado encontrado foi que essa cultivar apresentou significativa atividade de fosfatase ácida sob privação de P (TABELA 3). Essa fosfatase ácida influenciou positivamente na eficiência de uso do fósforo por essa cultivar, provavelmente na mineralização de fosfatos orgânicos do solo, deixando-os disponíveis para serem absorvidos e utilizados pela planta.

Figura 1 - Relação entre massa seca total sob ausência de adubação fosfatada (MSTAP) e eficiência agrônômica de uso de fósforo (EAUP) de genótipos de cafeeiro arábica em seus respectivos grupos: ER (eficientes e responsivos), ENR (eficientes e não responsivos), NER (não eficientes e responsivos) e NENR (não eficientes e não responsivos).



Fonte: Do autor (2019).

A determinação das eficiências nutricionais em experimentos em nível de campo fornece mais informações sobre o comportamento dos diferentes genótipos. Outros parâmetros agrônômicos, como exemplo a produtividade, também podem ser utilizados para a avaliação da eficiência nutricional, corroborando os dados obtidos em experimentos em casa de vegetação.

Cada vez mais se busca pela sustentabilidade em todas as atividades agrícolas e as avaliações microbiológicas tendem a entrar cada vez mais na rotina das análises laboratoriais, servindo como ótimos índices para a inferência do estado nutricional do solo e da planta, da conservação dos solos, dentre outros.

4 CONCLUSÕES

- a) As cultivares Catiguá MG2, MGS Ametista e Sarchimor MG 8840 não são eficientes e nem responsivas à adubação fosfatada;
- b) A progênie H 6-47-10 pl. 3 e a cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 não são eficientes, mas são responsivas à adubação fosfatada;
- c) As cultivares Paraíso MG H 419-1, Topázio MG 1190 e MGS Paraíso 2 são eficientes, mas não são responsivas à adubação fosfatada;
- d) As cultivares Bourbon Amarelo IAC J10 e MGS Aranãs são eficientes e responsivas à adubação fosfatada;
- e) A adubação fosfatada influencia positivamente no carbono da biomassa microbiana e negativamente na densidade de esporos de micorrizas;
- f) Genótipos de cafeeiro arábica respondem positivamente tanto com adubação fosfatada (MGS Ametista) quanto sem adubação fosfatada (MGS Paraíso 2) em atividade de fosfatase ácida.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, L. K.; GAZEY, C. An ecological view of the formation of VA mycorrhizas. **Plant and Soil**, The Hague, v. 159, n. 1, p. 69-78, Feb. 1994.
- ALEKSIEVA, P.; MICHEVA-VITEVA, S. Regulation of extracellular acid phosphatase biosynthesis by phosphates in proteinase producing fungus *Humicola lutea* 120-5. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v. 27, n. 8, p. 570-575, Nov. 2000.
- ALMEIDA, E. F. et al. Biomassa microbiana em sistema agroflorestal na zona da mata mineira. **Cadernos de Agroecologia**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 2, p. 739-742, set. 2007.
- ALVAREZ V. et al. Determinação e uso do fósforo remanescente. **Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência Solo**, Campinas, v. 25, p. 21-32, 2000.
- ALVIM, M. J.; BOTREL, M. A. Efeitos de doses de nitrogênio na produção de leite em pastagem de coastcross. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 577-583, mar. 2001.
- AMARAL, J. F. T. et al. Eficiência de utilização de nutrientes por cultivares de cafeeiro. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 4, p. 621-629, abr. 2011.
- ANDRADE, S. A. L. et al. Arbuscular mycorrhizal association in coffee. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 147, n. 2, p. 105-115, Apr. 2009.
- AON, M. A. et al. Spatio-temporal pattern of soil microbial and enzymatic activities in an agricultural soil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 18, n. 3, p. 239-254, Nov. 2001.
- ASCENCIO, J. Acid phosphatase as a diagnostic tool. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 25, n. 9/10, p. 1553-1564, June 1994.
- BAINARD, L. D.; KLIRONOMOS, J. N.; GORDON, A. M. Arbuscular mycorrhizal fungi in tree-based intercropping systems: a review of their abundance and diversity. **Pedobiologia**, Jena, v. 54, n. 2, p. 57-61, Mar. 2011.
- BALOTA, E. L.; CHAVES, J. C. D. Enzymatic activity and mineralization of carbon and nitrogen in soil cultivated with coffee and green manures. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, n. 5, p. 1573-1583, set./out. 2010.
- BERNARD, M. et al. Characterization of a cell-wall acid phosphatase (phoap) in *Aspergillus fumigatus*. **Microbiology**, Washington, v. 148, n. 9, p. 2819-2829, Sept. 2002.
- BIELESKI, R. L.; FERGUNSON, J. B. Physiology and metabolism of phosphate and its compounds. In: PIRSON, A.; ZIMMERMANN, M. H. (Ed.). **Encyclopedia of plant physiology: inorganic plant nutrition**. Berlin: Springer Verlag, 1983. p. 422-449.
- CAMARGO, M. L. P. et al. Considerações sobre eficiência nutricional em *Eucalyptus*. **Científica**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 191-196, 2004.

CARNEIRO, M. A. C. et al. Atributos bioquímicos em dois solos de cerrado sob diferentes sistemas de manejo e uso. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 38, n. 4, p. 276-283, dez. 2008b.

_____. Carbono orgânico, nitrogênio total, biomassa e atividade microbiana do solo em duas cronossequências de reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, n. 2, p. 621-632, mar./abr. 2008a.

CARVALHO, A. M. et al. Correlação entre crescimento e produtividade de cultivares de café em diferentes regiões de Minas Gerais, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 3, p. 269-275, mar. 2010.

CATTELAN, A. J.; VIDOR, C. Flutuações na biomassa, atividade e população do solo, em função de variações ambientais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 133-142, 1990.

CHAER, G. M.; MYROLD, D. D.; BOTTOMLEY, P. J. A soil quality index based on the equilibrium between soil organic matter and biochemical properties of undisturbed coniferous forest soils of the Pacific Northwest. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 41, n. 4, p. 822-830, Apr. 2009.

CRUZ, C. D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 35, n. 3, p. 271-276, jul./set. 2013.

DIAS-JÚNIOR, H. E. et al. Metais pesados, densidade e atividade microbiana em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 22, n. 4, p. 631-640, nov. 1998.

DICK, R. P. Soil enzymes activities as indicators of soil quality. In: DORAN, J. W. et al. (Ed.). **Defining soil quality for a sustainable environment**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 107-124. (Special Publication number, 35).

DICK, W. A.; TABATABAI, M. A. Significance and potential uses of soil enzymes. In: METTING JUNIOR, F. B. (Ed.). **Soil microbial ecology applications in agricultural and environmental management**. New York: M. Dekker, 1993. p. 95-127.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa-SPI, 2006. 306 p.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004. 510 p.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C. Screening crop genotypes for mineral stresses. In: WORKSHOP ON ADAPTATION OF PLANTS TO SOIL STRESSES, 1993, Lincoln. **Proceedings...** Lincoln: University of Nebraska, 1993. p. 142-162.

FAGERIA, N. K. Otimização da eficiência nutricional na produção das culturas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 2, n. 1, p. 6-16, jan./abr. 1998.

FAUCI, M. F.; DICK, R. P. Microbial biomass as an indicator of soil quality: effects of long-term management and recent soil amendments. In: DORAN, J. W. et al. (Ed.). **Defining soil quality for a sustainable environment**. Madison: SSSA, 1994. p. 229-234. (SSSA Special Publication, 35).

FERNANDES, L. A. et al. Fósforo e atividade da fosfatase ácida em plantas de feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 5, p. 769-778, maio 1998.

_____. Frações de fósforo e atividade da fosfatase ácida em plantas de feijoeiro cultivadas em solos de várzea. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, n. 3, p. 561-571, set. 2000.

FERNANDEZ, D. S.; ASCENCIO, J. Acid phosphatase activity in bean and cowpea plants grown under phosphorus stress. **Journal of Plant Nutrition**, Alexandria, v. 17, n. 2/3, p. 229-241, Nov. 1994.

FERREIRA, A. D. et al. Crescimento de cafeeiros enxertados cultivados em solução nutritiva. **Coffee Science**, Lavras, v. 9, n. 3, p. 312-318, jul./set. 2014.

FÖHSE, D. et al. Phosphorus efficiency of plants: II. Significance of root radius, root hairs and catio-anion balance for phosphorus influx in seven plant species. **Plant and Soil**, The Hague, v. 132, n. 2, p. 261-272, Apr. 1991.

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

GERLOFF, G. C. Plant efficiencies in the use of N, P and K. In: WRIGHT, M. J. (Ed.). **Plant adaptation to mineral stress in problem soils**. New York: Cornell University Press, 1977. p. 161-174.

GIOVANETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, Cambridge, v. 84, n. 3, p. 482-500, Mar. 1980.

GLAESER, D. F. et al. Biomassa microbiana do solo sob sistemas de manejo orgânico em cultivos de café. **Ensaio e Ciência**, Campo Grande, v. 14, n. 2, p. 103-114, 2010.

GUIMARÃES, N. F. et al. Biomassa e atividade microbiana do solo em diferentes sistemas de cultivo do cafeeiro. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 40, n. 1, p. 34-44, mar. 2017.

HIDAYAT, B. J.; ERIKSEN, N. T.; WIEBE, M. G. Acid phosphatase production by *Aspergillus niger* N402A in continuous flow culture. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 254, n. 2, p. 324-331, Jan. 2006.

JAKELAITIS, A. et al. Qualidade da camada superficial de solo sob mata, pastagens e áreas cultivadas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 38, n. 2, p. 118-127, abr./jun. 2008.

- JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 48, n. 9, p. 692, 1964.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 452 p.
- KOSKE, R. E.; GEMMA, J. N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, Cambridge, v. 92, n. 4, p. 486-488, 1989.
- LAMMEL, D. R. et al. Microbiological and faunal soil attributes of coffee cultivation under different management systems in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 75, n. 4, p. 894-905, nov. 2015.
- LI, B.; MCKEAN, S. E.; ALLEN, H. L. Genetic variation in nitrogen use efficiency of loblolly pine seedlings. **Forest Science**, Bethesda, v. 37, n. 2, p. 613-626, June 1991.
- LI-COR ENVIRONMENTAL. LI-6400XT Portable Photosynthesis System. **LI-COR**, Nebraska, 2012.
- LOPES, A. A. C. et al. Interpretation of microbial soil indicators as a function of crop yield and organic carbon. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 77, p. 461-472, 2013.
- MALAVOLTA, E. **Nutrição mineral e adubação do cafeeiro: colheitas econômicas máximas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1993. 43 p.
- MARCHIORI JUNIOR, M.; MELO, W. J. Alterações na MO e na biomassa microbiana em solo de mata natural submetido a diferentes manejos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 6, p. 1177-1182, jun. 2000.
- MARGALEF, O. et al. Global patterns of phosphatase activity in natural soils. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 1337, p. 1-13, Dec. 2017.
- MCGONIGLE, T. P.; MILLER, M. H. Winter survival of extraradical hyphae and spores of arbuscular mycorrhizal fungi in the field. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 41-50, Apr. 1999.
- MELE, P. M.; CARTER, M. R. Effect of climatic factors on the use of microbial biomass as an indicator of changes in soil organic matter. In: MULONGOY, K.; MERCKX, R. (Ed.). **Soil organic matter dynamics and sustainability of tropical agriculture**. New York: J. Wiley & Sons, 1993. p. 57-64.
- MOREIRA, F. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia bioquímica do solo**. 2. ed. atual. e ampl. Lavras: Ed. UFLA, 2006. 729 p.
- NAIR, M. G.; SAFIR, G. N.; SIQUEIRA, J. O. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 2, p. 434-439, Feb. 1991.

NOVAIS, R. F.; NEVES, J. C. L.; BARROS, N. F. Ensaio em ambiente controlado. In: OLIVEIRA, A. J. et al. (Coord.). **Métodos de pesquisa em fertilidade do solo**. Brasília: Embrapa-SEA, 1991. p. 189-253. (Documentos, 3).

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa: Ed. UFV/DPS, 1999. 399 p.

OLIVEIRA, I. P. et al. Avaliação de cultivares de feijão quanto à eficiência no uso do fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 1, p. 39-45, jan. 1987.

PARTELLI, F. L. et al. Chemical and microbiological soil characteristics under conventional and organic coffee production systems. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 43, n. 5, p. 847-864, Mar. 2012.

PAULA NETO A. et al. Analysis of phosphorus use efficiency traits in *Coffea* genotypes reveals *Coffea arabica* and *Coffea canephora* have contrasting phosphorus uptake and utilization efficiencies. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, p. 408, Mar. 2016.

PEREIRA, J. B. D. **Eficiência nutricional de nitrogênio e de potássio em plantas de café (*Coffea arabica* L.)**. 1999. 99 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for cleaning roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 55, n. 1, p. 158-161, Aug. 1970.

POZZA, A. A. A. et al. Suprimento do silicato de cálcio e a eficiência nutricional de variedades de cafeeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1705-1714, dez. 2009.

POWLSON, D. S.; BROOKES, P. C.; CHRISTENSEN, B. T. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in the total soil organic matter due to straw incorporation. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 19, n. 2, p. 159-164, 1987.

RAGHOTHAMA, K. G.; KARTHIKEYAN, A. S. Phosphate acquisition. **Plant and Soil**, The Hague, v. 274, n. 1/2, p. 37-49, July 2005.

REIS JÚNIOR, R. A.; MARTINEZ, H. E. P. Adição de Zn e absorção, translocação e utilização de Zn e P por variedades de cafeeiro. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 3, p. 537-542, jul./set. 2002.

RENELLA, G. et al. Microbial activity and hydrolase synthesis in long-term Cd-contaminated soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 37, n. 1, p. 133-139, Jan. 2005.

RÖSSNER, H. et al. Indirect estimation of microbial biomass. In: SCHINNER, F. et al. (Ed.). **Methods in soil biology**. Heidelberg: Springer Verlag, 1996. p. 47-75.

RUTGERS, M. et al. A method to assess ecosystem services developed from soil attributes with stakeholders and data of four arable farms. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 415, p. 39-48, Jan. 2012.

SANDIM, A. et al. Avaliação de altura de plantas e número de gemas por metro da cultivar RB 83-5486 de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) em diferentes 48 fontes fosfatadas na adubação de base em Campo Grande, MS. In: FERTILIDADE E BIOLOGIA DO SOLO: DESAFIOS PARA O USO DO SOLO COM EFICIÊNCIA E QUALIDADE AMBIENTAL, 2008, Londrina. **Resumos Expandidos...** Londrina: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2008. 1 CD-ROM.

SARRUGE, J. R.; HAAG, H. P. **Análise química das plantas**. Piracicaba: Ed. ESALQ, 1974. 56 p.

SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M. Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. **Journal of Plant Nutrition**, Alexandria, v. 4, n. 3, p. 289-302, Nov. 1981.

SILVA, F. C.; BASSO, L. C. Avaliação da atividade in vivo da fosfatase ácida da folha na diagnose da nutrição fosfórica em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 17, p. 371-375, 1993.

SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. São Paulo: IAC, 2007. 312 p.

SILVEIRA, R. B.; MELLONI, R.; MELLONI, E. G. P. Atributos microbiológicos e bioquímicos como indicadores da recuperação de áreas degradadas em Itajubá/MG. **Cerne**, Lavras, v. 12, n. 1, p. 48-55, jan./mar. 2006.

SIQUEIRA, J. O.; COLOZZI-FILHO, A.; OLIVEIRA, E. Ocorrência de micorrizas vesicular-arbusculares em agro e ecossistemas do estado de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 12, p. 1489-1498, dez. 1989.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 2. ed. New York: Academic, 1997. 604 p.

SWIADER, J. M.; CHYAN, Y.; FREIJI, F. G. Genotypic differences in nitrate uptake and utilization efficiency in pumpkin hybrids. **Journal of Plant Nutrition**, Alexandria, v. 17, n. 10, p. 1687-1699, 1994.

TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 1, n. 4, p. 301-307, Nov. 1969.

TEDESCO, M. J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Ed. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 147 p. (Boletim Técnico, 5).

TOMAZ, M. A. et al. Eficiência de absorção e utilização de boro, zinco, cobre e manganês em mudas enxertadas de cafeeiro. **Ceres**, Viçosa, v. 58, n. 1, p. 108-114, fev. 2011.

VAN RAIJ, B.; QUAGGIO, J. A. **Métodos de análises de solos para fins de fertilidade.** Campinas: Instituto Agrônomo, 1983. 31 p. (IAC. Boletim técnico, 81).

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 19, n. 6, p. 703-707, 1987.

VARGAS, L. K.; SCHOLLES, D. Biomassa microbiana e produção de C-CO₂ e N mineral de um solo Podzólico Vermelho-Escuro submetido a diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, n. 1, p. 35-42, jan./mar. 2000.

VÁSQUEZ-MURRIETA, M. S. et al. C and N mineralization and microbial biomass in heavy-metal contaminated soil. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 42, n. 2, p. 89-98, Apr./June 2006.

APÊNDICE A - TABELAS

Tabela 1 - Resumo da análise de variância da massa seca das raízes (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca total (MST), acúmulo de fósforo na raiz (APRZ), acúmulo de fósforo na parte aérea (APPA), acúmulo de fósforo na planta (APPL), fósforo disponível no solo (PDI), fósforo resina (PRS), fósforo remanescente no solo (PRM), teor de fósforo na raiz da planta (PRZ), teor de fósforo na parte aérea da planta (PPA), taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (g_{sw}), concentração intracelular de CO_2 (C_i) e transpiração (E) de genótipos de cafeeiro arábica relacionados ao déficit de fósforo.

QMS e significância do teste F									
FV	GL	MSR	MSPA	MST	APRZ	APPA	APPL	PDI	PRS
Genótipos (G)	9	181,59*	255,56*	681,76*	66,72*	274,64 ^{ns}	508,68*	0,90 ^{ns}	24,86 ^{ns}
Dose (D)	1	1.557,61*	848,90*	4.706,31*	1.693,07*	13.844,84*	25.219,20*	159,64*	6.450,69*
G*D	9	68,99 ^{ns}	18,09 ^{ns}	109,89 ^{ns}	28,37 ^{ns}	145,90 ^{ns}	154,38 ^{ns}	0,82 ^{ns}	23,44 ^{ns}
Bloco	3	70,31	35,51	159,57	13,94	572,70	562,42	5,85	35,21
Erro	57	41,00	21,73	71,42	20,37	230,83	230,50	1,28	19,28
Total	79								
CV (%)		26,76	14,36	14,99	29,47	44,16	30,53	58,69	36,98
Média		23,93	32,45	56,39	15,31	34,40	49,72	1,93	11,87

QMs e significância do teste F									
FV	GL	PRM	PRZ	PPA	A	g_{sw}	C_i	E	
Genótipos (G)	9	2,03 ^{ns}	0,07*	0,09 ^{ns}	9,55 ^{ns}	0,09 ^{ns}	884,81 ^{ns}	1,46 ^{ns}	
Dose (D)	1	13,19*	0,61*	7,50*	0,84 ^{ns}	0,00 ^{ns}	1.668,14 ^{ns}	0,91 ^{ns}	
G*D	9	1,04 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,14 ^{ns}	6,11 ^{ns}	0,01 ^{ns}	1.692,48 ^{ns}	0,89 ^{ns}	
Bloco	3	15,93	0,05	0,29	8,39	0,01	10.852,72	2,46	
Erro	57	1,33	0,02	0,19	7,37	0,01	940,31	0,97	
Total	79								
CV (%)		27,55	22,68	42,89	33,39	47,75	10,03	40,69	
Média		4,19	0,64	1,03	8,13	0,21	305,66	2,42	

*: significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns}: não significativo.

Tabela 2 - Médias da massa seca das raízes (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca total (MST), acúmulo de fósforo na raiz (APRZ), acúmulo de fósforo na parte aérea (APPA), acúmulo de fósforo na planta (APPL), fósforo disponível no solo (PDI), fósforo resina (PRS), fósforo remanescente no solo (PRM), teor de fósforo na parte aérea da planta (PPA) e teor de fósforo na raiz da planta (PRZ) sob ausência ou presença de adubação fosfatada.

Dose	MSR (g)	MSPA (g)	MST (g)	APRZ (mg)	APPA (mg)	APPL (mg)	PDI (mg dm ⁻³)	PRS (mg dm ⁻³)	PRM (mg L ⁻¹)	PPA (g kg ⁻¹)	PRZ (g kg ⁻¹)
- P	19,52 b	29,20 b	48,72 b	10,71 b	21,25 b	31,96 b	0,52 b	2,89 b	3,78 b	0,73 b	0,55 b
+ P	28,34 a	35,72 a	64,06 a	19,91 a	47,56 a	67,47 a	3,34 a	20,85 a	4,60 a	1,34 a	0,73 a
% incremento	45,2	22,3	31,5	85,9	123,8	111,1	542,3	621,5	21,7	83,6	32,7

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de agrupamento de Scott-Knott. O percentual de incremento (% incremento) se refere entre onde houve a adubação fosfatada (+P) sobre onde não houve a adubação fosfatada (-P).

Tabela 3 - Resumo da análise de variância da densidade de esporos de micorrizas (ESP), colonização micorrízica (COL), atividade da fosfatase ácida (FFT) e carbono da biomassa microbiana (CBM) de genótipos de cafeeiro arábica relacionados ao déficit de fósforo.

QMs e significância do teste F					
FV	GL	ESP	COL	FFT	CBM
Genótipos (G)	9	56.568,91*	34,16 ^{ns}	4.461,36*	1.964,30*
Dose (D)	1	836.405,00*	2,42 ^{ns}	133,07 ^{ns}	3.506,34*
G*D	9	26.228,11*	10,28 ^{ns}	6.387,78*	5.022,80*
Bloco	3	15.189,00	12,31	394,67	789,83
Erro	57	6.508,43	26,76	1.621,89	450,70
Total	79				
CV (%)		34,21	37,98	45,59	24,42
Média		235,85	13,62	88,33	86,94

*: significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ns: não significativo.

Tabela 4 - Resumo do desdobramento da interação da análise de variância da densidade de esporos de micorrizas (ESP), atividade da fosfatase ácida (FFT) e carbono da biomassa microbiana (CBM) de genótipos de cafeeiro arábica relacionados ao déficit de fósforo.

QMs e Significância do teste F				
FV	GL	ESP	FFT	CBM
Dose: Bourbon Amarelo IAC J10	1	344.450*	1.497,68 ^{ns}	26,49 ^{ns}
Dose: Catiguá MG2	1	70.688*	779,13 ^{ns}	7.606,37*
Dose: Catuaí Vermelho IAC 144	1	23.762 ^{ns}	137,44 ^{ns}	7.470,69*
Dose: MGS Ametista	1	69.938*	31.019,17*	4.132,76*
Dose: MGS Aranãs	1	69.192*	2.918,48 ^{ns}	1.221,41 ^{ns}
Dose: MGS Paraíso 2	1	140.450*	18.513,69*	3.178,43*
Dose: Paraíso MG H 419-1	1	221.778*	1.688,96 ^{ns}	2.913,51*
Dose: H 6-47-10 pl. 3	1	115.200*	992,35 ^{ns}	58,53 ^{ns}
Dose: Sarchimor MG 8840	1	14.112 ^{ns}	0,82 ^{ns}	7.526,41*
Dose: Topázio MG 1190	1	2.888 ^{ns}	75,39 ^{ns}	14.576,92*
Erro	57	6.508,43	1.621,89	450,70

*: significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ns: não significativo.

Tabela 5 - Resumo da análise de variância da eficiência na absorção de fósforo (EAP), eficiência na translocação de fósforo (ETP), eficiência de uso de fósforo na raiz (EUPRZ), eficiência de uso de fósforo na parte aérea (EUPPA) e eficiência de uso de fósforo na planta (EUPPL) de genótipos de cafeeiro arábica relacionados ao déficit de fósforo.

QMs e significância do teste F						
FV	GL	EAP	ETP	EUPRZ	EUPPA	EUPPL
Genótipos (G)	9	1,38 ^{ns}	154,26 ^{ns}	197,43 [*]	182,26 [*]	1.709,31 [*]
Dose (D)	1	17,46 [*]	331,86 ^{ns}	6,85 ^{ns}	1.419,86 [*]	3.650,80 [*]
G*D	9	1,07 ^{ns}	136,42 ^{ns}	104,38 ^{ns}	45,57 ^{ns}	924,63 ^{ns}
Bloco	3	0,30	322,09	53,54	4,66	168,75
Erro	57	1,03	115,02	57,06	84,61	700,90
Total	79					
CV (%)		46,45	16,05	54,82	37,49	36,08
Média		2,18	66,81	13,78	24,53	73,37

*: significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns}: não significativo.

Tabela 6 - Médias da eficiência na absorção de fósforo (EAP), eficiência de uso de fósforo na parte aérea (EUPPA) e eficiência de uso de fósforo na planta (EUPPL) sob ausência ou presença de adubação fosfatada.

Dose	EAP (mg g ⁻¹)	EUPPA (g ² mg ⁻¹)	EUPPL (g ² mg ⁻¹)
- P	1,71 b	28,75 a	80,12 a
+ P	2,65 a	20,32 b	66,61 b
% incremento	55,0 [*]	41,5 ^{**}	20,3 ^{**}

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de agrupamento de Scott-Knott.

*O percentual de incremento (% incremento) da EAP se refere entre onde houve a adubação fosfatada (+P) sobre onde não houve a adubação fosfatada (-P).

**O percentual de incremento (% incremento) da EUPPA e da EUPPL se refere entre onde não houve a adubação fosfatada (-P) sobre onde houve a adubação fosfatada (+P).

APÊNDICE B - FIGURA

Figura 1 - Genótipos de cafeeiro arábica e seus respectivos grupos de responsividade e eficiência no uso do fósforo: MGS Aranãs e Bourbon Amarelo IAC J10 (eficientes e responsivos); MGS Paraíso 2, Topázio MG 1190 e Paraíso MG H 419-1 (eficientes e não responsivos); Catuaí Vermelho IAC 144 e H 6-47-10 cova 3 (não eficientes e responsivos) e Catiguá MG2, MGS Ametista e Sarchimor MG 8840 (não eficientes e não responsivos).



CAPÍTULO 3 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DA FAMÍLIA DAS FOSFATASES ÁCIDAS EM CAFEEIROS

RESUMO

As Purple Acid Phosphatase (PAP), ou fosfatase ácida púrpura (FAP), são uma classe especial de fosfatase ácida (APase). As fosfatases são enzimas que estão amplamente distribuídas na natureza, responsáveis em catalisar a hidrólise de ésteres fosfatados, produzindo fósforo solúvel e são responsáveis pela mineralização de fosfato orgânico e baixos níveis de fosfato inorgânico livre. Estudos com as PAPs em algumas espécies já foram feitos, como os realizados em *Arabidopsis*, arroz e soja. Todavia, estudos nesse sentido são escassos para o cafeeiro. Espera-se que os diferentes genótipos de cafeeiro apresentem variabilidade na sua capacidade em produzir e exsudar fosfatases ácidas. Objetivou-se com este trabalho identificar e caracterizar genes da família das fosfatases ácidas em cafeeiros. O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), situada no município de Lavras – MG. Cada parcela experimental consistiu em um vaso com dez litros de solo, com uma planta. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2 (2 cultivares de cafeeiro arábica e duas dosagens de adubação fosfatada), com três repetições, totalizando 12 parcelas experimentais. As adubações foram feitas por meio de soluções nutritivas. O experimento permaneceu por oito meses em casa de vegetação, e, em seguida, foi desmontado e as amostras de material vegetal de cada parcela foram coletadas para as análises laboratoriais. Foram identificados e caracterizados genes da família das PAPs em cafeeiros. Foram identificados 29 genes da família PAP no genoma de *Coffea canephora*. Na cultivar MGS Paraíso 2 algumas PAPs foram mais expressadas sob privação de P (*CarPAP3*, *CarPAP11* e *CarPAP18*) e outras foram indiferentes à questão do P (*CarPAP12*). A expressão gênica de *CarPAP18* e a atividade de fosfatase ácida foi altamente significativa na cultivar MGS Paraíso 2 sob privação de P.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. *Coffea canephora*. Cultivares. PAP. Fosfato.

ABSTRACT

Purple Acid Phosphatase (PAP) is a special class of acid phosphatase (APase). Phosphatases are enzymes that are widely distributed in nature and are responsible for catalyzing the hydrolysis of phosphate esters, producing soluble phosphorus and are also responsible for the mineralization of organic phosphate and low levels of free inorganic phosphate. Studies with PAPs in some species have already been made, such as those conducted on *Arabidopsis*, rice and soybeans. However, studies in this sense are scarce for coffee. The different coffee genotypes are expected to exhibit variability in their ability to produce and exude acid phosphatases. This work aimed to identify and characterize genes of the family of acid phosphatases in coffee trees. The experiment was conducted in a greenhouse of the Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), located in the municipality of Lavras - MG. Each experimental plot consisted of one pot with ten liters of soil, with one plant. The experimental design was a completely randomized design, in a 2x2 factorial scheme (2 cultivars of arabica coffee and two dosages of phosphate fertilization), with three replications, totaling 12 experimental plots. Fertilization was done through nutrient solutions. The experiment lasted in the greenhouse for eight months, then it was disassembled and the samples of plant material from each plot were collected for laboratory analysis. Genes of the family of PAPs in coffee trees were identified and characterized. Were identified 29 genes of the PAP family in the genome of *Coffea canephora*. In the cultivar MGS Paraíso 2 some PAPs were more expressed under P deprivation (*CarPAP3*, *CarPAP11* and *CarPAP18*) and others were indifferent to the P question (*CarPAP12*). The gene expression of *CarPAP18* and acid phosphatase activity was highly significant in the MGS Paraíso 2 cultivar under P deprivation.

Keywords: *Coffea arabica*. *Coffea canephora*. Cultivars. PAP. Phosphate.

1 INTRODUÇÃO

A demanda por alimentos no planeta cresce de forma acentuada atualmente. Para suprir essa demanda, uma das principais alternativas na agricultura é obter cultivos mais produtivos, sem que haja a necessidade de utilizar novas áreas para tal finalidade. Uma dessas alternativas é usar cultivares mais adaptadas às diversas condições de cultivo. Nesse quesito, plantas mais eficientes nutricionalmente, além de produzirem mais, usam menos recursos não renováveis, como é o caso dos fertilizantes, amplamente utilizados na agricultura, mas que possuem alguns entraves do ponto de vista ambiental e econômico. Para atingir uma situação mais sustentável de produção, algumas ferramentas podem ser utilizadas, uma vez que uma delas é com a melhoria na capacidade da planta em adquirir os nutrientes que precisa diretamente dos solos, principalmente no caso do fósforo (P).

O fósforo (P) é um macronutriente essencial que desempenha um papel importante no crescimento e desenvolvimento das plantas (MARSCHNER; RIMMINGTON, 1988; VANCE, 2001). Todavia, na maioria dos solos, o teor de fósforo inorgânico (Pi) é muito inferior ao necessário para o crescimento das plantas. A maioria do fósforo existente é encontrado na forma orgânica (Po) ou está fixado em cálcio, ferro e alumínio, que não podem ser utilizados diretamente pelas plantas (GEORGE; RICHARDSON, 2008).

Para sobreviver em ambientes de baixa disponibilidade de fósforo, as plantas desenvolveram uma ampla gama de respostas adaptativas para melhorar a eficiência de utilização do fósforo (CHIOU; LIN, 2011; WU et al., 2013), como o aumento da fosfatase ácida (HUR et al., 2010; LIANG et al., 2010; XIAO et al., 2006).

As fosfatases são enzimas que estão amplamente distribuídas na natureza, e são encontradas em organismos procariotos e eucariotos (GUIMARÃES et al., 2004). Elas catalisam a hidrólise de ésteres fosfatados produzindo fósforo solúvel e são responsáveis pela mineralização de fosfato orgânico e baixos níveis de fosfato inorgânico livre (AOYAMA et al., 2003). Os microrganismos e as plantas são responsáveis pela produção da maioria das fosfatases ácidas encontradas no solo, sua atividade fundamental está no ciclo do fósforo e na liberação desse nutriente para as plantas (TARAFDAR, 1995).

Grande parte do fósforo que é aplicado no solo como fertilizante rapidamente se torna indisponível para as plantas, acumulando-se em frações de fósforo inorgânico, que é fixado por absorção, precipitação química e frações de fósforo orgânico, que são imobilizados na matéria orgânica (SANYAL; DATTA, 1991). Em muitos solos, a fração de fósforo orgânico é maior do que a inorgânica. Por essa razão, a disponibilidade desse elemento para as plantas

torna-se dependente da mineralização dos compostos orgânicos, papel este desempenhado pelas fosfatases. Essas enzimas são induzíveis e, portanto, são sintetizadas predominantemente em condições de baixa disponibilidade de fósforo no solo (RÖSSNER et al., 1996).

As Purple Acid Phosphatase (PAP), ou fosfatase ácida púrpura (FAP), são um tipo de fosfatase ácida e contém um centro de íon metálico binuclear, que hidrolisa uma vasta quantidade de ésteres de fosfato e fosfato anidro em condições ácidas ótimas. As PAPs possuem cinco motivos conservados (**DXG/GDXXY/GNH(D/E)/VXXH/GHXXH**, letras em negrito representam resíduos invariantes), que podem coordenar o centro metálico binuclear para hidrolisar o fósforo orgânico (Po) (BOZZO; RAGHOTHAMA; PLAXTON, 2004; OLCZAK; MORAWIECKA; WATOREK, 2003; SCHENK et al., 1999). Os sete resíduos invariantes D, DY, N, H e HH foram respectivamente distribuídos nos cinco motivos conservados (LI et al., 2002; SCHENK et al., 2000).

A fosfatase ácida púrpura (PAP) é uma classe especial de fosfatase ácida (APase) que exhibe características distintas, incluindo uma cor roxa ou rosa em solução aquosa, atividade que é insensível à inibição pelo L-tartarato, e um sítio bimetálico ativo (TIAN; LIAO, 2015). As PAPs vegetais foram amplamente identificadas e caracterizadas em muitas espécies com o auxílio de tecnologias bioquímicas e moleculares. A caracterização de vários componentes moleculares, bioquímicos e aspectos funcionais das PAPs são fundamentais para entender completamente suas funções no metabolismo do fósforo (TIAN; LIAO, 2015). Com base na função, as fosfatases ácidas podem ser divididas em fosfatases ácidas secretadas (SAPs) e fosfatases ácidas intracelulares (IAPs). A maioria das fosfatases ácidas intracelulares estão presentes no vacúolo como proteínas solúveis, enquanto as fosfatases ácidas secretadas estão localizadas na parede celular ou secretadas na rizosfera (DUFF; SARATH; PLAXTON, 1994).

Estudos com as PAPs em algumas espécies já foram feitos, como os realizados em *Arabidopsis* (LI et al., 2002), arroz (ZHANG et al., 2011) e soja (LI et al., 2012). Todavia, estudos nesse sentido são escassos para o cafeeiro. Espera-se que diferentes genótipos de cafeeiro apresentem variabilidade na sua capacidade em produzir fosfatases ácidas. Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho identificar e caracterizar genes da família das fosfatases ácidas em cafeeiros.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), situada no município de Lavras – MG, localizada na latitude de 21°14'30" Sul e longitude de 45°00'10" Oeste e altitude de 918,8 m. A temperatura e umidade relativa média da casa de vegetação no período experimental foram de 23°C e 65%, respectivamente.

O solo utilizado no experimento foi classificado como Latossolo Vermelho Distrófico típico argiloso e muito argiloso (EMBRAPA, 2006). O solo foi peneirado e homogeneizado antes de se aplicarem quaisquer tratamentos. Foi feita uma calagem para a correção da acidez do solo e elevação da saturação por bases para 70%. Os vasos foram molhados duas vezes por semana e permaneceram por 30 dias em período de incubação, para reação do calcário. As mudas utilizadas no experimento foram produzidas com substrato comercial Plantmax® e transplantadas quando apresentaram três pares de folhas.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2 (2 cultivares de cafeeiro arábica e duas dosagens de adubação fosfatada), com três repetições, totalizando 12 parcelas experimentais. Cada parcela experimental consistiu em um vaso com dez litros de solo, com uma planta. As cultivares utilizadas foram: Sarchimor MG 8840 e MGS Paraíso 2. As duas dosagens de adubação fosfatada foram a dose zero (sem adubação fosfatada) e a dose de 200 mg dm⁻³ de P por vaso. A adubação fosfatada, nas parcelas experimentais que a recebeu, foi realizada em uma única aplicação, uma semana antes do transplantio das mudas nos vasos. Ainda, cada vaso recebeu 300 mg dm⁻³ de N e 200 mg dm⁻³ de K, parcelados em cinco vezes, aplicados a cada trinta dias, com a primeira aplicação feita na data do transplantio das mudas para os vasos. As dosagens utilizadas foram adaptadas de Novais, Neves e Barros (1991). Todas as adubações foram feitas por meio de soluções nutritivas. Os vasos foram irrigados de 3-4 vezes por semana, variando com o crescimento das plantas ao longo dos meses, e o volume de água adicionado foi calculado para que não houvesse escoamento por excesso.

O experimento permaneceu por oito meses em casa de vegetação. Em seguida, foi desmontado e as amostras de material vegetal (raízes) de cada parcela foram coletadas para as análises. Foram coletados cerca de 10 ápices radiculares de 1 cm, aproximadamente, em cada

parcela. As raízes coletadas foram imediatamente imersas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o momento da extração de RNA.

As propriedades químicas, físicas e microbiológicas do solo utilizado no experimento, antes de receberem quaisquer dos tratamentos, estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Propriedades químicas, físicas e microbiológicas do solo utilizado no experimento.

Característica	Unidade	Valores
pH	-	5,80
P - Mehlich-1	mg dm^{-3}	0,28
P - Resina	mg dm^{-3}	2,27
P- Remanescente	mg L^{-1}	1,52
K	mg dm^{-3}	22,0
Ca^{2+}	$\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	0,30
Mg^{2+}	$\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	0,10
S.SO ₄	mg dm^{-3}	7,82
Cu^{2+}	mg dm^{-3}	0,57
B	mg dm^{-3}	0,56
Zn^{2+}	mg dm^{-3}	0,59
Fe^{2+}	mg dm^{-3}	34,67
Mn^{2+}	mg dm^{-3}	4,30
Al^{3+}	$\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	0,00
(H+Al)	$\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	0,84
Soma de bases (SB)	$\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	0,46
CTC efetiva (t)	$\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	0,46
CTC potencial (T)	$\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	1,30
Saturação por alumínio (m)	%	0,00
Saturação por bases (V)	%	35,11
Matéria orgânica	g kg^{-1}	0,40
Areia	%	18
Silte	%	15
Argila	%	67
Atividade da fosfatase ácida	$\mu\text{g } \rho\text{-nitrofenol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	68,55
Carbono da biomassa microbiana	$\mu\text{g C g}^{-1}$	52,39

Fonte: Do autor (2019)

Nota: pH = água ; P-Mehlich, K, Fe, Zn, Mn e Cu = Extrator Mehlich-1; P-Resina = extrator Resina; Ca^{2+} , Mg^{2+} e Al^{3+} = Extrator KCl (1 mol L^{-1}); S.SO₄ = Extrator fosfato monocálcico em ácido acético; (H+Al) = Extrator SMP; Matéria orgânica: oxidação com $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \text{ 4N} + \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ 10N}$; B = Extrator água quente.

2.2 Identificação de genes da família Purple Acid Phosphatases (PAP)

Um arquivo constituído por sequências de aminoácidos de proteínas da família PAP em *Arabidopsis thaliana* (29 sequências, LI et al., 2002), *Glycine max* (35 sequências, LI et al., 2012) e *Oryza sativa* (26 sequências, ZHANG et al., 2011) foi utilizado como *query* para análise *blastp* contra o proteoma de *Coffea canephora* (DENOEUDE et al., 2014), com filtro de *e-value* de 0,00001. Utilizou-se o proteoma da espécie *Coffea canephora* pelo fato deste já

estar completamente sequenciado e o da espécie *Coffea arabica* não. Apenas sequências únicas foram mantidas no arquivo de saída e estas foram analisadas quanto aos domínios conservados comumente presentes em proteínas PAP (como cl26054 e cl13995), a partir do software *NCBI Conserved Domain Search* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

Para a seleção das proteínas em cafeeiro pertencentes à família PAP, as sequências resultantes das análises anteriores foram analisadas quanto à presença de padrões específicos para esta família (TIAN; LIAO, 2015): **DXG**, **GNH(D/E)**, **GDXXY**, **VXXH** e **GHHH**.

As proteínas selecionadas em cafeeiro foram então alinhadas via algoritmo *ClustalW* (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) e analisadas filogeneticamente em associação com as proteínas de *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max* e *Oryza sativa*, via método *Neighbor joining* (SAITOU e NEI, 1987) com modelo de substituição *p-distance* (NEI; KUMAR, 2000) e 1.000 replicatas *bootstrap*, via software MEGA 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

2.2.1 Extração e tratamento do RNA

A extração de RNA foi realizada a partir da utilização do *Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen)*, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Ao final da extração, o RNA obtido para cada amostra foi submetido ao tratamento com *DNAse* (Kit *Turbo DNA-free, Ambion Biosciences*) para degradação do DNA excedente, de acordo com a metodologia do fabricante.

O RNA purificado de cada amostra foi então avaliado quanto à integridade, à qualidade e à quantidade via eletroforese em gel de agarose e análise espectrofotométrica em equipamento *Nanovue™ (GE-Healthcare Life Sciences)*. A eletroforese foi executada com 1 μL de RNA total em gel de agarose 1% a 100V por 40 minutos e apenas as amostras com bandas de RNA ribossomal nítidas, separadas e proporcionais foram consideradas íntegras (IMAGEM 1, APÊNDICE B). Na análise espectrofotométrica, foram selecionadas amostras com quantidade superior a 300 $\eta\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, com nível de pureza adequado às exigências da técnica RT-qPCR, avaliado mediante análise das relações com proteínas totais, compostos fenólicos e sais via absorvância nos comprimentos de onda 280 e 230 ηm . As amostras que apresentaram valores próximos à faixa de 1,8 a 2,2 para as relações desses comprimentos de onda com o comprimento 260 ηm (referente ao RNA) foram consideradas de qualidade.

2.2.2 PCR Housekeeping e conversão de RNA em cDNA (RT-PCR)

As amostras de RNA purificadas foram submetidas a uma PCR com primers para amplificação de gene endógeno (24S, TABELA 2) (PCR Housekeeping) a fim de verificar a ausência de DNA remanescente. Foi utilizado DNA genômico de *Coffea arabica* como controle positivo e a PCR foi realizada com as seguintes especificações de ciclagem: 95°C por 2 minutos, 95°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos e 72°C por 20 segundos (repetidos 35 vezes); 72°C por 5 minutos e temperatura de espera de 12°C. O resultado foi avaliado via eletroforese em gel de agarose 2%, efetuada a 100V por 40 minutos, apenas amostras que não foram detectadas no gel foram consideradas aptas para a continuidade dos procedimentos (IMAGEM 2, APÊNDICE B).

Cada amostra de RNA foi convertida em cDNA via PCR com transcriptase reverse, utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) de acordo com as especificações do fabricante (IMAGEM 3, APÊNDICE B).

Tabela 2 - Descrição das sequências para cada par de primers utilizados nas análises de RT-qPCR.

Gene	Identificação do primer	Sequência dos primers
CarPAP1	FWD-PAP1	5' TTCAAATGGAGGTGTGACGA 3'
	REV-PAP1	5' CAGCAGGTGGAGGAAATAGG 3'
CarPAP3	FWD-PAP3	5' GCGTGACAAGGACGAGATTT 3'
	REV-PAP3	5' ATCGACCCTCACAAAACCTGC 3'
CarPAP11	FWD-PAP11	5' GCATTGGCTCTGGTCTTTG 3'
	REV-PAP11	5' CAAAGAGGGACTTTCGAGCA 3'
CarPAP12	FWD-PAP12	5' GAACCAGTAAGCGGAGGAGA 3'
	REV-PAP12	5' TACAGCCGCTCGCTAAGTG 3'
CarPAP18	FWD-PAP18	5' GCTCTGCTGGAACGACAAG 3'
	REV-PAP18	5' GGGGAACCTCTGAAGACATCACT 3'
24s	FWD-24S	5' GACCAATCGTCTTCTTTCCAGAAA 3'
	REV-24S	5' TCAACTCAGCCTTGGAACATTAG 3'
RPL39	FWD-RPL39	5' GCGAAGAAGCAGAGGCAGAA 3'
	REV-RPL39	5' TTGGCATTGTAGCGGATGGT 3'
GAPDH	FWD-GAPDH	5' GGGAAGAGCTGCTTCATTTAACA 3'
	REV-GAPDH	5' CCATTGAGGGCTGGAAGAAC 3'

Fonte: Do autor (2019).

2.2.3 Desenho e análise da eficiência de primers e qPCR

Os primers foram desenhados com auxílio do software *OligoAnalyser* (ThermoFisher), respeitando os parâmetros adequados para a utilização na técnica de qPCR: tamanho de 18 a 22 pares de base (pb), 40 a 60% de conteúdo de citosina e guanina (CG), temperatura de *melting* próxima a 60°C, tamanho de produto amplificado de 80 a 120 pb e baixa possibilidade de formação de dímeros e estruturas secundárias. No total foram desenhados oito primers para utilização no experimento, três para genes endógenos e cinco para genes de interesse (TABELA 2). A adaptação dos primers para a amplificação dos genes de ambos os subgenomas de *Coffea arabica* foi efetuada mediante obtenção dos homeólogos correspondentes aos genes abordados neste trabalho no banco de dados *Phytozome* (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Carabica_er), via ferramenta *blastn* e alinhamentos múltiplos, utilizando o algoritmo *ClustalW* (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994).

A análise da eficiência de amplificação dos primers foi realizada mediante software *LinReg* (RUIJTER et al., 2009; TUOMI et al., 2010) de forma individual para cada primer, em cada amostra do experimento. Para a análise de especificidade de cada par de primer, foi observado o comportamento da curva de *melting* no total das amostras e apenas os pares de primers com produto único foram considerados específicos.

A análise da expressão dos genes via qPCR foi executada em equipamento *ABI 7500 FAST* (Applied Biosystems), com utilização do reagente *Gotaq qPCR Master Mix* (Promega). As especificações de estequiometria e ciclagem foram adotadas a partir das recomendações do fabricante, o experimento foi executado em triplicata biológica e os dados resultantes tratados via método de Pfaffl (PFAFFL et al., 2004).

2.3 Análises estatísticas

Os dados obtidos no experimento foram submetidos à análise de variância (teste F). As médias foram comparadas pelo teste de agrupamento de Scott-Knott, ao nível de significância de 5%. O software estatístico utilizado foi o GENES (CRUZ, 2013).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram identificados 29 genes da família PAP no genoma de *Coffea canephora* (TABELA 3). Para efeito comparativo, o número de isoenzimas de PAP foi estimado em 29 em *Arabidopsis* (LI et al., 2002), 26 em arroz (ZHANG et al., 2011), 35 em soja (LI et al., 2012), 33 em milho (GONZALEZ-MUNOZ et al., 2015), 25 em grão-de-bico (BHADOURIA et al., 2017) e 25 em pinhão-manso (VENKIDASAMY; SELVARAJ; RAMALINGAM, 2019). Também, Xie e Shang (2018) estimam o número de PAPs em algumas espécies vegetais, quais sejam, 44 em *Brassica oleracea*, 37 em *Brassica rapa*, 18 em *Cucumis sativus*, 15 em *Cucumis melo*, 16 em *Citrullus lanatus*, 27 em *Solanum lycopersicum*, 28 em *Solanum pennellii*, 22 em *Solanum tuberosum*, 19 em *Solanum melongena* e 22 em *Capsicum annuum*.

Tabela 3 - Relação dos genes da família PAP no genoma de *Coffea canephora*.

(Continua)

Código Coffee Genome Hub	Anotação	Posição no genoma	TG (nt)	NE	TP (aa)
Cc00_g07780	CcPAP1	chr0:63352692..63358978	6287	8	468
Cc00_g33340	CcPAP2	chr0:194895365..194896699	1938	2	271
Cc02_g17140	CcPAP3	chr2:15786699..15789323	3148	8	471
Cc02_g29480	CcPAP4	chr2:30825788..30829969	4182	6	267
Cc02_g29510	CcPAP5	chr2:30881299..30892365	11335	13	645
Cc03_g07240	CcPAP6	chr3:6502762..6505842	3805	7	493
Cc03_g07920	CcPAP7	chr3:7464215..7469516	5681	8	542
Cc04_g09270	CcPAP8	chr4:7728638..7730426	1995	7	332
Cc05_g13780	CcPAP9	chr5:27257151..27260337	3592	5	440
Cc06_g05610	CcPAP10	chr6:4506937..4509169	2300	5	439
Cc06_g05620	CcPAP11	chr6:4515612..4518271	2969	4	432
Cc06_g07850	CcPAP12	chr6:6247774..6252934	6465	9	478
Cc06_g17480	CcPAP13	chr6:17468591..17474451	7192	4	410
Cc06_g18310	CcPAP14	chr6:18566604..18571791	5400	5	392
Cc06_g20820	CcPAP15	chr6:25707705..25710211	2632	5	364
Cc06_g20830	CcPAP16	chr6:25710298..25716098	5915	7	265
Cc08_g16870	CcPAP17	chr8:31282144..31287954	6351	12	617
Cc10_g02260	CcPAP18	chr10:1713861..1716980	4187	8	426
Cc11_g02390	CcPAP19	chr11:7595076..7599866	6212	4	376
Cc11_g05810	CcPAP20	chr11:21432170..21436831	4993	7	331
Cc11_g05820	CcPAP21	chr11:21442638..21449181	6835	7	331
Cc11_g05830	CcPAP22	chr11:21455190..21459018	3829	9	387
Cc11_g11960	CcPAP23	chr11:29152620..29157975	5356	12	645
Cc11_g12000	CcPAP24	chr11:29180929..29186028	5836	12	611

Tabela 3 - Relação dos genes da família PAP no genoma de *Coffea canephora*.

(Conclusão)

Código Coffee Genome Hub	Anotação	Posição no genoma	TG (nt)	NE	TP (aa)
Cc11_g12010	CcPAP25	chr11:29187683..29193282	6130	12	613
Cc11_g12020	CcPAP26	chr11:29194409..29198730	5019	12	611
Cc11_g12240	CcPAP27	chr11:29363693..29366574	4099	2	494
Cc11_g12250	CcPAP28	chr11:29369432..29370043	853	1	203
Cc11_g12260	CcPAP29	chr11:29370109..29371299	1799	3	231

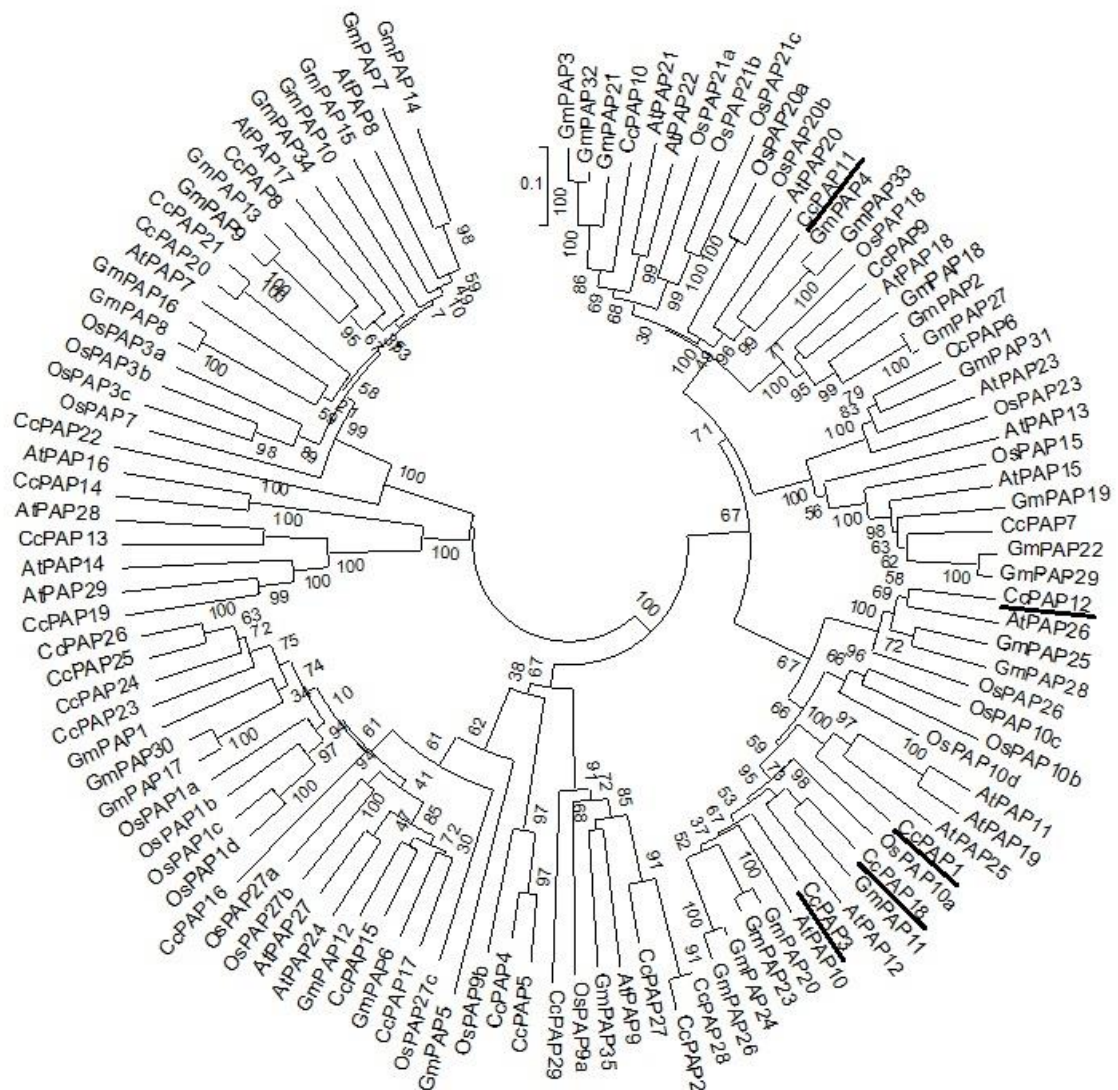
Fonte: Do autor (2019).

Legenda: TG: tamanho do gene (número de nucleotídeos); NE: número de éxons; TP: tamanho da proteína (número de aminoácidos);

Analisando a árvore filogenética (FIGURA 1), observa-se que três PAPs analisadas (CcPAP1, CcPAP3 e CcPAP18) estão muito próximas entre si, demonstrando semelhança em nível de sequência proteica. Também, CcPAP3 e CcPAP18 estão muito próximos à AtPAP10 e à AtPAP12, demonstrando similaridade proteica, o que pode estar associado a funções similares. Estudos em outras espécies vegetais corroboram os resultados encontrados nesse trabalho, como em *Arabidopsis* e em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), em que padrões de expressão em resposta à privação de P foram analisados para vários genes PAP, incluindo *PvPAP3*, *AtPAP10*, *AtPAP12*, *AtPAP17*, *AtPAP25* e *AtPAP26*. A expressão transcricional de *PvPAP3*, *AtPAP10*, *AtPAP12*, *AtPAP17* e *AtPAP25* foi significativamente aumentada após a privação nutricional de Pi (DEL POZO et al., 1999; DEL VECCHIO et al., 2014; LIANG et al., 2010; ROBINSON et al., 2012; WANG et al., 2011). Além disso, houve uma tendência de aumento da expressão gênica dos genes *CarPAP3*, *CarPAP11* e *CarPAP18* (FIGURA 2) na ausência de suprimento de P na cultivar MGS Paraíso 2, com destaque para o gene *CarPAP18*. Também, os genes CcPAP12 e AtPAP26 estão muito próximos na árvore filogenética, demonstrando também grande similaridade proteica e provavelmente de funções. Um fato interessante observado foi que, para o gene *CarPAP12*, praticamente não houve diferença na expressão para a cultivar MGS Paraíso 2 com e sem privação de P (FIGURA 2), uma vez que isso vai de encontro ao observado em *Arabidopsis* por Tran et al. (2010) e Veljanovski et al. (2006), em que os transcritos de *AtPAP26* exibiram pouca ou nenhuma resposta à privação de Pi, apesar de um aumento significativo do acúmulo de polipeptídeos e atividade de *AtPAP26*, o que sugere fortemente o controle pós-transcricional da expressão de *AtPAP26* em *Arabidopsis*. Alguns estudos corroboram esses resultados, uma vez que tão logo mais genes PAP tenham sido isolados de plantas, os padrões de expressão desses genes em resposta à privação de Pi tem sido amplamente analisados. Como exemplo, os padrões de

expressão de três *PAPs* de batata (*Solanum tuberosum*) foram examinados sob condições de alto e baixo P, com o resultado de que a transcrição de *StPAP2* e *StPAP3* aumentaram significativamente no tratamento de privação de Pi, enquanto a transcrição de *StPAP1* não foi afetada (ZIMMERMANN et al., 2004). Da mesma forma, quatro de cinco *PvPAPs* no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) e seis de sete *BnPAPs* na colza (*Brassica napus*) têm sido observadas como significativamente super expressadas pela deficiência de P (LIANG et al., 2012; LU et al., 2008).

Figura 1 - Árvore filogenética de genes de fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) de quatro espécies vegetais: soja (*Glycine max*), arroz (*Oryza sativa*), arabdopsis (*Arabidopsis thaliana*) e cafeeiro robusta (*Coffea canephora*). Em destaque (sublinhado) são as cinco PAP's selecionadas para estudos funcionais *in vivo*.



Fonte: Do autor (2019).

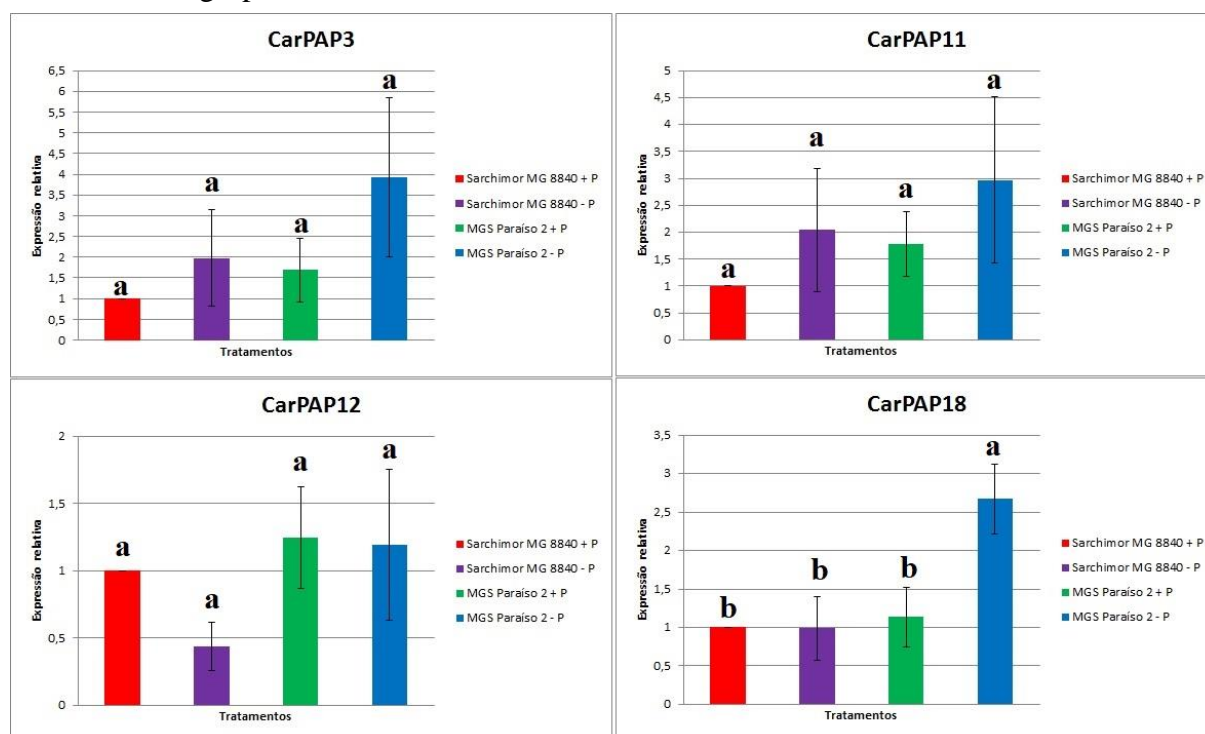
A partir desses resultados e de análises de similaridade com proteínas de outras espécies conhecidamente associadas à resposta ao déficit de fosfato (relações essas que podem ser visualizadas na árvore filogenética), foram escolhidos cinco genes para análises de expressão gênica *in vivo*. Utilizou-se de cinco genes *PAPs* em cafeeiro arábica (*CarPAP1*, *CarPAP3*, *CarPAP11*, *CarPAP12* e *CarPAP18*) para serem avaliados.

Como forma de verificar se a produção de fosfatase ácida foi realmente maior, avaliaram-se alguns genes possivelmente responsáveis pela codificação dessa classe de proteínas (FIGURA 2). Dentre os cinco genes analisados, somente o gene *CarPAP1* não foi expressado nas raízes das plantas analisadas, o que pode sugerir que a fosfatase codificada por esse gene não é exsudada externamente na região da rizosfera, é responsável provavelmente pela redistribuição interna de P dentro das células da planta. Acredita-se que as *PAPs* desempenham um papel importante no metabolismo do P em plantas através da hidrólise dos componentes orgânicos intra e extracelulares, especialmente sob condições de baixa disponibilidade de P (DUFF; SARATH; PLAXTON, 1994; TRAN; HURLEY; PLAXTON, 2010). Alguns estudos têm sugerido que as *PAPs* secretadas ou associadas à parede celular captam o Pi de compostos orgânicos localizados na rizosfera, ou podem reciclar Pi de fosfomonoésteres endógenos que extravasaram do citoplasma através da membrana plasmática (HURLEY et al., 2010; ROBINSON et al., 2012; SHANE et al., 2014; TRAN et al., 2010; VELJANOVSKI et al., 2006). Acredita-se que o aumento da recuperação e reciclagem de P por meio do aumento das atividades de fosfatases ácidas são respostas adaptativas de plantas comuns à privação de Pi (DUFF; SARATH; PLAXTON, 1994; LIANG et al., 2014; LIANG; TIAN; LIAO, 2013; TRAN; HURLEY; PLAXTON, 2010).

De forma geral, a tendência no comportamento apresentado foi de que para a cultivar MGS Paraíso 2 na ausência de adubação fosfatada a expressão gênica foi maior em três dos cinco genes analisados (*CarPAP3*, *CarPAP11* e *CarPAP18*), apresentando destaque no gene *CarPAP18*, no qual essa diferença foi altamente significativa (FIGURA 2). Isso corrobora os dados apresentados na Figura 3, evidenciando o fato da cultivar MGS Paraíso 2, na privação de P, ser mais eficiente na produção de fosfatase ácida. Outros estudos reforçam esses resultados, dentre eles os encontrados por Robinson et al. (2012), qual seja, em *Arabidopsis* com o silenciamento do AtPAP12 ou AtPAP26 resultou em mais de 70% de redução nas atividades de fosfatase ácida secretadas pelas raízes e da parede celular da parte aérea durante a privação de P, demonstrando que AtPAP12 e AtPAP26 são responsáveis pela maioria das atividades da fosfatase ácida secretadas de *Arabidopsis* sob condições de privação de Pi. Outra isoenzima *PAP* secretada que é expressada pela privação de P em *Arabidopsis* foi

identificada por meio do rastreamento das atividades de fosfatase ácida da superfície da raiz de plantas mutagenizadas com etil-metano-sulfonato (EMS) (WANG et al., 2011). O mutante *nop1-1* não exibiu nenhuma atividade de fosfatase ácida na superfície da raiz sob condições de baixa disponibilidade de P quando se utilizou 5-Br-4-Cl-3-indoilo-fosfato como substrato. Por meio de clonagem baseada em mapas e experimentos complementares, o gene responsável pelo fenótipo *nop1-1* foi clonado e identificado como *AtPAP10*, sugerindo que a *AtPAP10* também é secretada em resposta à deficiência de P em *Arabidopsis* (WANG et al., 2011).

Figura 2 - Expressão relativa de quatro genes da família das fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) em cafeeiros arábica relacionados ao déficit de fósforo. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de agrupamento de Scott-Knott.

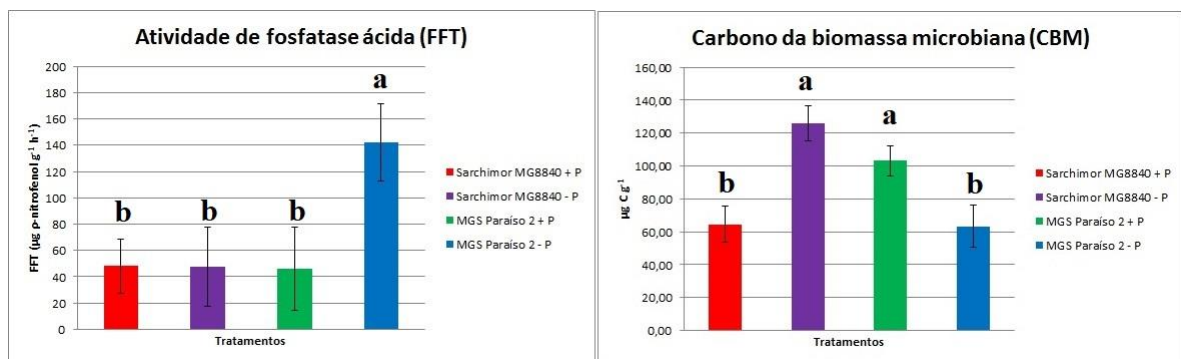


Fonte: Do autor (2019).

Na Figura 3, estão apresentados os resultados da atividade de fosfatase ácida e do carbono da biomassa microbiana de duas cultivares de cafeeiro com e sem adubação fosfatada (TABELA 3, CAPÍTULO 2). Para a cultivar MGS Paraíso 2 na ausência de adubação fosfatada ($142,34 \pm 29,95 \mu\text{g } \rho\text{-nitrofenol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), a atividade de fosfatase ácida foi bem maior quando comparada aos outros tratamentos. Os microrganismos e as plantas são responsáveis pela produção da maioria das fosfatases ácidas encontradas no solo, e sua atividade fundamental ocorre no ciclo do fósforo e na liberação desse nutriente para as plantas

(TARAFDAR, 1995). De acordo com Dick e Tabatabai (1993), os microrganismos seriam as fontes mais expressivas de fosfatases no solo, por causa da sua grande biomassa, alta atividade metabólica e curto tempo de vida, com várias gerações, permitindo assim, a produção e a liberação de quantidades elevadas de enzimas extracelulares, quando comparado com as plantas. Tarafdar e Jungk (1987) mostraram que o aumento da atividade das fosfatases ácidas corresponde ao aumento da comunidade de fungos e bactérias na rizosfera de várias plantas. No caso da cultivar MGS Paraíso 2, houve um aumento significativo no carbono da biomassa microbiana onde realizou-se o fornecimento de P via adubação, resultado oposto ao observado em relação à fosfatase ácida, que foi significativamente maior onde não houve fornecimento de P via adubação, evidenciando que a atividade da fosfatase ácida observada foi devido a atividade da própria planta e não devido à microbiota do solo. Assim, a explicação para a maior atividade da fosfatase ácida onde não houve adubação fosfatada se deve à capacidade de a própria cultivar MGS Paraíso 2 em produzir e exsudar fosfatase ácida na sua rizosfera. As fosfatases podem ser constitutivas ou repressíveis por fosfato. As fosfatases constitutivas são sintetizadas independentemente da composição do meio em que atuam, são as repressíveis sintetizadas apenas na presença de concentrações limitantes de fosfato (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004). À medida que se diminui o suprimento de P para as plantas, ocorre um aumento da atividade dessas enzimas (BIELESKI; FERGUNSON, 1983). Alguns trabalhos têm relatado a relação entre deficiência de P e atividade de fosfatases (ASCENCIO, 1994; FERNANDES et al., 1998; FERNANDEZ; ASCENCIO, 1994; SILVA; BASSO, 1993).

Figura 3 - Atividade de fosfatase ácida (FFT) e carbono da biomassa microbiana (CBM) de cultivares de cafeeiros arábica relacionados ao déficit de fósforo. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de agrupamento de Scott-Knott.



Fonte: Do autor (2019).

Estudos como esse são essenciais para auxiliar na obtenção de cultivos mais produtivos e mais sustentáveis. No caso do gênero *Coffea*, esse estudo de identificação de genes responsáveis pela produção de fosfatases ácidas é pioneiro, uma vez que na cultivar MGS Paraíso 2, alguns desses genes são mais ativos na privação de P (como *CarPAP18*) e outros parecem ser indiferentes à questão do P (como *CarPAP12*), o que mostra haver variabilidade nessa questão. Também os resultados apresentados servem para reafirmar a necessidade da busca por plantas mais adaptadas às mais diversas condições de cultivo.

Os programas de melhoramento genético de plantas necessitam de variabilidade genética, objetivando alcançar plantas mais produtivas, resistentes a pragas e doenças (visando o uso cada vez menor de produtos químicos para o seu controle) e, atualmente, almejam-se cultivos que gerem o menor impacto ao meio ambiente, uma vez que plantas mais eficientes na aquisição de nutrientes minimizam a necessidade por fertilizantes. De acordo com Tian e Liao (2015), quaisquer ganhos na nutrição da cultura em P que possam surgir da bem-sucedida super expressão de PAPs secretadas ou intracelulares poderiam ser perdidos se as culturas fossem cultivadas em solos ricos em fósforo inorgânico (Pi). Portanto, deve-se ter em mente que, em qualquer estratégia biotecnológica usada para manipular cultivos eficientes em P, uma super expressão estável de proteínas PAP pode ser aumentada pela expressão modificada da protease e/ou pelo arranjo de proteínas PAP resistentes à protease. Com este trabalho verificou-se que a cultivar MGS Paraíso 2 é eficiente na produção de fosfatase ácida, uma ferramenta importante para a planta obter esse nutriente do solo, servindo também como fonte de variabilidade genética na obtenção de novas cultivares a partir de hibridações.

A cultivar MGS Paraíso 2 tem sido bastante aceita e cultivada por boa parte dos produtores de café do Brasil, sobremaneira os cafeicultores da região do Cerrado Mineiro, caracterizando-se essa cultivar por ser altamente vigorosa, produtiva e com boa adaptabilidade e estabilidade nas diferentes microrregiões onde é cultivada, além de apresentar uma predisposição a qualidade de bebida. Boa parte da área destinada ao cultivo de café no Brasil caracteriza-se por apresentar solos ácidos e com baixa fertilidade natural, onde sucessivos aportes de fertilizantes são requeridos para a obtenção de altas produtividades. A cultivar MGS Paraíso 2, por meio dessa ferramenta (maior produção de fosfatase ácida), pode ser usada visando-se utilizar menos fertilizantes fosfatados.

Outra possível abordagem que este estudo corrobora é o fato de que as informações sobre os genes relacionados às fosfatases ácidas podem ser usadas futuramente como um marcador molecular em programas de melhoramento genético e também na identificação de cultivares, principalmente no que se refere a questões de uso e de propriedade intelectual,

assim como já é utilizado em outras espécies, como são os casos do milho e da soja. Hoje em dia, no Brasil, as novas cultivares de cafeeiro são registradas no Registro Nacional de Cultivares (RNC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), com base somente em descritores morfológicos e agronômicos, onde caracteres moleculares irão auxiliar na evolução dessa questão. Num futuro bem próximo, um grande número de cultivares de *Coffea arabica* serão propagadas por clonagem via embriogênese somática ou estaquia, visando à exploração do vigor híbrido da geração F₁ e do menor tempo de obtenção da nova cultivar, quando comparada com o melhoramento convencional, uma vez que a proteção de cultivares é muito importante para os órgãos que fazem o melhoramento do cafeeiro, como forma de obter *royalties* para a manutenção do próprio programa de melhoramento.

4 CONCLUSÕES

- a) Identificou-se 29 genes da família PAP no genoma de *Coffea canephora*;
- b) Na cultivar MGS Paraíso 2 algumas PAPs foram mais expressadas sob privação de P (*CarPAP3*, *CarPAP11* e *CarPAP18*) e outras foram indiferentes à questão do P (*CarPAP12*);
- c) A expressão gênica de *CarPAP18* e a atividade de fosfatase ácida foi altamente significativa na cultivar MGS Paraíso 2 sob privação de P.

REFERÊNCIAS

- AOYAMA, H. et al. Proteínas tirosinas fosfatases: propriedades e funções biológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 896-900, nov./dez. 2003.
- ASCENCIO, J. Acid phosphatase as a diagnostic tool. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 25, n. 9/10, p. 1553-1564, June 1994.
- BHADOURIA, J. et al. Identification of purple acid phosphatases in chickpea and potential roles of CaPAP7 in seed phytate accumulation. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 11012, p. 1-12, Aug. 2017.
- BIELESKI, R. L.; FERGUNSON, J. B. Physiology and metabolism of phosphate and its compounds. In: PIRSON, A.; ZIMMERMANN, M. H. (Ed.). **Encyclopedia of plant physiology: inorganic plant nutrition**. Berlin: Springer Verlag, 1983. p. 422-4490.
- BOZZO, G. G.; RAGHOTHAMA, K. G.; PLAXTON, W. C. Structural and kinetic properties of a novel purple acid phosphatase from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures. **The Biochemical Journal**, London, v. 377, n. 2, p. 419-428, Jan. 2004.
- CHIOU, T. J.; LIN, S. I. Signaling network in sensing phosphate availability in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 62, p. 185-206, 2011.
- CRUZ, C. D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 35, n. 3, p. 271-276, jul./set. 2013.
- DEL POZO, J. C. et al. A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilising/oxidative stress conditions. **The Plant Journal**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 579-589, Sept. 1999.
- DEL VECCHIO, H. A. et al. The cell-wall targeted purple acid phosphatase AtPAP25 is critical for acclimation of *Arabidopsis thaliana* to nutritional phosphorus-deprivation. **The Plant Journal**, Oxford, v. 80, n. 4, p. 569-581, Nov. 2014.
- DENOEUDE, F. et al. The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. **Science**, London, v. 345, n. 6201, p. 1181-1184, Sept. 2014.
- DICK, W. A.; TABATABAI, M. A. Significance and potential uses of soil enzymes. In: METTING JUNIOR, F. B. (Ed.). **Soil microbial ecology applications in agricultural and environmental management**. New York: M. Dekker, 1993. p. 95-127.
- DUFF, S. M. G.; SARATH, G.; PLAXTON, W. C. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 90, n. 4, p. 791-800, Apr. 1994.
- EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa-SPI, 2006. 306 p.

- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004. 510 p.
- FERNANDES, L. A. et al. Fósforo e atividade da fosfatase ácida em plantas de feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 5, p. 769-778, maio 1998.
- FERNANDEZ, D. S.; ASCENCIO, J. Acid phosphatase activity in bean and cowpea plants grown under phosphorus stress. **Journal of Plant Nutrition**, Alexandria, v. 17, n. 2/3, p. 229-241, Nov. 1994.
- GEORGE, T. S.; RICHARDSON, A. E. Potential and limitations to improving crops for enhanced phosphorus utilization. In: HAMMOND, J. P.; WHITE, P. J. (Ed.). **The ecophysiology of plant-phosphorus interactions**. Dordrecht: Springer, 2008. p. 247–270.
- GONZALEZ-MUNOZ, E. et al. The maize (*Zea mays* ssp. *mays* var. B73) genome encodes 33 members of the purple acid phosphatase family. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, p. 341, May 2015.
- GUIMARÃES, L. H. S. et al. Characterization and properties of acid phosphatases with phytase activity produced by *Aspergillus caespitosus*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, San Diego, v. 40, n. 2, p. 201-207, Oct. 2004.
- HUR, Y. J. et al. Molecular characterization of OsPAP2: transgenic expression of a purple acid phosphatase up-regulated in phosphate-deprived rice suspension cells. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 32, n. 1, p. 163–170, Jan. 2010.
- HURLEY, B. A. et al. The dual-targeted purple acid phosphatase isozyme AtPAP26 is essential for efficient acclimation of *Arabidopsis* to nutritional phosphate deprivation. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 153, n. 3, p. 1112–1122, July 2010.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, July 2016.
- LI, C. et al. Identification of soybean purple acid phosphatase genes and their expression responses to phosphorus availability and symbiosis. **Annals Botany**, Oxford, v. 109, n. 1, p. 275–285, Jan. 2012.
- LI, D. et al. Purple acid phosphatases of *Arabidopsis thaliana*. Comparative analysis and differential regulation by phosphate deprivation. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 31, p. 27772–27781, Aug. 2002.
- LIANG, C. et al. Biochemical and molecular characterization of PvPAP3, a novel purple acid phosphatase isolated from common bean enhancing extracellular ATP utilization. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 152, n. 2, p. 854–865, Feb. 2010.
- _____. Comparative Analysis of PvPAP gene family and their functions in response to phosphorus deficiency in common bean. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. e38106, 2012.

_____. Control of phosphate homeostasis through gene regulation in crops. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 21, p. 59–66, Oct. 2014.

LIANG, C.; TIAN, J.; LIAO, H. Proteomics dissection of plant responses to mineral nutrient deficiency. **Proteomics**, Weinheim, v. 13, n. 3/4, p. 624–636, Feb. 2013.

LU, K. et al. Cloning and characterization of phosphorus starvation inducible *Brassica napus* purple acid phosphatase 12 gene family, and imprinting of a recently evolved MITE-minisatellite twin structure. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 117, n. 6, p. 963–975, Oct. 2008.

MARSCHNER, H.; RIMMINGTON, G. Mineral nutrition of higher plants. **Plant Cell & Environment**, Oxford, v. 11, p. 147–148, 1988.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics**. Oxford: Oxford University Press, 2000. 333 p.

NOVAIS, R. F.; NEVES, J. C. L.; BARROS, N. F. Ensaio em ambiente controlado. In: OLIVEIRA, A. J. et al. (Coord.). **Métodos de pesquisa em fertilidade do solo**. Brasília: Embrapa-SEA, 1991. p. 189-253. (Documentos, 3).

OLCZAK, M.; MORAWIECKA, B.; WATOREK, W. Plant purple acid phosphatases-genes, structures and biological function. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 50, n. 4, p. 1245–1256, 2003.

PFAFFL, 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**, Kew, v. 26, n. 6, p. 509–515, Mar. 2004.

ROBINSON, W. D. et al. The secreted purple acid phosphatase isozymes AtPAP12 and AtPAP26 play a pivotal role in extracellular phosphate-scavenging by *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 18, p. 6531–6542, 2012.

RÖSSNER, H. et al. Indirect estimation of microbial biomass. In: SCHINNER, F. et al. (Ed.). **Methods in soil biology**. Heidelberg: Springer Verlag, 1996. p. 47-75.

RUIJTER, J. M. et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**, London, v. 37, n. 6, p. e45, Apr. 2009.

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

SANYAL, S. K.; DATTA, S. K. Chemistry of phosphorus transformation in soil. In: STEWART, B. A. (Ed.). **Advances in Soil Science**. New York: Springer Verlag, 1991. p. 1-120.

SCHENK, G. et al. Binuclear metal centers in plant purple acid phosphatases: Fe–Mn in sweet potato and Fe–Zn in soybean. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 370, n. 2, p. 183–189, Oct. 1999.

_____. Identification of mammalian-like purple acid phosphatases in a wide range of plants. **Gene**, Amsterdam, v. 250, n. 1/2, p. 117–125, May 2000.

SHANE, M. W. et al. Senescence-inducible cell-wall and intracellular purple acid phosphatases: implications for phosphorus remobilization in *Hakea prostrata* (Proteaceae) and *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 20, p. 6097–6106, Nov. 2014.

SILVA, F. C.; BASSO, L. C. Avaliação da atividade in vivo da fosfatase ácida da folha na diagnose da nutrição fosfórica em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 371-375, set./dez. 1993.

TARAFDAR, J. C. Visual demonstration of in vivo acid phosphatases activity of VA mycorrhizal fungi. **Current Science**, Columbus, v. 69, n. 6, p. 541-543, Sept. 1995.

TARAFDAR, J. C.; JUNGK, A. Phosphatase in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 3, n. 4, p. 199–204, Dec. 1987.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, London, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, Nov. 1994.

TIAN, J.; LIAO, H. The role of intracellular and secreted purple acid phosphatases in plant phosphorus scavenging and recycling. In: PLAXTON, W. C.; LAMBERS, H. (Ed.). **Annual plant reviews: phosphorus metabolism in plants**. Hoboken: J. Wiley & Sons, 2015. v. 48, p. 265–288.

TRAN, H. T. et al. Biochemical and molecular characterization of AtPAP12 and AtPAP26: the predominant purple acid phosphatase isozymes secreted by phosphate-starved *Arabidopsis thaliana*. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 33, n. 11, p. 1789–1803, Nov. 2010.

TRAN, H. T.; HURLEY, B. A.; PLAXTON, W. C. Feeding hungry plants: the role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition. **Plant Science**, Limerick, v. 179, n. 1/2, p. 14–27, July/Aug. 2010.

TUOMI, J. M. et al. Bias in the C_q value observed with hydrolysis probe based quantitative PCR can be corrected with the estimated PCR efficiency value. **Methods**, San Diego, v. 50, n. 4, p. 313-322, Apr. 2010.

VANCE, C. P. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 127, n. 2, p. 390–397, Oct. 2001.

VELJANOVSKI, V. et al. Biochemical and molecular characterization of AtPAP26, a vacuolar purple acid phosphatase up-regulated in phosphate-deprived *Arabidopsis* suspension cells and seedlings. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 142, n. 3, p. 1282–1293, Nov. 2006.

VENKIDASAMY, B.; SELVARAJ, D.; RAMALINGAM, S. Genome-wide analysis of purple acid phosphatase (PAP) family proteins in *Jatropha curcas* L. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 123, p. 648-656, Feb. 2019.

WANG, L. et al. The *Arabidopsis* purple acid phosphatase AtPAP10 is predominantly associated with the root surface and plays an important role in plant tolerance to phosphate limitation. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 157, n. 3, p. 1283–1299, Nov. 2011.

WU, P. et al. Improvement of phosphorus efficiency in rice on the basis of understanding phosphate signaling and homeostasis. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 16, n. 2, p. 205–212, May 2013.

XIAO, K. et al. Improved phosphorus acquisition and biomass production in *Arabidopsis* by transgenic expression of a purple acid phosphatase gene from *M. truncatula*. **Plant Science**, Limerick, v. 170, n. 2, p. 191–202, Feb. 2006.

XIE, L.; SHANG, Q. Genome-wide analysis of purple acid phosphatase structure and expression in ten vegetable species. **BMC Genomics**, London, v. 19, n. 1, p. 646, Aug. 2018.

ZHANG, Q. et al. Identification of rice purple acid phosphatases related to phosphate starvation signaling. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 13, n. 1, p. 7–15, Jan. 2011.

ZIMMERMANN, P. et al. Differential expression of three purple acid phosphatases from potato. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 6, n. 5, p. 519–528, Sept. 2004.

APÊNDICE A - TABELAS

Tabela 1 - Resumo da análise de variância da expressão gênica relativa de fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) de cultivares de cafeeiro arábica relacionados ao déficit de fósforo.

FV	GL	QMs e significância do teste F			
		CarPAP3	CarPAP11	CarPAP12	CarPAP18
Tratamentos	3	4,73 ^{ns}	1,97 ^{ns}	0,41 ^{ns}	1,99*
Erro	8	2,09	1,52	0,18	0,19
Total	11				
CV (%)		67,37	63,31	44,11	30,57
Média		2,15	1,95	0,97	1,45

*: significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ns: não significativo.

Tabela 2 - Média da expressão gênica relativa de fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) de cultivares de cafeeiro arábica relacionados ao déficit de fósforo.

Tratamento	CarPAP3	CarPAP11	CarPAP12	CarPAP18
Sarchimor MG 8840 - P	1,97 a	2,04 a	0,43 a	0,98 b
Sarchimor MG 8840 + P	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 b
MGS Paraíso 2 - P	3,92 a	2,96 a	1,19 a	2,66 a
MGS Paraíso 2 + P	1,69 a	1,77 a	1,24 a	1,13 b

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de agrupamento de Scott-Knott.

APÊNDICE B – IMAGENS

Imagem 1 - Perfis das amostras de RNA submetidas à eletroforese em gel de agarose. Números representam os vasos a partir dos quais as amostras foram obtidas. As duas bandas inferiores correspondentes às unidades de RNA ribossomal nítidas, separadas e proporcionais, indicando a integridade do material genético.

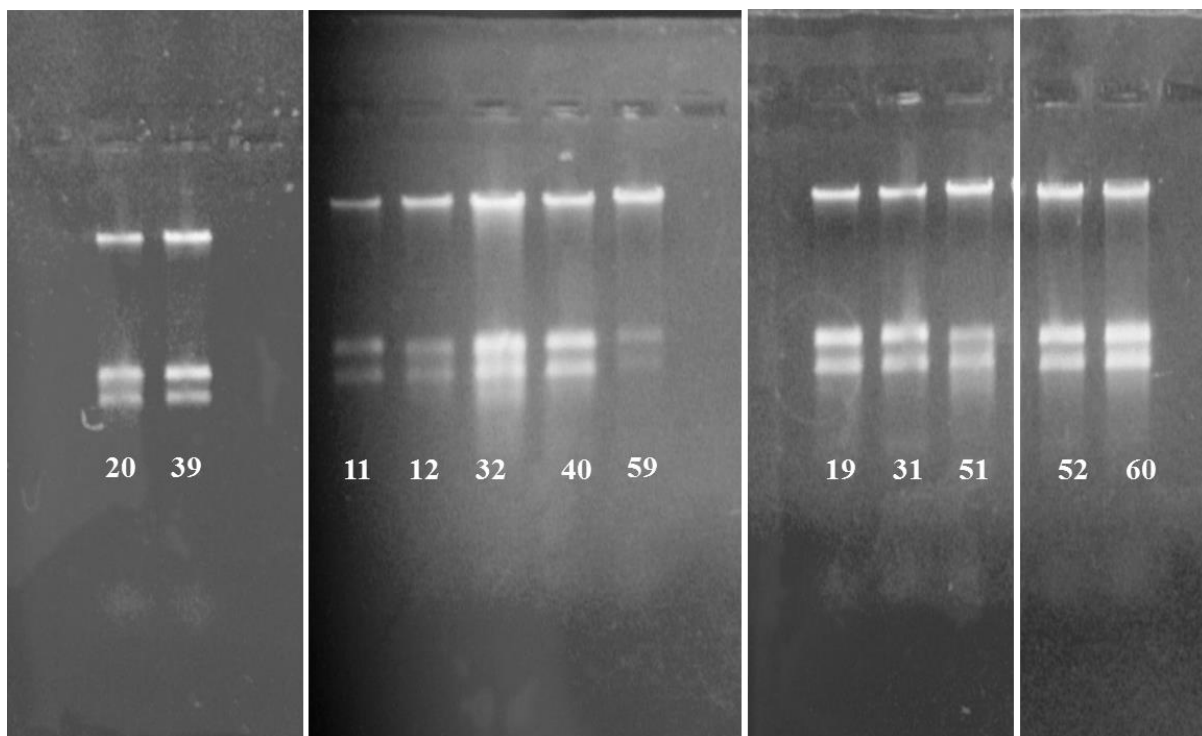


Imagem 2 - Géis de eletroforese com produto da PCR Housekeeping. C- - controle negativo; C+ - controle positivo; números representam os vasos a partir dos quais as amostras foram obtidas.

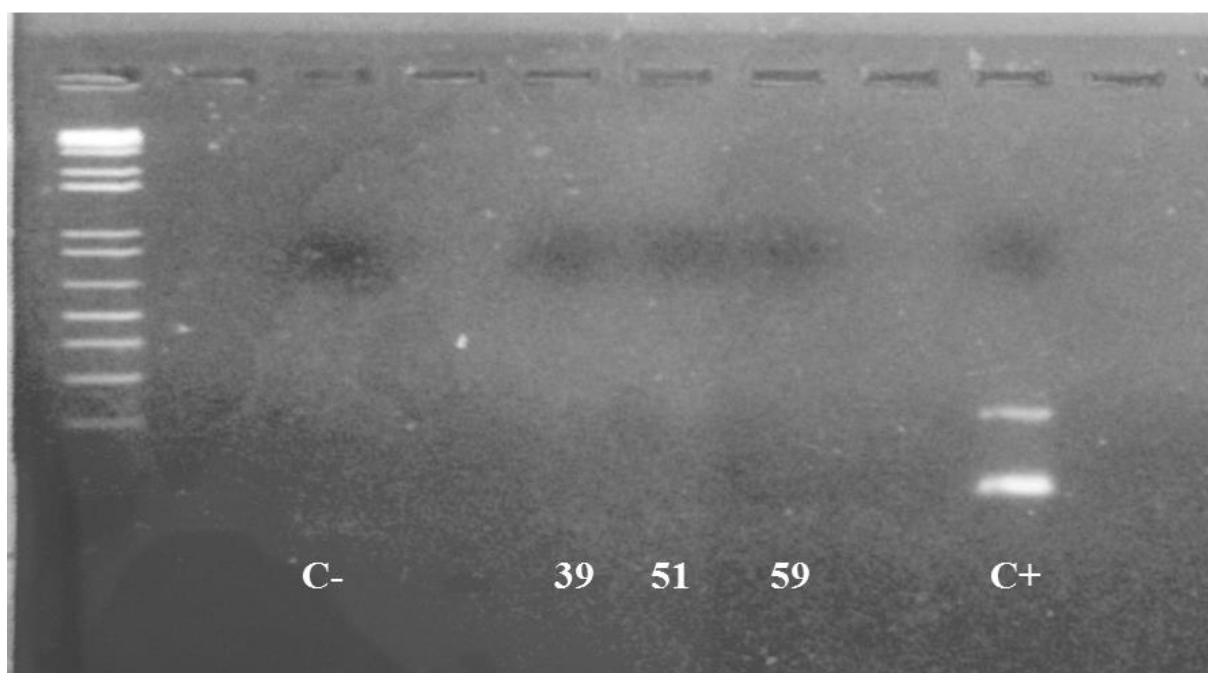
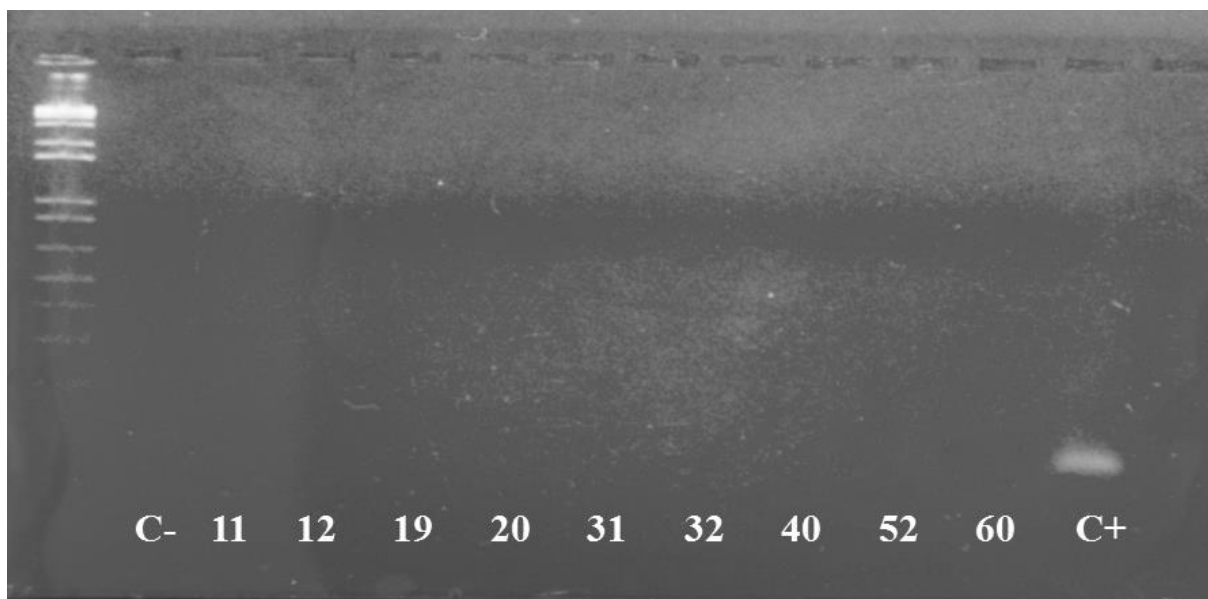


Imagem 3 - Géis de eletroforese com produto da PCR para confirmação da conversão do RNA em cDNA. C- - controle negativo; C+ - controle positivo; números representam os vasos a partir dos quais as amostras foram obtidas.

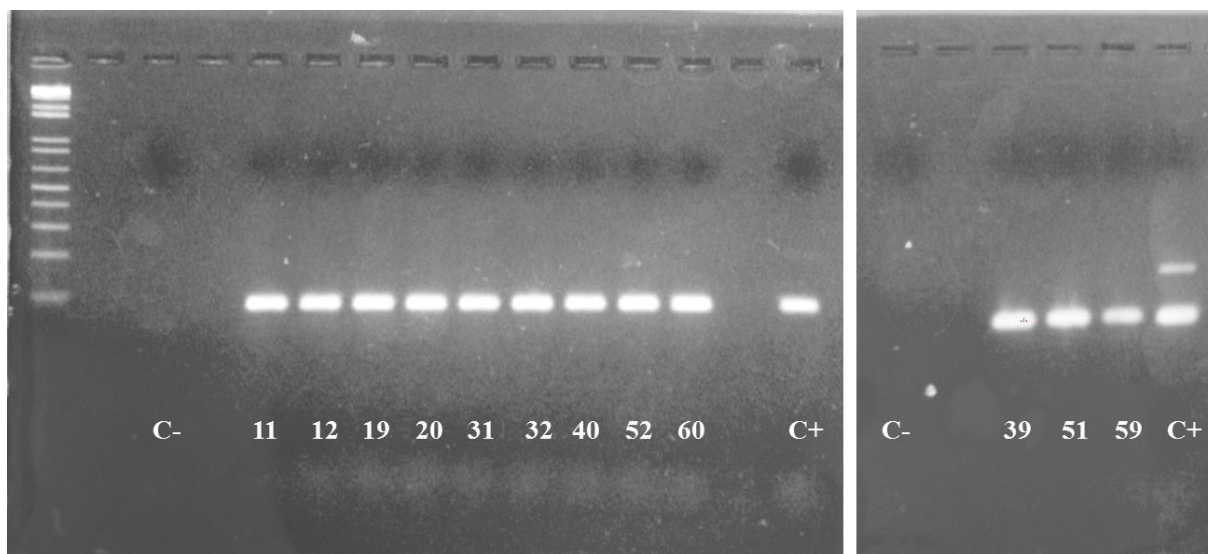


Imagem 4 - Imagem dos tratamentos (cultivares MGS Paraíso 2 e Sarchimor MG 8840 sem e com adubação fosfatada).

