

Avaliação da Resposta Fisiológica de Acessos de *Manihot esculenta* (Crantz) ao Estresse Hídrico e Estabelecimento de Protocolo para a Extração de RNA Total de Folhas e Raízes

Evaluation of the Physiological Response of *Manihot esculenta* (Crantz) Accessions to Water Stress and Establishment of a Protocol for Total RNA Extraction from Leaves and Roots

Alison Borges Vitor¹; Benjamim Pereira da Costa Neto²; Joemerson Damacena Ferreira³; Dannielle Roseanne Pereira Santos Martins³; Agnaldo Rodrigues de Melo Chaves⁴; Saulo de Tarso Aida⁵; Carolina Vianna Morgante⁶

Resumo

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a resposta fisiológica de dois acessos de *Manihot esculenta* submetidos ao estresse hídrico, em plantas com 4 e 2 meses, e estabelecer um protocolo para a extração de RNA total de folhas e raízes. Foi realizado um experimento em

¹Estudante de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (UPE), bolsista IC Fapece, Petrolina, PE.

² Estudante de Ciências Biológicas, UPE, bolsista Apoio Técnico Fapesb, Petrolina, PE.

³Estudante de Engenharia Agrônoma, Universidade do Estado da Bahia (Uneb), bolsista IC Fapesb, Juazeiro, BA.

⁴Engenheiro-agrônomo, D. Sc. em Fisiologia Vegetal, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

⁵Biólogo, D. Sc. em Fisiologia Bioquímica de Plantas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

⁶Bióloga, D. Sc. em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, carolina.morgante@embrapa.br.

casa de vegetação com 96 plantas dos acessos Cacau e 2020 do Banco de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura, distribuídas em três blocos casualizados. Foram medidos parâmetros de crescimento como expansão foliar, diâmetro do caule, altura da planta e a massa seca de folhas, caules, raízes e raízes comerciais. Foram também realizadas medidas do teor e fluorescência da clorofila. Observou-se que, no geral, o comportamento em resposta ao estresse hídrico é semelhante entre os dois acessos analisados, não havendo contrastes. Plantas de 4 meses mostraram-se ligeiramente mais suscetíveis ao estresse hídrico. Dentre os três protocolos testados para a extração de RNA total de folhas e raízes, aquele descrito por Gambino et al. (2008), com modificações, foi o que apresentou os melhores resultados.

Palavras-chave: mandioca, seca, ácido nucleico.

Introdução

A mandioca (*Manihot esculenta*), nativa da América do Sul, é amplamente cultivada em regiões tropicais e subtropicais, sendo importante fonte de carboidratos e calorias. No Brasil, terceiro maior produtor mundial, as regiões Norte e Nordeste detêm os maiores valores de produção, porém, com baixos valores de rendimento médio (IBGE, 2012).

Apesar de os trabalhos de pesquisa em melhoramento de mandioca no Brasil terem iniciados na década de 1940, a tolerância a estresses abióticos, principalmente ao hídrico, ainda é pouco explorada, mesmo sendo a mandioca amplamente cultivada em áreas com baixa precipitação anual e déficit hídrico, uma das principais causas de baixa produtividade (ALVES et al., 2007).

Dificuldades enfrentadas no melhoramento da cultura por métodos tradicionais tornam promissoras a inserção de metodologias de seleção assistida por marcadores e a engenharia genética em programas de melhoramento de cultivares de mandioca. Estudos genômicos com *M. esculenta* foram impulsionados com o recente sequenciamento de seu genoma, permitindo a predição da função de aproximadamente 30.000 genes codificadores de proteínas (PROCHNIK et al., 2012), a identificação de marcadores moleculares e a construção de um mapa de ligação para a espécie (RABBI et al., 2012).

Análises do transcrito possibilitam o entendimento de mecanismos moleculares que controlam processos relacionados à resposta a estresses abióticos, sendo uma ferramenta para o descobrimento de genes. Lokko et al. (2007) foram os pioneiros na análise do transcrito de mandioca sob desidratação. Em estudo complementar, Utsumi et al. (2012), utilizando microarranjos de oligonucleotídeos, avaliaram a resposta de três genótipos quanto à tolerância à desidratação e concluíram que *M. esculenta* parece apresentar mecanismos similares de resposta e tolerância aos encontrados em outras espécies vegetais.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta fisiológica de dois acessos de *M. esculenta* submetidos ao estresse hídrico em casa de vegetação e estabelecer um protocolo de extração de RNA total de folhas e raízes para dar suporte a estudos de expressão gênica em mandioca.

Material e Métodos

Manivas com aproximadamente 20 cm dos acessos 2020 e Cacau, do Banco de Germoplasma de Mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura, foram enraizadas em vasos de 40 L contendo uma mistura de uma parte de areia, duas de solo mineral e meia de esterco e mantidas em casa de vegetação, totalizando 96 vasos organizados em três blocos casualizados, divididos em dois grupos: (1) controle, irrigado diariamente; (2) tratamento, com suspensão da irrigação.

Foi avaliada a resposta dos dois acessos para a tolerância à seca, em duas idades diferentes, 2 e 4 meses. A avaliação fisiológica dos genótipos foi realizada com base em medidas de crescimento, tais como expansão foliar, diâmetro do caule, altura da planta e a massa seca de folhas, caules, raízes e raízes comerciais. Foram também realizadas medidas do teor e fluorescência da clorofila. As plantas foram coletadas em três pontos distintos, a depender de seu grau de hidratação: (1) plantas em estado moderado de desidratação; (2) plantas em estado avançado de desidratação; (3) plantas reidratadas, após 48 horas. Em cada ponto, foram coletadas folhas e raízes de três plantas dos grupos tratamento e controle.

Para a extração de RNA total de folhas e raízes, foram testados os seguintes métodos: (1) com reagente comercial para a extração de DNA, RNA e proteínas, à base de fenol e isotiocianato de guanidina, seguindo protocolo do fabricante; (2) com kit comercial baseado na ligação do RNA a partículas minerais carreadoras e filtragem por centrifugação, seguindo métodos do fabricante e; (3) com o protocolo descrito por Gambino et al. (2008).

Resultados e Discussão

Os dados de medida de crescimento demonstraram que os dois acessos, Cacau e 2020, quando hidratados, apresentaram padrões de expansão foliar semelhantes, independentemente da idade. Já as plantas submetidas ao estresse hídrico apresentaram taxa reduzida de expansão foliar, porém, foram capazes de retomar o crescimento após reidratação (Figura 1). Em relação às medidas de diâmetro do caule, não houve diferença significativa entre as taxas de crescimento de plantas do acesso Cacau estressadas e controle, nas duas idades avaliadas. As plantas do acesso 2020 apresentaram redução significativa da taxa de crescimento caulinar, sendo mais proeminente naquelas com 4 meses de idade.

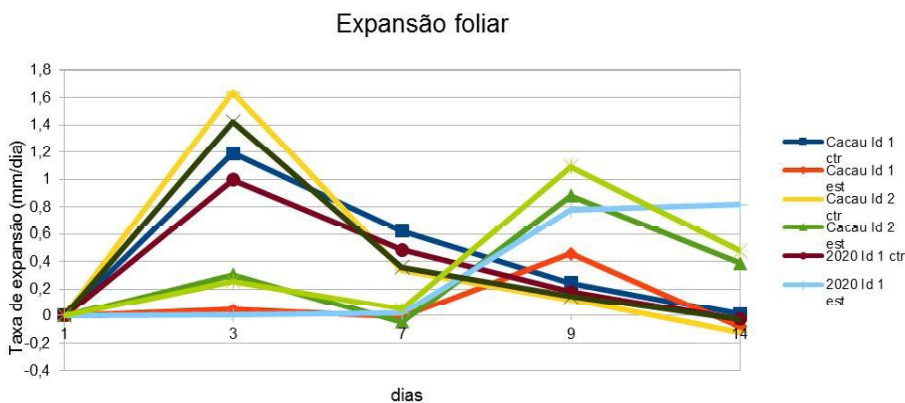


Figura 1. Variação da taxa de expansão foliar nos acessos de *Manihot esculenta* Cacau e 2020 submetidos (est) ou não (ctr) ao estresse hídrico, em plantas com 4 (Id1) e 2 meses (Id 2).

Tanto as plantas do acesso Cacau como as do acesso 2020 com idade de 4 meses tiveram o crescimento em altura afetado pela imposição do estresse. Entre as plantas com 2 meses de idade, apenas aquelas do acesso 2020 apresentaram redução do crescimento em altura em decorrência do estresse hídrico. Com relação à massa seca, as plantas do acesso Cacau de 4 meses estressadas apresentaram diminuição significativa de 78% e 40% da massa de folhas e caules, respectivamente, em relação ao grupo controle.

Plantas do mesmo acesso com 2 meses não apresentaram variações significativas entre os valores de massa de raiz, caule e folhas; mas plantas estressadas do acesso 2020 com 4 meses de idade apresentaram diminuição significativa de 86%, 62% e 48% na massa seca de folhas, raízes e caules, respectivamente, em relação ao grupo controle. Plantas estressadas do mesmo acesso com 2 meses apresentaram redução de 64% e 63% da massa de folhas e raízes, respectivamente. Quanto às medidas de fluorescência da clorofila, plantas dos acessos 2020 e Cacau apresentaram comportamento semelhante de redução das medidas quando submetidas ao estresse hídrico e foram capazes de atingir valores semelhantes aos de plantas controle 48 horas após reidratação. Não houve diferença significativa entre os valores de medida do conteúdo de clorofila entre plantas estressadas e controle, nas duas idades analisadas.

Dentre os protocolos de extração de RNA total testados, o de Gambino et al. (2008), com modificações, foi o que apresentou os melhores resultados. Na etapa de precipitação do RNA com cloreto de lítio, a centrifugação foi feita a 11.000 g, durante 40 minutos, o que permitiu a execução do protocolo com uma microcentrífuga de bancada, sem a necessidade de uma ultracentrífuga.

Conclusões

O comportamento dos dois acessos analisados, Cacau e 2020, em resposta ao estresse hídrico foi semelhante, não havendo contrastes.

O protocolo testado, com alteração no tempo e velocidade de centrifugação em relação àquele publicado por Gambino et al. (2008), foi efetivo para a extração de RNA total de folhas e raízes de *M. esculentum*, dispensando o uso de uma ultracentrífuga para o isolamento do RNA total.

Referências

ALVES, A. A. C; SILVA, A. F.; QUEIROZ, D. C.; DITA, M. A. Avaliação de variedades de mandioca para tolerância à seca, em condições semi-áridas do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA MANDIOCA, 12., 2007, Paranavaí. **Mandioca**: bioenergia, alimento e renda. Botucatu: CERAT: UNESP, 2007. 1 CD-ROM.

GAMBINO, G.; PERRONE, I.; GRIBAUDO, I. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. **Phytochemical Analysis**, Malden, v. 19, n. 6, p. 520-524, 2008.

IBGE. **Estatística da produção agrícola**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default_ult_atu.sht>. Acesso em: 10 abr. 2014.

LOKKO, Y.; ANDERSON, J. V.; RUDD, S.; RAJI, A.; HORVATH, D.; MIKEL, M. A.; KIM, R.; LIU, L.; HERNANDEZ, A.; DIXON, A. G.; INGELBRECHT, I. L. Characterization of an 18,166 EST dataset for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) enriched for drought-responsive genes. **Plant Cell Report**, New York, v. 26, n. 9, p. 1605-1618, 2007.

PROCHNIK, S.; MARRI, P. R.; DESANY, B.; RABINOWICZ, P. D.; KODIRA, C.; MOHIUDDIN, M.; RODRIGUEZ, F.; FAUQUET, C.; TOHME, J.; HARKINS, T.; ROKHSAR, D. S.; ROUNSLEY, S. The Cassava genome: current progress, future directions. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 5, n. 1, p. 88-94, 2012.

RABBI, I. Y.; KULEMBEKA, H. P.; MASUMBA, E.; MARRI, P. R.; FERGUSON, M. An EST-derived SNP and SSR genetic linkage map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 125, n. 2, p. 329-342, 2012.

UTSUMI, Y.; TANAKA, M.; MOROSAWA, T.; KUROTANI, A.; YOSHIDA, T.; MOCHIDA, K.; MATSUI, A.; UMEMURA, Y.; ISHITANI, M.; SHINOZAKI, K.; SAKURAI, T.; SEKI, M. Transcriptome analysis using a high-density oligomicroarray under drought stress in various genotypes of cassava: an important tropical crop. **DNA Research**, Tokyo, v. 19, n. 4, p. 335-345, 2012.