

2.02.03 – Genética Vegetal.

EXPRESSÃO GÊNICA EM PLÂNTULAS DE *THEOBROMA CACAO* SUBMETIDAS AO ESTRESSE MECÂNICO, PROMOVIDO PELA COMPACTAÇÃO DO SOLO, ASSOCIADO À LOCALIZAÇÃO DE FÓSFORO

Carlos Henrique de C. Neto¹, Thayse F. Tosto², Alex-Alan F. de Almeida³, Arlicélio de Q. Paiva⁴

1. Discente do curso de Agronomia da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC)

2. Doutorado em Genética e Biologia Molecular (UESC)

3. Docente da Universidade Estadual de Santa Cruz - DCB/Orientador

4. Docente da Universidade Estadual de Santa Cruz - DCAA

Resumo

Na região cacauzeira da Bahia existem grandes áreas de solos de Tabuleiros Costeiros, que apresentam horizontes subsuperficiais coesos, onde normalmente não se cultivam cacau. Objetivou-se avaliar o comportamento molecular de plântulas de cacau submetidas à compactação do solo e a duas doses de fósforo. O experimento foi realizado utilizando um Latossolo Amarelo coeso, que foi acondicionado em um anel de PVC com 0,24 m de altura e 0,10 m de diâmetro interno. Na camada de 0-0,08 m a densidade do solo foi de 1,00 kg dm⁻³ para todos os anéis. Na profundidade de 0,08-0,16 m teve uma camada compactada, com densidade de 1,70 kg dm⁻³. A camada localizada abaixo da compactada teve 0,08 m de espessura e densidade de 1,00 kg dm⁻³ e dois níveis de fósforo no solo, 400 mg dm⁻³ (ideal) e 200 mg dm⁻³ (baixo). Como resultados observamos alterações na expressão de transcritos dos genes *Cu-Zn-sod* do cloroplasto e do citoplasma e *per-1*, relacionados com as enzimas antioxidativas, em todos os tratamentos.

Palavras-chave: cacau; tigmomorfogênese; genes.

Apoio financeiro: FAPESB.

Trabalho selecionado para a JNIC: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPP/UESC).

Introdução

A produção de cacau é frequentemente limitada por vários fatores, como deficiência nutricional, alagamento, déficit hídrico, solos compactados, metais pesados e fungos (REHEM et al., 2011; BERTOLDE et al., 2014; SANTOS et al., 2014; REIS et al., 2015). A nutrição mineral é essencial, uma vez que eleva a produtividade e melhora a qualidade dos frutos (SANTANA et al., 1988). Dentre os sete elementos minerais, o fósforo (P) é o fator nutricional mais limitante à produção de cacau (GAMA-RODRIGUES, 2004). Nos solos tropicais muito intemperizados e argilosos, a capacidade de fixação de P é elevada, reduzindo sua disponibilidade às plantas (SANTANA et al., 1988). Solos brasileiros, como os solos de tabuleiros costeiros, são deficientes em P (SILVA et al., 1967), tornando-se necessária a utilização de adubos químicos para suprir a deficiência.

O estresse mecânico em plantas geralmente induz alterações morfológicas durante o seu crescimento (LIU et al., 2007). Algumas respostas das plantas aos estímulos mecânicos estão associadas ao seu crescimento e são causadas por mudanças na expressão de genes que codificam proteínas envolvidas em diversos processos celulares (SMITH; ENNOS, 2003; LEE et al., 2007; STOKES et al., 2006). Este fenômeno se produz por meio da síntese de uma matriz de fitormônios, moléculas de sinalização, e outros componentes químicos, além de expressão gênica (CHEN et al., 2005; CHEHAB et al., 2009).

As informações existentes sobre os efeitos da ação mecânica do estresse mecânico em plantas de *Theobroma cacao* são bastante escassas. Análises moleculares por meio da expressão gênica podem elucidar alterações promovidas pela compactação do solo e doses de P em plantas de *T. cacao*, além de contribuir na compreensão dos mecanismos utilizados por essas plantas para se adaptarem e/ou aclimatarem ao estresse mecânico. Objetivou-se, no presente trabalho, determinar a expressão diferencial de genes envolvidos no metabolismo antioxidativo de plântulas de cacau submetidas à compactação do solo e a duas doses de P.

Metodologia

O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação, localizada no Campus Soane Nazaré de Andrade, da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, BA. O solo utilizado no experimento foi um horizonte B de um Latossolo Amarelo coeso, que foi peneirado e devidamente adubado conforme a análise química e física do solo antes da montagem do experimento. Ainda durante a adubação, só foi adicionado P no solo utilizado para caracterizar os tratamentos.

Posteriormente, foi feita a semeadura utilizando sementes do genótipo de cacau CCN 51. As sementes foram germinadas em tubos PVC com 0,24 m de altura e 0,1 m de diâmetro interno, subdividido em três anéis com 0,08 m. O solo dos anéis superior e inferior teve densidade 1 kg dm⁻³ para todos os tratamentos, ao passo que o solo dos anéis intermediários teve densidades de 1,0 para o controle e 1,7 kg dm⁻³ e uma camada de caulim (0,01 m de espessura) entre o solo compactado e a parede do PVC. Esse procedimento foi realizado,

pois o caulim possui, em sua constituição, alumínio tóxico (Al^{3+}) que impede que as raízes cresçam entre o solo e a parede de PVC, forçando, assim, o seu crescimento na camada de solo compactada. A compactação foi realizada mecanicamente, com o auxílio de um bastão de madeira com diâmetro compatível com o do anel do tubo de PVC. Além disso, o solo dos anéis inferiores receberam, no momento da adubação do solo, duas doses diferentes de P [baixa (200 mg dm^{-3}) e ideal (400 mg dm^{-3})]. Posteriormente, o fundo dos vasos (anéis sobrepostos) foi tampado com lâminas de isopor perfuradas, e colocados sobre bancadas da casa de vegetação. As coletas das plantas ocorreram aos 60 dias após a emergência das plantas.

O material vegetal foi coletado, imerso em nitrogênio líquido, e armazenado em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da liofilização. O RNA foi extraído a partir de folhas e raízes em quatro diferentes tratamentos [densidades do solo de 1,0 e $1,7\text{ kg dm}^{-3}$ com doses baixa (200 mg dm^{-3}) e ideal (400 mg dm^{-3}) de P no solo] utilizando o *RNAqueous kit* (Ambion®). Em seguida, a pureza e a integridade do RNA foram testadas por eletroforese em gel de agarose 1%. As amostras de RNA foram utilizadas para a síntese do cDNA com o *SuperSript TM II RNase H Reverse Transcriptase* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando *primers* oligo d(T)15. A RT-PCR de quantificação relativa foi realizada em um termociclador Real Time PCR, usando sequência de detecção (fluoróforo) não específica SYBR Green I. A abundância de transcritos foi analisada por meio de *primers* específicos dos genes associados a enzimas envolvidas no estresse antioxidativo (Tabela 1). Números da expressão relativa dos genes foram calculados como uma porcentagem das plantas controle utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) com os genes das enzimas actina, *gapdh* e *mdh* como controle endógeno, a fim de detectar alterações na abundância de transcritos.

Tabela 1: Descrição dos primers desenhados para *T. cacao* a partir de genes relacionados ao metabolismo antioxidativo.

| Gene | Protein | Sequence | Lenght (bp) | Tm ($^{\circ}\text{C}$) | %GC |
|---------------------|---------------|------------------------------------|-------------|---------------------------|-------|
| SOD citoplasmática | cytoplCuZnSOD | F - 5' GATGATGGCTGTGTGAGTTTCTCT 3' | 25 | 61.3 | 50.00 |
| | | R - 5' CAACAACAGCTCTCCATAATTTGA 3' | | | |
| SOD cloroplastídica | chlorCuZnSOD | F - 5' AATGGATGCATGTCAACAGGAGC 3' | 22 | 63.65 | 40.91 |
| | | R - 5' GATGATGGCTGTGTGAGTTTCTCT 3' | | | |
| Peroxidase | tcPER-1 | F - 5' CAGGTGTCGTGGGATCAAGA 3' | 21 | 60.08 | 47.62 |
| | | R - 5' TGGAAAACTACGCCAAATATGC 3' | | | |

Resultados e Discussão

Foi encontrado um a redução significativa ($p < 0,05$) em folhas na expressão de *Cu-Zn-sod* no citoplasma e no cloroplasto, quando comparada ao controle para todos os tratamentos. No entanto, em folhas, para o gene *per-1* mostrou uma expressão significativa ($p < 0,05$) aumentada de aproximadamente 4,1 vezes na densidade de $1,0\text{ kg dm}^{-3}$ com dose ideal de P e de 3,2 vezes na densidade de $1,7\text{ kg dm}^{-3}$ com dose ideal de P. Contudo para a densidade de $1,7\text{ kg dm}^{-3}$ a expressão foi reduzida em 80% o número de transcritos. Em relação à expressão dos genes *Cu-Zn-sod* no citoplasma e de *per-1*, em raízes, houve redução na expressão em todos os tratamentos. No entanto, essa redução na expressão destes genes foi mais evidente no tratamento $1,7\text{ kg dm}^{-3}$ com dose baixa de P, assim como em folhas.

A redução na expressão dos genes *Cu-Zn-sod* do cloroplasto e do citoplasma em folhas e raízes de plântulas de cacau submetidas à compactação do solo e a doses de P, bem como do gene *per-1* em raízes, pode ter ocorrido devido ao estresse oxidativo causado pela compactação do solo. Diversos estudos demonstraram que o dano à planta sob estresse pode ser desencadeado por espécies reativas de oxigênio (ERO), cujo dano mais crítico ocorre no nível da proteína PS2 D1 (YAMAMOTO et al., 2008; CALDERONE et al., 2003). Por outro lado, a produção de ERO, por sua vez, desempenha um papel fundamental na indução da produção de moléculas. Aumentos nas concentrações de ERO's, quando não eliminadas por enzimas, danificam as membranas, proteínas, RNA e moléculas de DNA e pode até levar à destruição celular através do estresse oxidativo (MITTLER, 2002; NIKI, 2009).

As enzimas antioxidantes desempenham um papel fundamental na remoção de ERO's e sua ativação está diretamente relacionada à defesa contra o estresse abiótico e desenvolvimento (FOYER; NOCTOR, 2009). No presente trabalho, o aumento na expressão do gene *per-1* em folhas, nas densidades de 1,0 e $1,7\text{ kg dm}^{-3}$ com dose ideal de P, sugere que as folhas foram mais tolerantes ao estresse que as raízes e podemos inferir que a dose ideal de P contribuiu significativamente para essa resposta de tolerância, já que na densidade $1,7\text{ kg dm}^{-3}$ com dose baixa de P, houve uma redução na expressão desse gene. A resposta no aumento da expressão do gene peroxidase, relacionada à defesa em plantas, ocorre em resposta a muitos estímulos bióticos e abióticos (MITTLER, 2002; TEIXEIRA et al., 2006; MARTINELLI et al., 2016).

A enzima *Cu-Zn-sod* dismuta os superóxidos produzidos nos cloroplastos e no citoplasma. A produção de $^1\text{O}_2$ pode causar reprogramação da expressão de outros genes, levando a clorose e morte celular programada, bem como induzir uma ampla gama de respostas relacionadas ao estresse biótico e abiótico (KLEINE; LEISTER, 2016). Vários estudos já mostraram que as aclimatizações de plantas para mudanças ambientais começam com a percepção molecular do estresse. Além disso, a transdução de sinal ocorre

buscando a regulação dos genes, que podem sofrer grandes variações em sua expressão, induzida pelo estresse (KIEFFER et al., 2009; AMUDHA; BALASUBRAMANI, 2011).

Conclusões

A compactação do solo, associado a doses de P, alterou a expressão de genes relacionados ao metabolismo antioxidativo em plântulas de cacau, principalmente em nível de raízes, evidenciado pela redução da expressão dos genes *Cu-Zn-sod* citoplasmática e *per-1* de enzimas envolvidas no sistema antioxidante e em folhas pelo aumento significativo da expressão do gene *per-1*, quando adicionado dose ideal de P.

Referências bibliográficas

- AMUDHA, J.; BALASUBRAMANI, G. Recent molecular advances to combat abiotic stress tolerance in crop plants. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews** 6(2), 31-58, 2011.
- BERTOLDE, F.Z.; ALMEIDA, A-A.F.; CORRÊA, R.X.; GOMES, F.P.; GAIOTTO, F.A.; BALIGAR, V.C.; LOGUERCIO, L.L. Molecular, physiological and morphological analysis of waterlogging tolerance in clonal genotypes of *Theobroma cacao* L. **Tree Physiology**, 30: 56–67, 2009.
- CALDERONE, V.; TRABUCCO, M.; VUJICÍĆ, A.; BATTISTUTTA, R.; GIACOMETTI, G.M.; ANDREUCCI, F.; BARBATO, R.; ZANOTTI, G. Crystal structure of the PsbQ protein of photosystem II from higher plants. **EMBO Reports** 4(9), 900–905, 2003.
- CHEHAB, E.W.; EICH, E.; BRAAM, J. Thigmomorphogenesis: a complex plant response to mechano – stimulation. **Journal of Experimental Botany**, 60 (1): 43 – 56, 2009.
- CHEN, H.; WILKERSON, C.G.; KUCHAR, J.A.; PHINNEY, B.S.; HOWE, G.A. Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA 102, 19237–19242, 2005.
- FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. **Antioxidant Redox Signaling** 11, 861–905, 2009.
- GAMA-RODRIGUES, A.C. Ciclagem de nutrientes em sistemas agroflorestais na região tropical: Funcionalidade e Sustentabilidade, In: MÜLLER, M.W.; GAMA-RODRIGUES, A.C.; BRANDÃO, I.C.F.L.; SERÔDIO, M.H.C.F. Sistemas agroflorestais, tendência da agricultura ecológica nos trópicos: sustento da vida e sustento de vida. 1a ed. Ilhéus, Ba: **Sociedade Brasileira de Sistemas Agroflorestais**: Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, 67-88, 2004.
- KIEFFER, P.; SCHRÖDER, P.; DOMMES, J.; HOFFMANN, L.; RENAUT, J.; HAUSMAN, J-F. Proteomic and enzymatic response of poplar to cadmium stress. **Journal of Proteomics** 72(3), 379-396, 2009.
- KLEINE, T.; LEISTER, D. Retrograde signaling: organelles go networking. **Biochimica et Biophysica Acta** 1857, 1313–1325, 2016.
- LEE, J.; NAM, J.; PARK, H.C.; NA, G.; MIURA, K.; JIN, J.B.; YOO, C.Y.; BAEK, D.; KIM, D.H.; JEONG, J.C.; KIM, D.; LEE, S.Y.; SALT, D.E.; MENGIST, T.; GONG, Q.; MA, S.; BOHNERT, H.J.; KWAK, S.S.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M.; YUN, D.J. Salicylic acid-mediated innate immunity in Arabidopsis is regulated by SIZ1 SUMO E3 ligase. **Plant Journal**, 49: 79–90, 2007.
- LIU, Y.; SCHIEVING, F.; STUEFER, J.F.; ANTEN, N.P. The effects of mechanical stress and spectral shading on the growth and allocation of ten genotypes of a stoloniferous plant. **Annals Botany** 99, 121–130, 2007.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, 25: 402-408, 2001.
- MARTINELLI, F.; REAGAN R.L.; DOLAN, D.; FILECCIA, V.; DANDEKAR, A. M. Proteomic analysis highlights the role of detoxification pathways in increased tolerance to Huang long bing disease. **BMC Plant Biology** 16,167, 2016.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science** 7 (9), 405-410, 2002.
- NIKI, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. **Free Radical Biology & Medicine**, London 47, 469–484, 2009.
- REHEM, B.C.; ALMEIDA, A-A.F.; SANTOS, I.C.; GOMES, F.P.; PIROVANI, C.P.; MANGABEIRA, P.A.O.; CORRÊA, R.X.; YAMADA, M.M.; VALLE, R.R. Photosynthesis, chloroplast ultrastructure, chemical composition and oxidative stress in *Theobroma cacao* hybrids with the lethal gene Luteus-Pa mutant. **Photosynthetica**. 49 (1): 127-139, 2011.
- REIS, G.S.M., ALMEIDA, A-A.F.; ALMEIDA, N.M.; CASTRO, A.V.; MANGABEIRA, P.A.O.; PIROVANI, C.P. Molecular, Biochemical and Ultrastructural Changes Induced by Pb Toxicity in Seedlings of *Theobroma cacao* L. **PLoS one**, 10(7), e0129696, 2015.
- SANTANA, M.B.M.; CABALA-ROSAND, P.; SANTANA, C.J.L. Exigências nutricionais e uso de fertilizantes em sistemas de produção de cacau. Ilhéus, **CEPEC/CEPLAC**, 1988.

SANTOS, I.C.; ALMEIDA, A-AF.; ANHERT, D.; CONCEIÇÃO, A. S.; PIROVANI, C. P.; PIRES, J. L. Molecular, physiological and Biochemical responses of *Theobroma cacao* L. genotypes to soil water deficit. **PLoS ONE** 9(12), e115746, 2014.

SILVA, L.F.; MELO, A.A.O.; CARVALHO, F.R.; DIAS, A.C.C.P. Características dos principais solos de cacau da Bahia. **Proceeding II International Cocoa Research Conference**, 412-416, 1967.

SMITH, V.; ENNOS, A. The effects of air flow and stem flexure on the mechanical and hydraulic properties of the stems of sunflowers *Helianthus annuus* L. **Journal Experimental Botany** 54:845–49, 2003.

STOKES, V.J.; MORECROFT, M.D.; MORISON, J. I. Boundary layer conductance for contrasting leaf shapes in a deciduous broadleaved forest canopy. **Agricultural and Forest Meteorology** 139(1), 40-54, 2006.

TEIXEIRA, F.K.; MENEZES-BENAVENTE, L.; GALVÃO, V.C.; MARGIS, R.; MARGIS-PINHEIRO, M. Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. **Planta** 224, 300-314, 2006.

YAMAMOTO, Y.; AMINAKA, R.; YOSHIOKA, M. Quality control of photosystem II: impact of light and heat stresses. **Photosynth Research** 98, 589, 2008.