



ABSORÇÃO, TRANSPORTE E METABOLISMO DO CÁLCIO RELACIONADOS A QUALIDADE E DESORDENS FISIOLÓGICAS EM FRUTOS

Sergio Tonetto de Freitas, PhD
Pesquisador, Embrapa Semiárido

Índice

1. Papel do Ca^{2+} como nutriente
2. Cálcio: solo-planta-fruto-célula
3. Mecanismos reguladores de desordens fisiológicas em frutos
4. Trabalhos de pesquisa

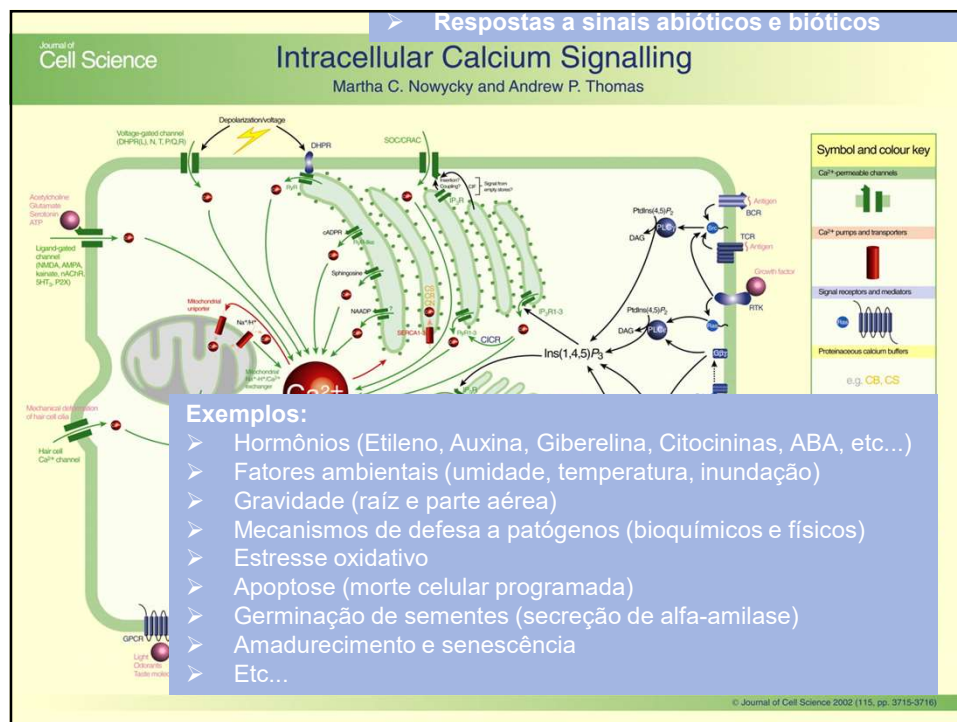
Índice

1. Papel do Ca^{2+} como nutriente

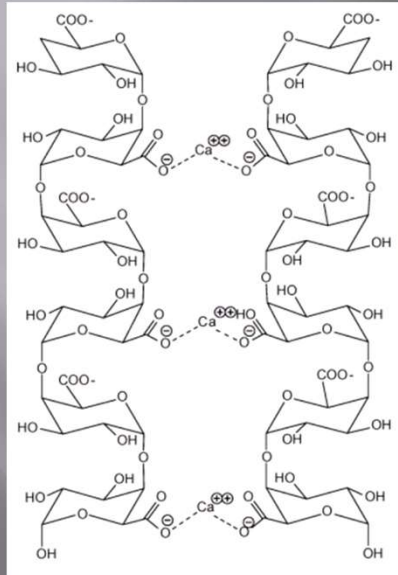
2. Cálcio: solo-planta-fruto-célula

3. Mecanismos reguladores de desordens fisiológicas em frutos

4. Trabalhos de pesquisa

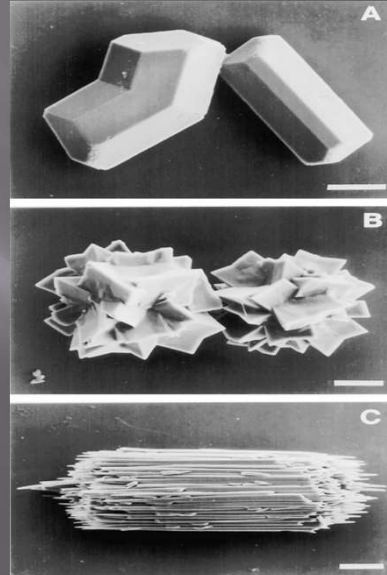


Estrutura de parede celular



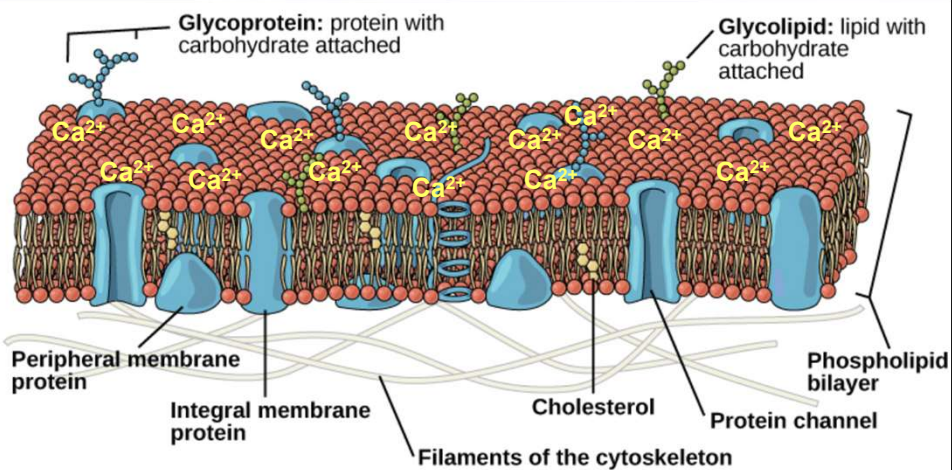
Pectina (Caffall and Mohnen, 2009).

Balanço inônico



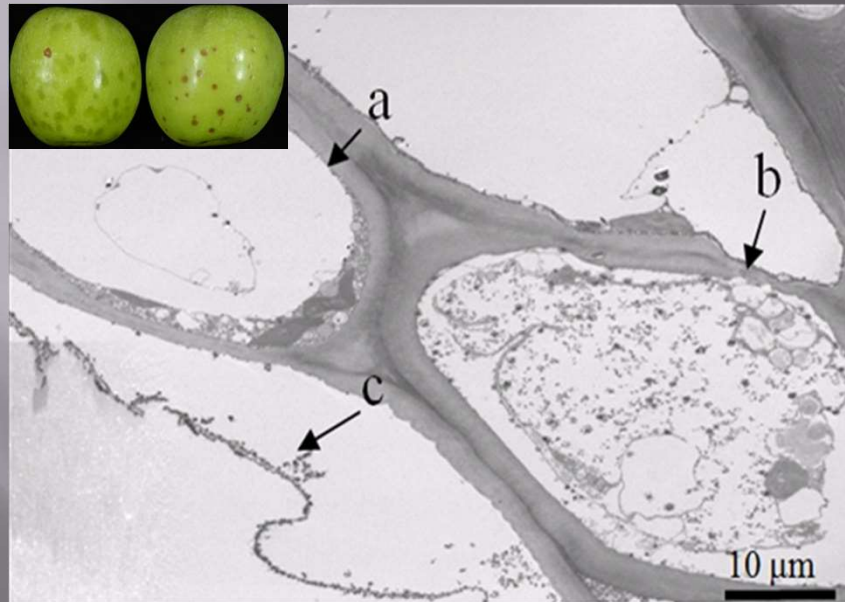
Características de cristais de oxalato de cálcio em células vegetais (Webb, 1999).

Estrutura e função de membranas



Source: <http://cnx.org/content/m45432/latest/?collection=col11551/latest>

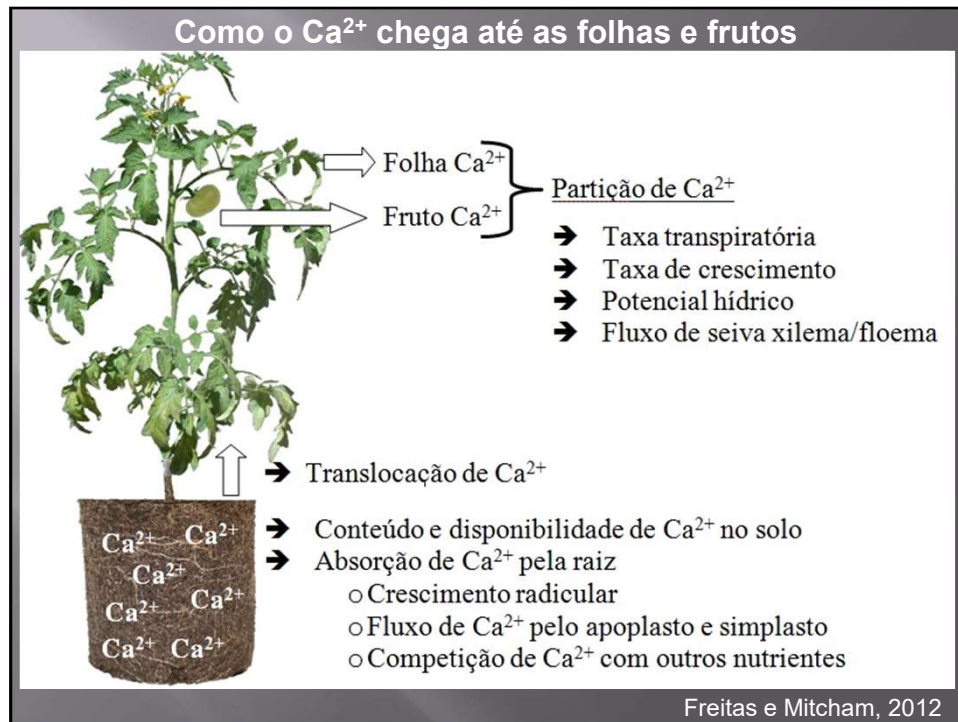
Estrutura e função de membranas



De Freitas et al., 2010

Índice

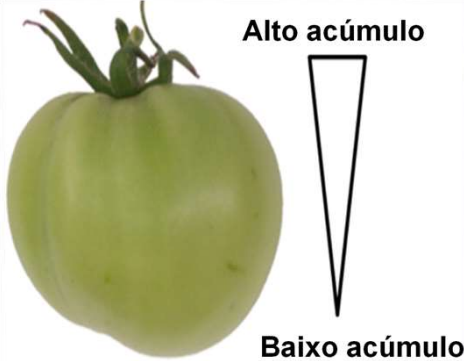
1. Papel do Ca^{2+} como nutriente
- 2. Cálcio: solo-planta-fruto-célula**
3. Mecanismos reguladores de desordens fisiológicas em frutos
4. Trabalhos de pesquisa



Acúmulo de Ca^{2+} em frutos

Balanço hídrico:

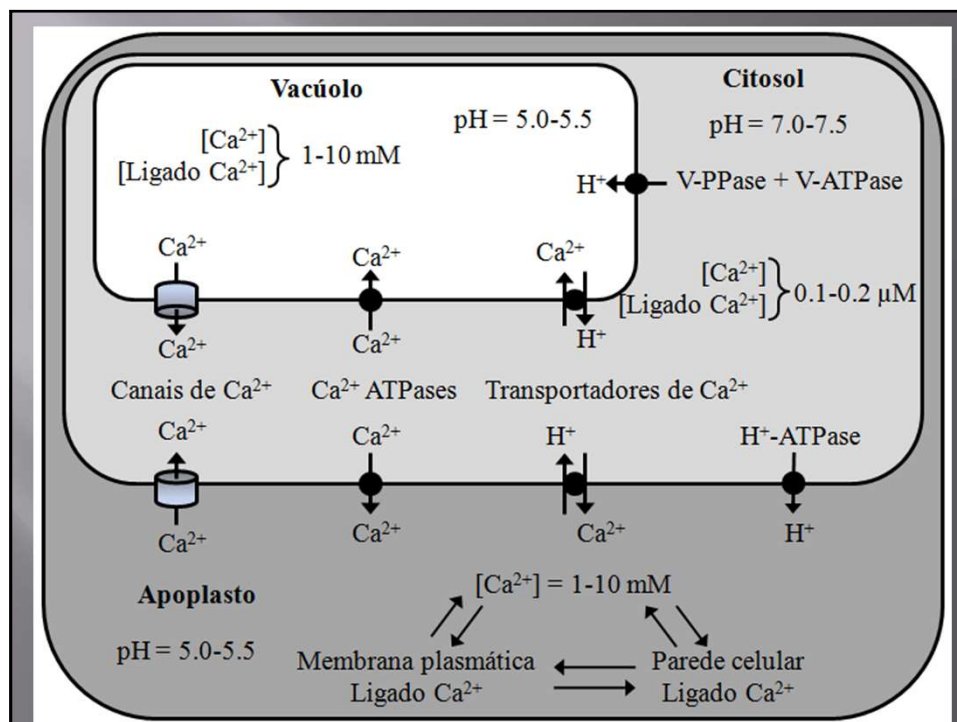
➤ Fruto: Xilema + floema - crescimento - transpiração



Fatores determinantes:

- Concentração no xilema
- Fluxo seiva no xilema
 - Transp. + crescimento
 - Funcionalidade xilema
- CTC parede celular
- Absorção celular

Como é a distribuição celular de Ca^{2+} nos tecidos?



Índice

1. Papel do Ca^{2+} como nutriente
2. Cálcio: solo-planta-fruto-célula
3. Mecanismos reguladores de desordens fisiológicas em frutos
4. Trabalhos de pesquisa

Sintomas de deficiência de Ca^{2+} em frutos



Quais são as causas dos sintomas de deficiência de Ca^{2+} ?

- Trabalhos com hidroponia mostram que baixos níveis de Ca^{2+} na solução nutritiva levam ao aparecimento dos sintomas de deficiência.
- Aplicações foliares são utilizadas para reduzir os riscos de aparecimento de desordens relacionadas a baixos níveis de Ca^{2+} em frutos.
- Baixos níveis de Ca^{2+} no tecido dos frutos estão positivamente correlacionados com o aparecimento de desordens causadas por deficiência de Ca^{2+} .

Quais são as contradições?

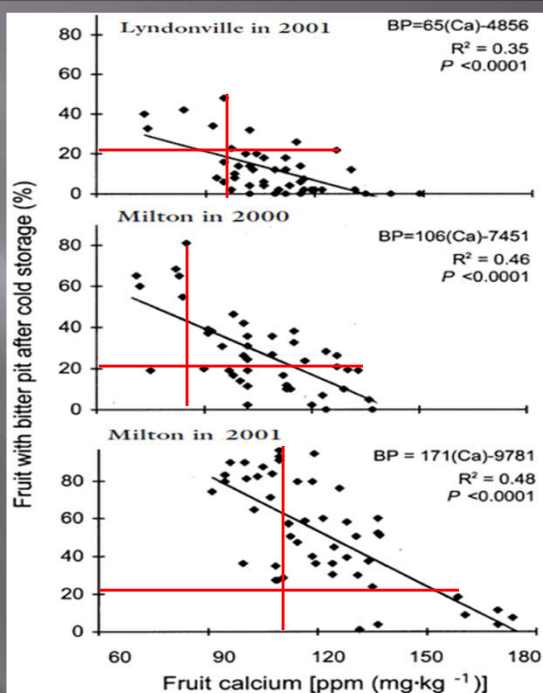
1. Os sintomas de deficiência de Ca^{2+} nem sempre estão correlacionados com o **conteúdo total de Ca^{2+}** nos tecidos.
2. Não existe um nível **de Ca^{2+} total** nos tecidos abaixo ou acima do qual o tecido vai ou não desenvolver os sintomas de deficiência, respectivamente.

Níveis de Ca^{2+} versus incidência de *bitter pit* em maçã

Controlling Bitter Pit in 'Honeycrisp' Apples

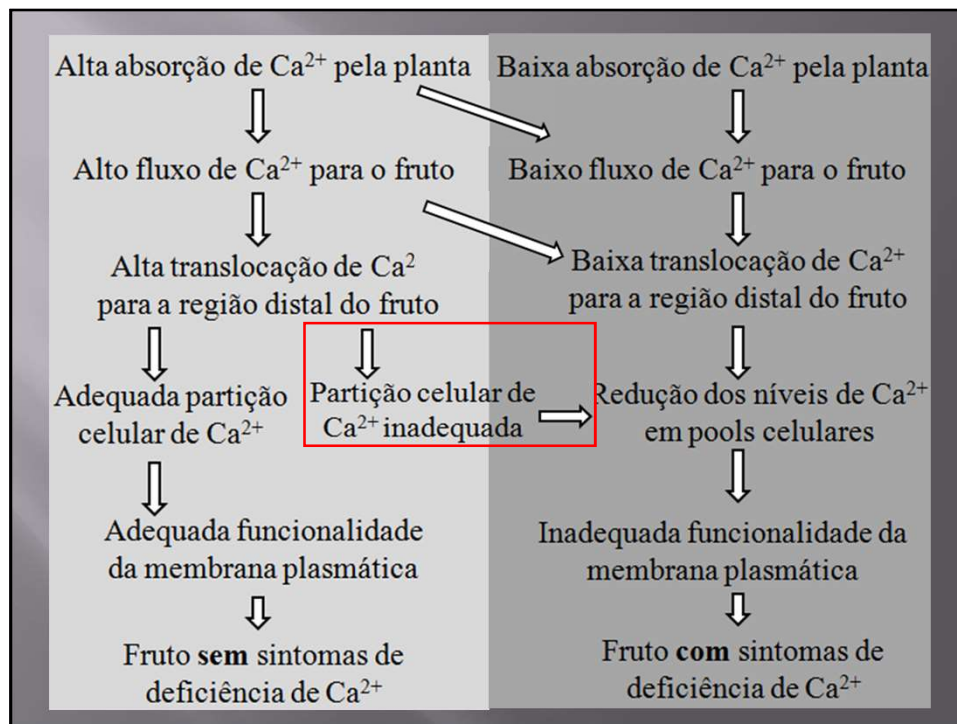
D.A. Rosenberger¹,
J.R. Schupp², S.A. Hoying³,
L. Cheng⁴, and C.B. Watkins⁴
HortTechnology • July–September 2004 14(3)

- Bloco = 1 planta
- 50 frutos/planta, 85 dias à 1,4°C

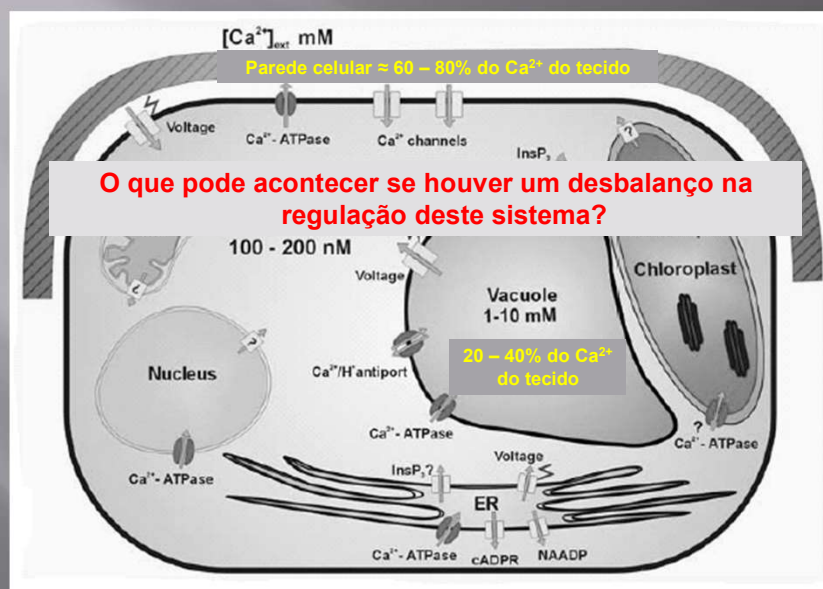


Níveis de Ca^{2+} apoplástico e sintomas de deficiência em frutos

- O primeiro sintoma visual de deficiência é plasmólise celular seguida pela desintegração de membranas e morte celular. Estes sintomas são seguidos pelo aumento da permeabilidade de membranas (extravasamento de solutos).
- Concentração de Ca^{2+} no apoplasto deve ser mantida em determinados níveis ($> 0,1 \text{ mM}$) para manter a estrutura e funcionalidade de membranas celulares.



Distribuição celular de Ca^{2+}



Mecanismos

Os mecanismos reguladores da susceptibilidade dos frutos a desordens fisiológicas relacionadas ao Ca^{2+} determinam:

- 1) Teor total de Ca^{2+} acumulado nos frutos
- 2) Distribuição celular do Ca^{2+}

Índice

1. Papel do Ca^{2+} como nutriente
2. Cálcio: solo-planta-fruto-célula
3. Mecanismos reguladores de desordens fisiológicas em frutos
- 4. Trabalhos de pesquisa**

Journal of Experimental Botany, Vol. 65, No. 1, pp. 235–247, 2014
doi:10.1093/jxb/ert364 Advance Access publication 12 November, 2013
This paper is available online free of all access charges (see http://jxb.oxfordjournals.org/open_access.html for further details)

Journal of
Experimental
Botany
www.jxb.oxfordjournals.org

RESEARCH PAPER

Calcium partitioning and allocation and blossom-end rot development in tomato plants in response to whole-plant and fruit-specific abscisic acid treatments

Sergio Tonetto de Freitas^{1,*}, Andrew J. McElrone², Kenneth A. Shackel³ and Elizabeth J. Mitcham³

¹ Brazilian Agricultural Research Corporation, Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, 56302-970, Brazil

² USDA-ARS, Crops Pathology and Genetics Research Unit, Davis, CA 95616, USA

³ Department of Plant Sciences, University of California, Davis, CA 95616, USA

OBJETIVO

Determinar a partição e alocação de Ca^{2+} em plantas em resposta ao ABA.

Metodologia

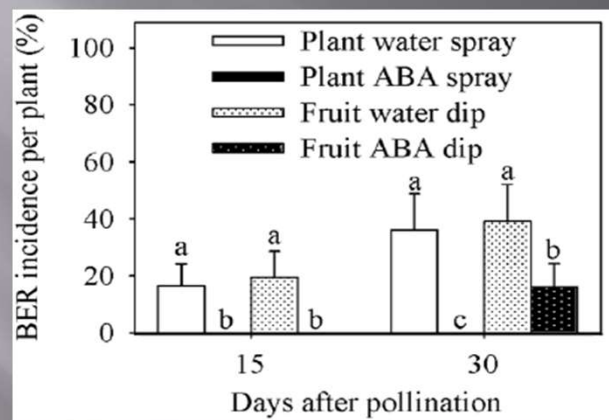
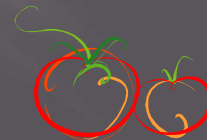
- Tomate cultivar Ace 55 (Vf)
- Plantas cultivadas em potes com 9 L de substrato orgânico
- Flores foram selecionadas e polinizadas manualmente
- A partir da polinização, plantas foram irrigadas com solução nutritiva sem Ca^{2+}

Tratamentos

- 1 – Planta pulverizada com água (control)
- 2 – Planta pulverizada com ABA 500 ppm
- 3 – Fruto imerso em água (control)
- 4 – Fruto imerso em ABA 500 ppm

- Plantas e frutos foram analisados aos 15 e 30 dias após a polinização (DAP).

RESULTADOS



**SENSORES PARA FLUXO DE SEIVA
“HEAT PULSE METHOD”**



Fluxo de seiva no xilema

Anelamento com calor foi usado para bloquear o fluxo de seiva no floema.

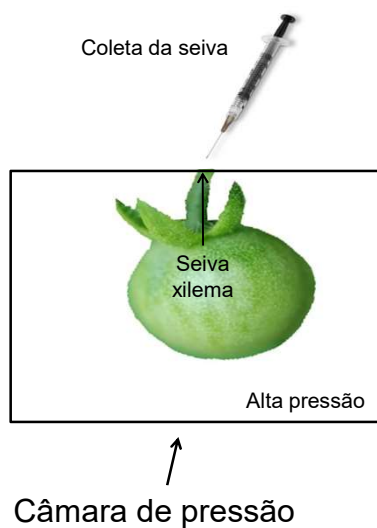
- -0.5 cm termopar
- Aquecedor
- ◆ +0.5 cm termopar

Table 1. Average xylemic sap flow rate in leaf pedicel and fruit peduncle of tomato cultivar Ace 55 (Vf) at 15 and 30 DAP

Treatment	Leaf pedicel ($\mu\text{l g}^{-1}$ leaf FW h^{-1})		Fruit peduncle ($\mu\text{l g}^{-1}$ fruit FW h^{-1})	
	15 DAP	30 DAP	15 DAP	30 DAP
Plant water spray	20.7 a*	20.6 a	0.34 b	0.09 c
Plant ABA spray	4.4 b	4.2 b	1.27 a	0.27 a
Fruit water dip	20.5 a	19.0 a	0.33 b	0.08 c
Fruit ABA dip	20.2 a	18.2 a	0.36 b	0.16 b
CV (%)	19.8	18.2	14.6	5.4

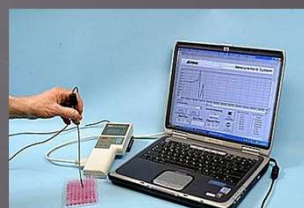
*Means with the same letter between treatments at each evaluation time are not significantly different ($P=0.05$) according to Tukey's test. CV, coefficient of variation.

EXTRAÇÃO DA SEIVA DO XILEMA



CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO NA SEIVA DO XILEMA

Ultra-micro Ca^{2+} selective electrode
(www.shelfscientific.com).



Concentração de Ca^{2+} nos tecidos de folha e fruto: digestão ácida em microondas seguida de análise por "inductively coupled plasma atomic emission spectrometry" (ICP-MS).

Table 3. Calcium concentration in the xylem sap of fruit peduncle and in the apoplast of blossom-end pericarp tissue of the tomato fruit Ace 55 (Vf) cultivar at 15 and 30 DAP

Treatment	Fruit peduncle xylem Ca ²⁺ (mM)		Fruit blossom-end apoplastic Ca ²⁺ (mM)	
	15 DAP	30 DAP	15 DAP	30 DAP
Plant water spray	0.73 b*	1.00 b	0.04 c	0.13 b
Plant ABA spray	0.97 a	1.24 a	0.27 a	0.46 a
Fruit water dip	0.71 b	0.87 b	0.04 c	0.11 b
Fruit ABA dip	0.71 b	0.86 b	0.09 b	0.18 b

Table 4. Calcium concentration observed in the peduncle end and blossom-end tissues of tomato fruit of the Ace 55 (Vf) cultivar at 15 and 30 DAP

Treatment	Fruit peduncle end (mg Ca ²⁺ g DW ⁻¹)		Fruit blossom end (mg Ca ²⁺ g DW ⁻¹)	
	15 DAP	30 DAP	15 DAP	30 DAP
Plant water spray	0.74 b*	0.70 b	0.34 c	0.25 b
Plant ABA spray	1.41 a	1.14 a	0.80 a	0.59 a
Fruit water dip	0.66 b	0.59 b	0.30 c	0.26 b
Fruit ABA dip	0.69 b	0.57 b	0.48 b	0.25 b

CONCLUSÕES

1 – Pulverização de plantas com ABA aumenta o fluxo de Ca²⁺ para o fruto e reduz a susceptibilidade do fruto a PA.

2 – A imersão de frutos em solução contendo ABA reduz a susceptibilidade do fruto a PA.

3 – Ambos os tratamentos com ABA aumentam a concentração de Ca²⁺ na fração solúvel do apoplasto na região distal do fruto.

Dynamic Alternations in Cellular and Molecular Components during Blossom-End Rot Development in Tomatoes Expressing sCAX1, a Constitutively Active $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ Antiporter from Arabidopsis^{1[W][OA]}

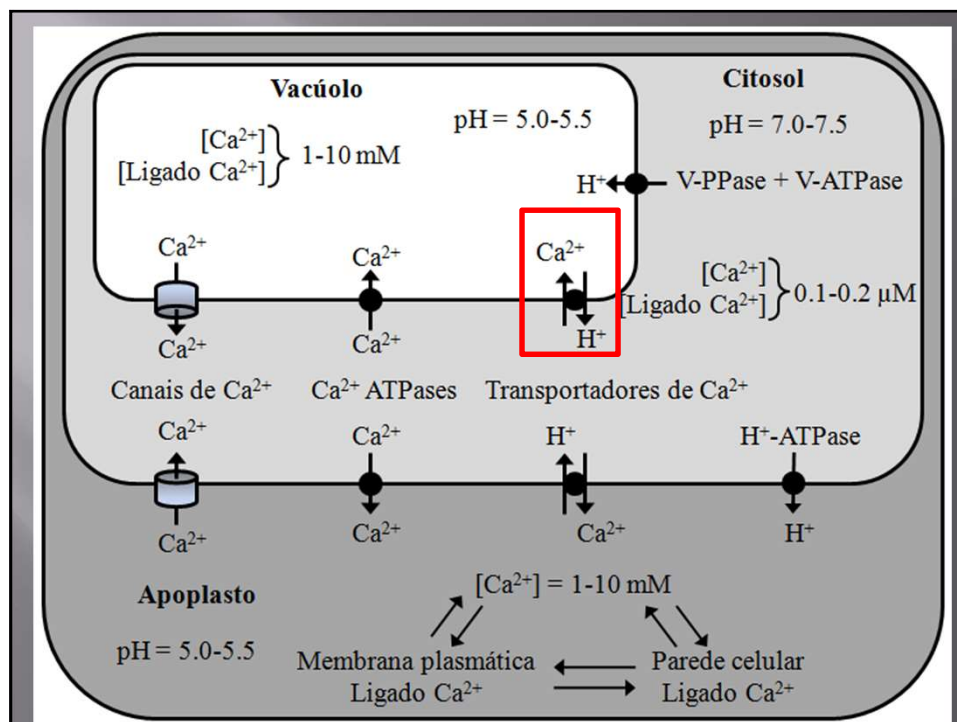
Sergio Tonetto de Freitas, Malkeet Padda, Qingyu Wu, Sunghun Park, and Elizabeth J. Mitcham*

Department of Plant Sciences, University of California, Davis, California 95616 (S.T.d.F., M.P., E.J.M.); and Department of Horticulture, Forestry, and Recreation Resources, Kansas State University, Manhattan, Kansas 66506 (Q.W., S.P.)

Plant Physiology[®], June 2011, Vol. 156, pp. 844–855, www.plantphysiol.org © 2011 American Society of Plant Biologists

Objetivo

Avaliar o efeito da alta expressão de *sCAX1* na distribuição celular de Ca^{2+} e no desenvolvimento dos sintomas de deficiência de Ca^{2+} nos frutos.



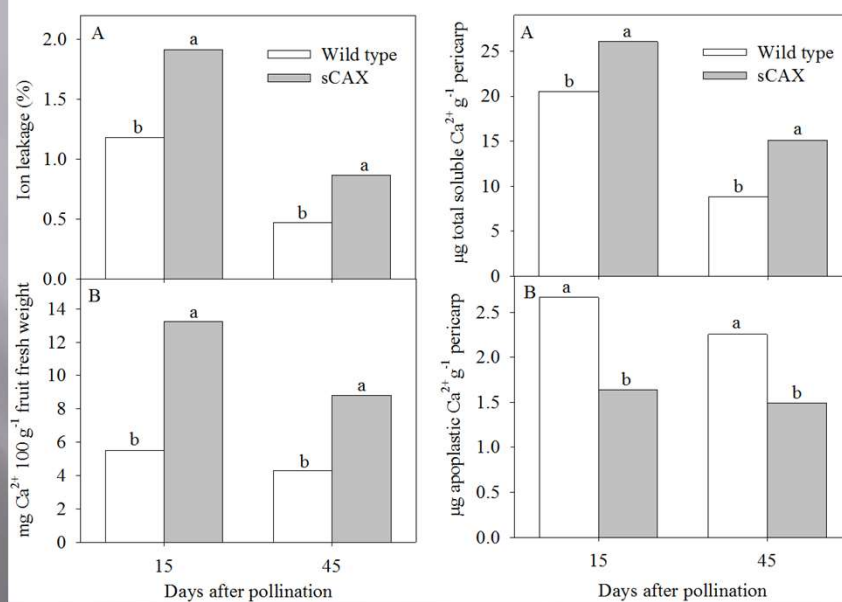
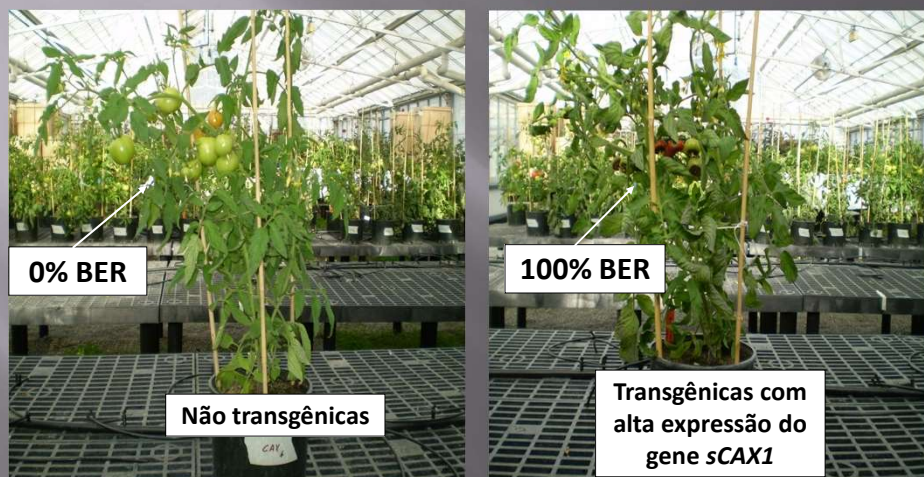
Materiais e Métodos

1. pcdc2A::sCAX1 (Arabidopsis- $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$) e tipo selvagem 'FM9'
2. Cultivo em potes de 9 L com substrato orgânico
3. Irrigação diária com todos os nutrientes essenciais
4. Frutos foram analisados aos 15 e 45 (DAP).

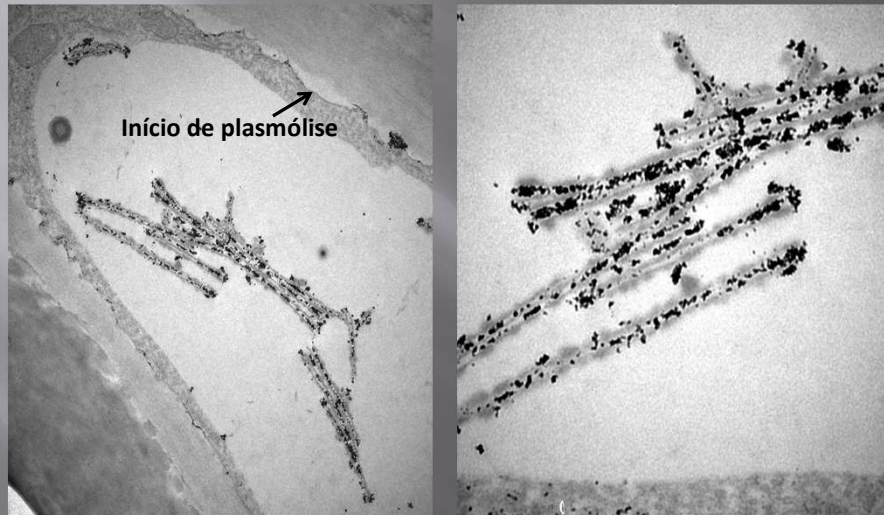
RESULTADOS



Plantas de tomate 'FM9' não transgênicas e transgênicas aos 45 DAP

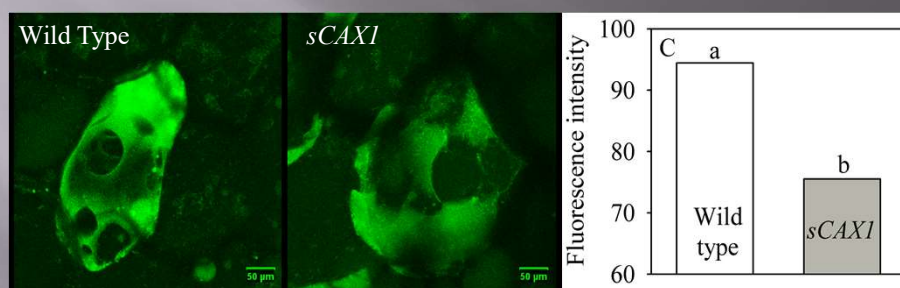


Célula de fruto transgênico aos 15 DAP



* Tecido saudável da região distal do fruto com sintomas visuais de podridão

Projeção 3D de células carregadas com Fluo-4 plus aos 40 DAP



Intensidade da fluorescência = concentração de Ca no citosol. Médias obtidas de 15 células.

Conclusões

- sCAX1 resulta em 100% incidência de podridão apical (PA)
- sCAX1 aumenta a concentração total de Ca^{2+} nos frutos
- sCAX1 causa uma distribuição anormal de Ca^{2+} a nível celular, reduzindo os níveis de Ca^{2+} solúvel no apoplasto e citosol
- sCAX1 aumenta a permeabilidade de membranas

the plant journal

SEB
Society for
Experimental Biology

The Plant Journal (2012) 71, 824–835

doi: 10.1111/j.1365-3113X.2012.05034.x

Role of pectin methylesterases in cellular calcium distribution and blossom-end rot development in tomato fruit

Sergio T. de Freitas¹, Avtar K. Handa², Qingyu Wu³, Sunghun Park³ and Elizabeth J. Mitcham^{1,*}

¹Department of Plant Sciences, University of California, Davis, CA 95616, USA,

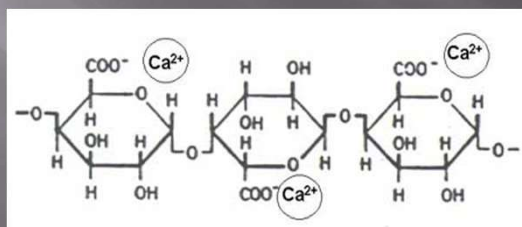
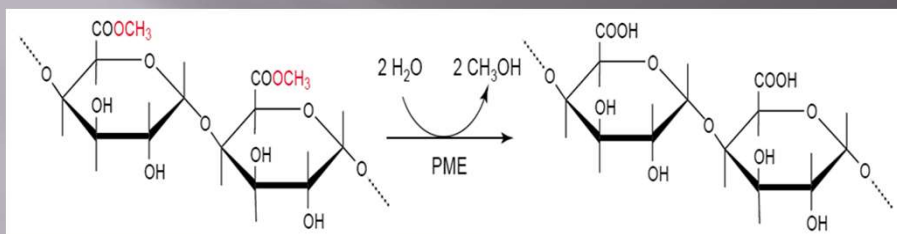
²Department of Horticulture and Landscape Architecture, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA, and

³Department of Horticulture, Forestry & Recreation Resources, Kansas State University, Manhattan, KS 66506, USA

Objetivos

Avaliar o efeito da expressão de *PME* e grau de esterificação de pectinas sobre a susceptibilidade dos frutos ao desenvolvimento de podridão apical (PA).

Pectina e Ca^{2+}



MATERIAIS E MÉTODOS

Tomate tipo selvagem cultivar Rutgers

RNAi: PME tipo I

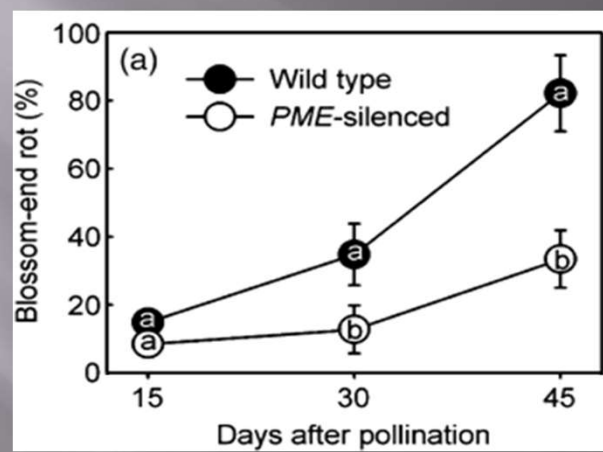
Plantas cultivadas em potes de 9 L contendo perlita

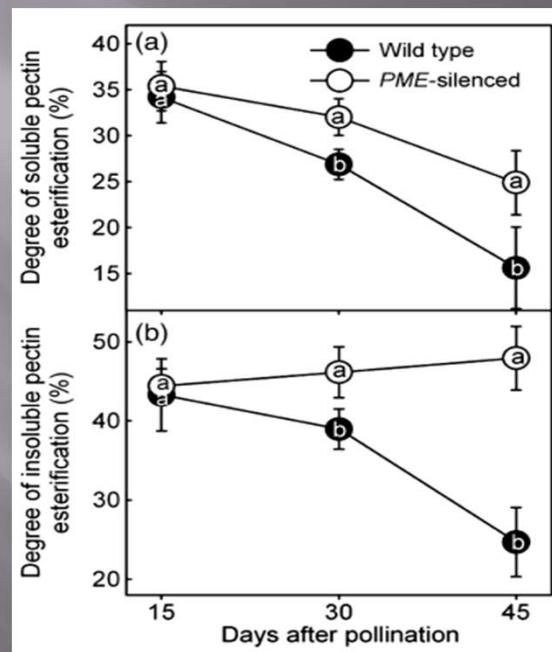
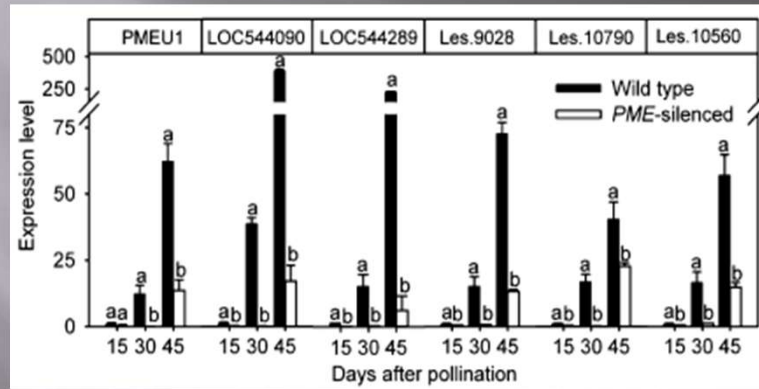
Solução com todos nutrientes essenciais até polinização

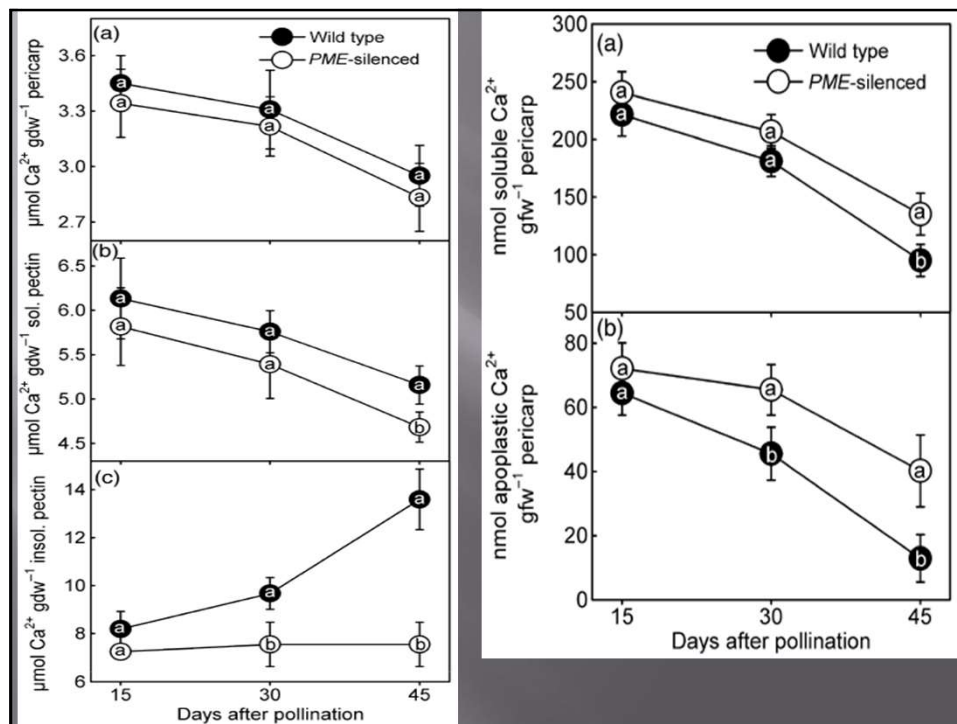
Solução nutritiva sem Ca^{2+} após polinização

Análises: 15, 30 e 45 DAP

RESULTADOS







Conclusões

Alta expressão de *PMEs* e grau de deesterificação de pectinas aumentam os níveis de Ca^{2+} ligado a parede celular e a susceptibilidade dos frutos ao desenvolvimento de podridão apical (PA) em condições de baixos níveis de Ca^{2+} no solo.

Transcriptome Approach to Understand the Potential Mechanisms Inhibiting or Triggering Blossom-End Rot Development in Tomato Fruit in Response to Plant Growth Regulators

Sergio Tonetto de Freitas^{1,4} · Federico Martinelli² · Bihong Feng³ · Nicholas F. Reitz¹ · Elizabeth J. Mitcham¹

Objetivos

Identificar potenciais genes inibidores e indutores de podridão apical (PA) em tomate em resposta a reguladores de crescimento.

Metodologia

- Tomate cultivar Ace 55 (Vf)
- Plantas cultivadas em potes com 9 L de substrato orgânico
- Flores foram selecionadas e polinizadas manualmente
- A partir da polinização, plantas foram irrigadas com solução nutritiva sem Ca^{2+}

Tratamentos

- 1 – Planta pulverizada com água (controle)
- 2 – Planta pulverizada com GA_{4+7} 300 ppm
- 3 – Planta pulverizada com Apogee 300 ppm
- 4 – Planta pulverizada com ABA 500 ppm

- Frutos foram analisados aos 12, 26 e 40 DAP
- Análise de transcrição: GeneChip® Tomato Genome Array

RESULTADOS

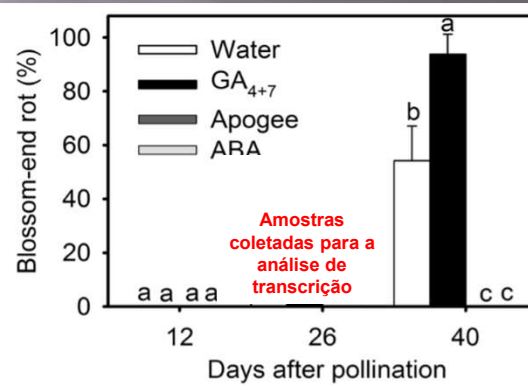
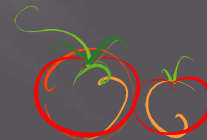


Fig. 1 Blossom-end rot incidence in 'Ace 55 (Vf)' tomato plants sprayed weekly with water (control), GA₄₊₇, Apogee (GA-biosynthesis inhibitor prohexadione-Ca), or ABA. Mean values with *different letters* at each evaluation time are significantly different according to Tukey's test ($p=0.05$). Data shown, mean \pm SD

Análise de transcrição

Frutos aos 26 DAP:

- Alta susceptibilidade a podridão apical (PA) = Fruto tratado com GA
- Média susceptibilidade a PA = Fruto tratado com água (linha base)
- Baixa susceptibilidade a PA = Fruto tratado com ABA e Apogee



~9200 genes

Genes potencialmente inibidores de PA

Critério:

1. Expressão DEVE ser - correlacionada com a incidência de PA
2. Expressão DEVE ser maior em Apogee e/ou ABA
3. Expressão DEVE de menor em GA₄₊₇.

Genes potencialmente indutores de PA

Critério:

1. Expressão DEVE ser + correlacionada com a incidência de PA
2. Expressão DEVE ser menor em Apogee e/ou ABA
3. Expressão DEVE de maior em GA₄₊₇.

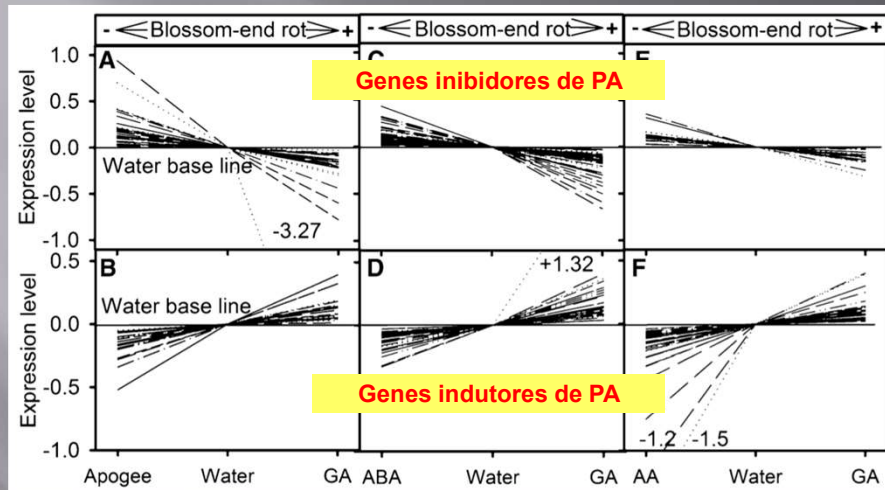
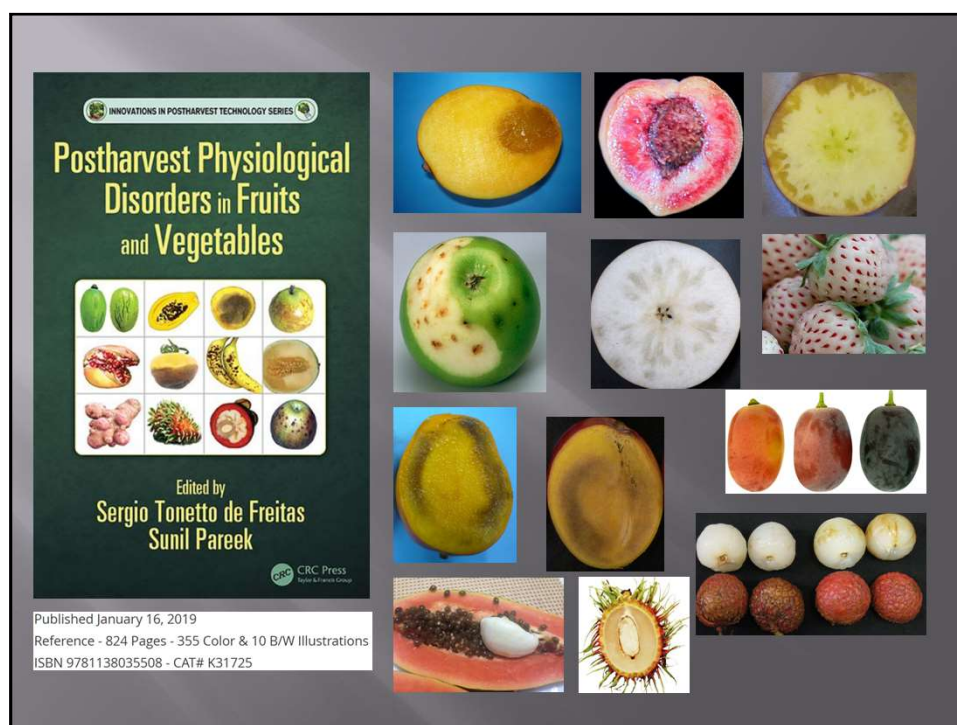
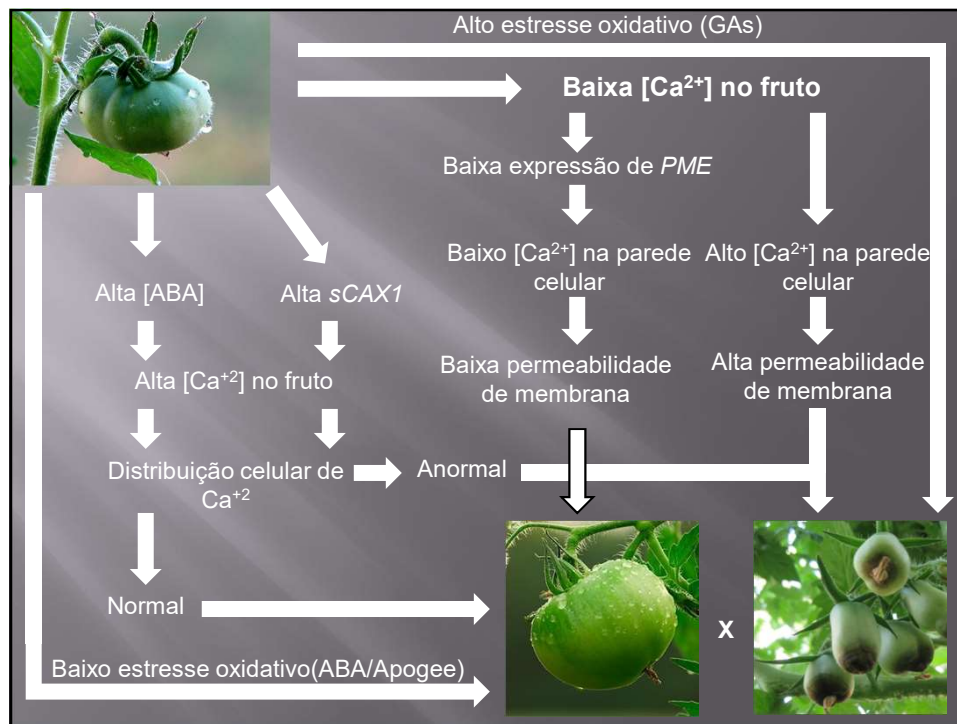


Figure. Gene expression changes in 'Ace 55 (Vf)' tomato fruit with low (Apogee and ABA), medium (water), or high (GA_{4+7}) susceptibility to BER at 26 DAP. Water treatment was used as the base level for gene expression analysis. Genes presented have expression levels $\geq \pm 0.1$ fold different between Apogee, ABA, or GA_{4+7} and water treatment at p value ≤ 0.05

Conclusões

- A grande maioria dos genes **inibidores** de PA codificam para proteínas com funções importantes na resistência ao estresse oxidativo e compostos tóxicos.
- A grande maioria dos genes **indutores** de PA codificam para proteínas com funções no aumento dos níveis de estresse oxidativo e morte celular.



Obrigado!!!

Embrapa Semiárido
Email: sergio.freitas@embrapa.br
Telefone: (87)-3866-3711