

Avaliação do contributo da expressão genética na tolerância à desidratação em *Rosa × hybrida* cultivada em humidade relativa elevada

D.R.A. Carvalho¹, M.W. Vasconcelos¹, C.F.S. Koning-Boucoiran², F.A. Krens², E. Heuvelink³, S.M.P. Carvalho^{1,3,4,*}

¹ CBQF - Centro de Biotecnologia e Química Fina – Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa/Porto, Rua Dr. António Bernardino Almeida, 4200-072 Porto, Portugal

² Wageningen UR-Plant Breeding, P.O. Box 386, 6700 AA Wageningen, Holanda

³ Wageningen UR-Department of Plant Sciences, Horticulture and Plant Physiology Group, Droevendaalsesteeg 1, 6708 PB Wageningen, Holanda

⁴ Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre 823, 4150-180 Porto, Portugal

*Autor correspondente: smcarvalho@porto.ucp.pt

Resumo

O cultivo de flores de corte com elevada longevidade pós-colheita é de extrema importância para a satisfação do consumidor. O stress hídrico é uma das principais causas de uma longevidade reduzida. Este problema é agravado em plantas produzidas em ambiente de humidade relativa elevada (i.e. HR > 85%) devido maioritariamente a disfunções estomáticas associadas a baixas concentrações de ácido abscísico (ABA), conduzindo a acentuadas perdas de água. Neste estudo é analisado se uma cultivar sensível à HR elevada apresenta diferente expressão de genes relacionados com o metabolismo do ABA quando cultivada em HR moderada (60%) ou elevada (90%). Isolou-se RNA de folhas completamente expandidas, colhidas 180 min depois do início do período noturno, e avaliou-se a expressão relativa de genes envolvidos nos processos de: biossíntese (*AAO3* e *NCEDI*), oxidação (*CYP707A1* e *CYP707A3*) e conjugação (*UGT75B2*) do ABA.

A condutividade estomática noturna revelou-se 5,6 vezes mais elevada em plantas intactas desenvolvidas em HR elevada comparativamente a plantas desenvolvidas em HR moderada, mostrando a reduzida capacidade de fecho dos estomas durante o período de obscuridade. Ao fim de 4 h de desidratação, folíolos cultivados em HR elevada apresentaram um conteúdo relativo em água (CRA) 69% inferior aos folíolos cultivados em HR moderada, comprovando-se a sensibilidade do genótipo K023 à elevada HR durante o crescimento. Por fim, dos cinco genes estudados apenas a expressão de *CYP707A3* foi significativamente reduzida pela HR elevada, não se verificando diferenças significativas nos restantes genes. Concluiu-se que para o genótipo K023 a sensibilidade à HR elevada não pode ser explicada pela expressão dos genes avaliados neste estudo, recorrendo a folhas colhidas após 180 min de obscuridade (estímulo de fecho). Será de esperar que após a transferência das plantas para condições de pós-colheita, induzindo stress hídrico, a expressão genética entre níveis de HR será mais contrastante.

Palavras-chave: ácido abscísico, estomas, metabolismo, stress hídrico.

Abstract

Cultivation of cut flowers with high postharvest longevity is of extreme importance for consumer's satisfaction. A negative water balance is indicated as the most important factor reducing longevity. This problem is more severe in plants grown at high relative air humidity (i.e. RH > 85%) mainly due to a poor stomatal functioning associated to lower abscisic acid (ABA) concentrations, leading to higher water loss. In this paper it is analysed whether a sensitive cut rose cultivar to high RH show different gene expression related to ABA metabolism when grown at moderate (60%) or high (90%) RH. RNA was isolated from fully developed leaves, harvested 180 min after the beginning of the dark period (stomatal closing stimulus) and the relative gene expression was evaluated in genes involved in: biosynthesis (*AAO3* and *NCED1*), oxidation (*CYP707A1* and *CYP707A3*) and conjugation (*UGT75B2*) of ABA.

The stomatal conductivity in the dark period was 5.6-fold higher in intact plants developed at high RH compared to moderate RH-grown plants, showing the reduced closure capacity of the stomata during darkness. After 4 h of leaflet desiccation, leaflets grown at high RH showed a relative water content (RWC) 69% lower than the moderate RH-grown leaflets, validating the sensitivity of K023 to high RH during growth. At last, from the five studied genes only the expression of *CYP707A3* was significantly reduced by high RH, without significant differences found in the other genes. In conclusion, the sensitivity of the genotype K023 to high RH cannot be explained by the expression of the genes evaluated in this study, using leaves harvested 180 min after the beginning of the dark period (closing stimulus). We expect that after transferring the plants to the postharvest conditions, inducing water stress, a more contrasting gene expression among RH levels will appear.

Key words: abscisic acid, metabolism, stomata, water stress.

INTRODUÇÃO

A produção de plantas ornamentais de alta qualidade é de extrema importância devido à forte competição existente no setor da horticultura ornamental e por forma a garantir a satisfação do consumidor. O stress hídrico é uma das causas principais da redução da longevidade pós-colheita principalmente em plantas produzidas em ambiente de humidade relativa elevada (i.e. HR > 85%). A HR elevada durante o crescimento inibe a capacidade de encerramento dos estomas em resposta a estímulos de fecho, como a desidratação ou a obscuridade, levando a acentuadas perdas de água (Fanourakis *et al.*, 2011). Associadas a estas elevadas aberturas estomáticas, detetaram-se baixas concentrações de ácido abscísico (ABA) em folhas de *Trasdescantia virginiana* (Rezaei Nejad e van Meeteren, 2007), *Vicia faba* (Aliniaiefard *et al.*, 2014) e *Rosa*×*hybrida* (Arve *et al.*, 2013) desenvolvidas em HR elevada (90%), comparativamente a folhas desenvolvidas em HR moderada (60%). A concentração de ABA depende essencialmente da sua biossíntese e do seu catabolismo (oxidação e conjugação). O ABA é sintetizado a partir do isopentenil difosfato seguido de uma cascata de reações, sendo de salientar a conversão da violaxantina em xantoxina pela enzima 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenase (codificada pelo gene *NCED1*) (Schwartz *et al.*, 1997) e pela conversão de abscísico aldeído em ácido abscísico pela enzima abscísico-aldeído oxidase (codificada pelo gene *AAO3*) (Seo *et al.*, 2000). Em *Arabidopsis thaliana* foram identificados os genes *CYP707A1* e *CYP707A3* como responsáveis pela oxidação do ABA em ácido faseico aquando da transferência das plantas de HR moderada para elevada (Okamoto *et al.*, 2009). Por fim, foi ainda

recentemente descrita em rosas a conjugação do ABA com glucose formando ABA-glucose-éster (ABA-GE) (Arve *et al.*, 2013). Este processo é mediado pela enzima glucosiltransferase (codificada pelo gene e.g. *UGT75B2*). O presente estudo teve como objectivo analisar se cultivares de rosas sensíveis à HR elevada apresentam diferenças na expressão de genes relacionados com o metabolismo do ABA quando produzidas em ambientes de HR contrastantes. A rosa foi utilizada como modelo, uma vez que se trata de uma espécie com elevada importância económica a nível mundial e pelo facto de ter servido de base a recentes estudos nesta área.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção do material vegetal e condições de crescimento

Estacas enraizadas do genótipo K023, proveniente da população tetraplóide segregante de rosas K5, foram plantadas em vasos de 3 L contendo uma mistura de turfa negra (Jongkind B.V., Aalsmeer, Holanda) e perlite (Agra-perlite) (2:1, v/v). Ao longo do ciclo cultural apenas se permitiu o desenvolvimento de uma haste floral por planta, correspondendo a uma densidade de plantação de 40 plantas m⁻². Catorze plantas foram aleatoriamente distribuídas (7+7) por duas câmaras fitoclima (c x l x h = 1,3 × 0,8 × 1,3 m) (Weiss Technik, Leicestershire, Reino Unido), ambas com uma temperatura constante de 20 ± 0,7 °C. Uma das câmaras foi mantida a 62 ± 3% de HR, resultando num DPV (défice de pressão de vapor) de 0,89 ± 0,03 kPa (HR moderada) e a segunda câmara manteve-se a 89 ± 4% de HR, resultando num DPV de 0,26 ± 0,06 kPa (HR elevada). Lâmpadas fluorescentes (TLD 58W/84, Philips, Eindhoven, Holanda) forneceram um fotoperíodo de 20 h diárias de 310 ± 15 μmol m⁻²s⁻¹ de radiação fotossinteticamente activa (Model LI-250, LI-COR, Lincoln, Nebraska, EUA). A intensidade luminosa foi medida 60 cm acima do nível do solo. As plantas foram regadas diariamente com uma solução nutritiva standard (Fanourakis *et al.*, 2009).

Resposta dos estomas a HR elevada durante o crescimento das folhas

De modo a avaliar a resposta dos estomas desenvolvidos em HR contrastantes sujeitos a desidratação, folíolos terminais de folhas trifoliadas completamente expandidas e jovens (i.e. imediatamente acima da folha pentafoliada na posição 1 a contar do ápice) foram destacados da planta e colocados a re-hidratar para garantir a maximização da turgescência das folhas (Fanourakis *et al.*, 2011). Após re-hidratação dos folíolos a resposta estomática à desidratação foi avaliada gravimetricamente após 4 h (balança LP 3200D, Sartorius AG, Goettingen, Alemanha) em condições constantes de evapotranspiração (21,5 ± 0,5 °C, 47 ± 5% HR, 8 ± 2 μmol m⁻² s⁻¹).

A condutividade estomática (g_s) foi medida em plantas intactas, 2 h depois do início dos períodos diurno e noturno em folíolos terminais de folhas trifoliadas completamente expandidas e jovens com um porómetro (AP4, Delta-T Devices, Cambridge, Reino Unido).

Quer na medição da g_s quer na determinação da resposta estomática à desidratação foram avaliados sete folíolos (um por planta) em cada HR.

Extração de RNA e síntese de cDNA

Folíolos de folhas pentafoliadas (da 1^a à 4^a posição) foram recolhidos 180 min depois do início do período noturno (estímulo de fecho dos estomas) por forma a avaliar a expressão genética dos genes envolvidos no metabolismo do ABA. Os folíolos foram colocados imediatamente em azoto líquido e armazenados a -80 °C. Folíolos de duas

folhas provenientes de duas plantas diferentes foram moídas em azoto líquido. O RNA total foi extraído utilizando o método CTAB (Chang et al., 1993) adaptado. O RNA foi purificado com Dnase I kit (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, EUA) de forma a eliminar eventual contaminação por DNA. A integridade do RNA foi avaliada através de gel de electroforese (1,5%). Um micrograma de RNA foi convertido em cDNA usando iScript kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, EUA). A síntese de cDNA ocorreu num termociclador com o seguinte programa: 5 min a 25 °C, 30 min a 42 °C, 5 min a 85 °C, 5 min a 4 °C, 5 min a 85 °C, mantendo-se o final da reação constante a 10 °C.

PCR Quantitativo em tempo real (q-RT-PCR) e análise dos resultados

Os primers foram desenhados utilizando os programas DNASTAR (DNASTAR, Madison, EUA) e Primer3Plus (Untergasser et al., 2007) e produzidos por Biologio BV (Biologio BV, Nijmegen, Holanda) (Tabela 1).

Os qRT-PCR foram realizados num termociclador de tempo real (CFX96TM Real-Time PCR machine, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, EUA). As reações de qRT-PCR ocorreram num volume total de 10 µl contendo: 5 µl de SYBR Green PCR Mix, 2 µl cDNA template (diluído 10 vezes), 0,3 µl de cada primer e 2,4 µl de água ultra-pura. As condições do termociclador em tempo real foram: 95 °C durante 3 min, seguidos de 39 ciclos a 95 °C durante 15 s e 60 °C durante 1 min, finalizando com 95 °C durante 10 s e 65 °C durante 5 s. Foram analisadas duas réplicas técnicas e duas réplicas biológicas por gene. Actina e Ubiquitina foram utilizados como genes de referência. Primeiramente calculou-se o ΔCt através de: $\Delta Ct = (Ct \text{ do gene de interesse} - Ct \text{ da média dos genes de referência})$. De seguida, a expressão genética relativa (EGR) foi obtida por: $EGR = 2^{-\Delta Ct}$. Uma vez que os valores obtidos foram extremamente baixos, de forma a facilitar a análise dos resultados foi efetuada a seguinte transformação dos dados: Valor utilizado = $\text{Log}_2 (EGR \times 100000)$.

Análise estatística

A análise de variância (1-way ANOVA) foi conduzida considerando plantas individuais como unidades experimentais e os efeitos foram testados a $P = 0,05$. O programa estatístico Genstat (15th edition; VSN International Ltd., Herts, Reino Unido) foi utilizado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De modo a determinar a resposta estomática a estímulos de fecho (desidratação e obscuridade), folíolos terminais de folhas completamente expandidas foram sujeitos a desidratação durante 4 h e a g_s foi medida em plantas intactas nos períodos diurno e noturno. A g_s em folhas intactas totalmente expandidas foi significativamente mais elevada em plantas desenvolvidas em HR elevada, quer no período diurno ($P < 0,001$) quer no período noturno ($P = 0,003$), comparativamente a plantas desenvolvidas em HR moderada (Figs. 1B e 1C, respetivamente). Estes resultados mostram o elevado grau de abertura dos estomas desenvolvidos a HR elevada mesmo durante o período de obscuridade, uma vez que a g_s noturna foi 5,6 vezes mais elevada em plantas intactas desenvolvidas em HR elevada comparativamente a plantas desenvolvidas em HR moderada, comprovando os resultados obtidos em estudos anteriores (e.g. Arve *et al.*, 2013). O CRA de folíolos desidratados durante 4 h foi de 65,8% em plantas crescidas em HR moderada e 20,4% em plantas desenvolvidas em HR elevada ($P < 0,001$) (Fig. 1), comprovando-se a reduzida capacidade de fecho dos estomas à desidratação. Estes resultados refletem a sensibilidade do genótipo K023 à HR elevada durante o

crescimento, já que estes apresentam valores de CRA às 4h de desidratação na gama de valores apresentada para o genótipos sensível descrito por Fanourakis *et al.* (2011). Por fim, dos cinco genes estudados apenas a expressão do *CYP707A3* (gene envolvido na oxidação do ABA) foi significativamente reduzida pela HR elevada ($P = 0,039$), não se verificando diferenças significativas nos restantes genes (Tabela 2). Pelo contrário, Okamoto *et al.* (2009) descreveu o aumento da expressão de *CYP707A3* em plantas de *A. thaliana* transferidas de HR moderada para HR elevada. Estes autores concluíram que em *A. thaliana* crescidas em HR elevada, a reduzida resposta estomática a estímulos de fecho parece estar relacionada com a elevada taxa de oxidação do ABA a ácido faseico, o que não parece acontecer em *Rosa hybrida*. Com este estudo, conclui-se que a sensibilidade à HR elevada do genótipo K023 não pode ser explicada por diferenças nos níveis de expressão dos genes aqui estudados. Será de esperar que após a transferência das plantas para condições de pós-colheita, induzindo stress hídrico, a expressão genética entre níveis de HR será mais contrastante. Paralelamente, é ainda necessário realizar estudos anatómicos, histológicos e bioquímicos de modo a compreender se, para além da expressão genética, existem outros factores envolvidos na tolerância ao stress hídrico.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Portugal) o apoio financeiro através da bolsa de doutoramento SFRH/BD/72924/2010 a D.R.A. Carvalho.

Referências

- Aliniaiefard, S., Malcolm Matamoros, P., van Meeteren, U. (2014). Stomatal malfunctioning under low Vapour Pressure Deficit (VPD) conditions: Induced by morphological and anatomical or by signalling alterations? *Physiologia Plantarum* doi:10.1111/ppl.12216
- Arve, L.E., Terfa, M.T., Gislerød, H.R., Olsen, J.E., Torre, S. (2013) High relative air humidity and continuous light reduce stomata functionality by affecting the ABA regulation in rose leaves. *Plant Cell and Environment*, 36, 382-392
- Chang, S., Puryear, J., Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11, 113-116
- Fanourakis, D., Carvalho, S.M.P., Almeida, D.P.F., Heuvelink, E. (2011) Avoiding high relative air humidity during critical stages of leaf ontogeny is decisive for stomatal functioning. *Physiologia Plantarum*, 142, 274-286
- Fanourakis, D., Tapia, A., Heuvelink, E., Carvalho, S.M.P. (2009) Cultivar differences in the stomatal characteristics of cut roses grown at high relative humidity. *Acta Horticulturae* 847: 251-258
- Okamoto, M., Tanaka, Y., Abrams, S.R., Kamiya, Y., Seki, M., Nambara, E. (2009) High humidity induces abscisic acid 8'-hydroxylase in stomata and vasculature to regulate local and systemic abscisic acid responses in arabidopsis. *Plant Physiology*, 149, 825-834
- Rezaei Nejad, A., van Meeteren, U. (2007) The role of abscisic acid in disturbed stomatal response characteristics of *Tradescantia virginiana* during growth at high relative air humidity. *Journal of Experimental Botany*, 58, 627-636
- Schwartz, S.H., Tan, B.C., Gage, D.A., Zeevaart, J.A., McCarty, D.R. (1997) Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science*, 276, 1872-1874
- Seo, M., Koshiba, T. (2002) Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*, 7, 41-48

Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J.A.M. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3 Nucleic Acids Research 35: W71-W74; doi:10.1093/nar/gkm306

Tabela 1 – Sequências dos primers utilizados na avaliação da expressão genética através de PCR quantitativo em tempo real.

	Forward (5'- 3')	Reverse (5'- 3')
<i>NCED1</i>	GAATTCGGAGAACGAAGACG	CTTCGAGCTTCAAAGTCATGG
<i>AAO3</i>	ATACCCGAAGCAAGTTGGTG	AGCAAGGGTAGTTTGTGTCTCC
<i>CYP707A1</i>	TTGGGATGTCCTTGCGTGATGATT	CTTGGCGTGGTAGTCTCCTTGGTG
<i>CYP707A3</i>	GCAGGCAGCGAAGATGATAAGGA	AGCCATGTAAGAGCAGCAGTCGTG
<i>UGT75B2</i>	GGTATGGTGGTTTTTCATGGTG	TGGAACCCCTAAACTCAAAGC
<i>Actina</i>	TTCCTTGCTCATCCTGTCTG	AAGTCCTCTTCCAACCATCC
<i>Ubiquitina</i>	GGTGAAGGCGTGCGTAGC	AGGCTCCGTGGTGGTATTATTG

Tabela 2 – Expressão genética relativa (EGR) de cinco genes envolvidos no metabolismo do ácido abscísico em função da humidade relativa (HR) moderada (60%) e elevada (90%) em folíolos completamente expandidos de rosa, recolhidos 180 min depois do início do período noturno. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P = 0,05$) (comparação em colunas). Valores são as médias de duas réplicas biológicas.

	Log ₂ (EGR*100000)				
	<i>NCED1</i>	<i>AAO3</i>	<i>CYP707A1</i>	<i>CYP707A3</i>	<i>UGT75B2</i>
60% HR	7.2 ^a	10.8 ^a	9.3 ^a	7.4 ^b	12.3 ^a
90% HR	8.5 ^a	10.8 ^a	9.7 ^a	6.8 ^a	12.5 ^a
<i>F pr.</i> (< 0.05)	0.253	0.450	0.774	0.039	0.153

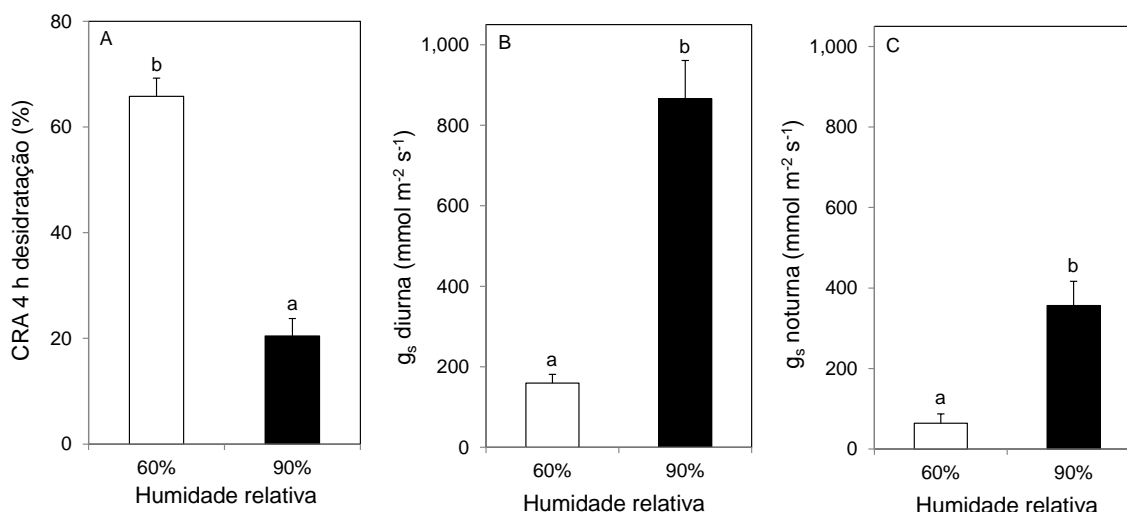


Figura 1 – Conteúdo relativo em água (CRA) após 4 h de desidratção (A) e condutividade estomática (g_s) diurna (B) e noturna (C) em função da humidade relativa (HR) moderada (barras brancas, 60%) e elevada (barras pretas, 90%) de folíolos completamente expandidos de rosa de corte. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P = 0,05$). Os valores representam as médias de sete folíolos \pm erro padrão.