

EXPRESSÃO DE GENES DA ROTA METABÓLICA DE FENILPROPANÓIDES EM MORANGOS TRATADOS COM ÁGUA DE XISTO E SUBMETIDOS A ESTRESSE SALINO

LABONDE, Julia¹; BOROWSKI, Joyce M.²; GALLI, Vanessa³; BUSS, Julieti H.⁴; MESSIAS, Rafael S.⁵

¹Universidade Federal de Pelotas/Ciências Biológicas – julialabonde@hotmail.com; ²Universidade Federal de Pelotas/Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial – joyceborowski@gmail.com; ³Universidade Federal do Rio Grande do Sul/PPGBCM – vane.galli@yahoo.com.br; ⁴Universidade Federal de Pelotas/Ciências Biológicas – jujuhbus@hotmail.com; ⁵Embrapa Clima Temperado

1 INTRODUÇÃO

Dentre as pequenas frutas, a espécie de maior expressão econômica atualmente é o morango. Um dos benefícios do seu consumo é conferido aos flavonóides e antocianinas - substâncias antioxidantes derivadas da rota de fenilpropanóides as quais são atribuídos diversos efeitos biológicos como: ação anti-inflamatória, antialérgica e anticancerígena (YUNES; CALIXTO, 2001).

Neste contexto, diferentes estratégias visam aumentar o conteúdo destes compostos em frutas. Estudos mostram que condições moderadas de estresses abióticos podem induzir o aumento no conteúdo de compostos antioxidantes. Isto ocorre porque estresses moderados não acarretariam danos à planta, apenas resultariam na produção de compostos relacionados ao metabolismo de defesa, os quais apresentam capacidade antioxidante quando ingeridos na dieta (LICHTENTHALER, 2004).

A água de xisto é um dos subprodutos do processamento do xisto, rocha formada pela deposição de sedimento a mais de 250 milhões de anos. A diversidade de compostos orgânicos e inorgânicos em sua matriz pressupõe um potencial uso deste na produção de fertilizantes foliares. Messias (2011) demonstrou que a aplicação foliar de água de xisto estimula a síntese de metabólitos secundários na cultura do milho. Este estudo mostrou que a aplicação foliar nesta cultura induziu um aumento significativo nos níveis dos aminoácidos prolina e alanina, sabidamente envolvidos na tolerância a estresses abióticos. Estes resultados, associados ao fato de apresentar em sua constituição os minerais Na e Cl, sugerem que a água de xisto possa auxiliar no desenvolvimento de plantas quando submetidas a condições de estresse moderado, proporcionando um aumento de compostos com potencial antioxidante e, portanto, da qualidade nutricional dos frutos.

Desta forma, objetivou-se avaliar a expressão de genes relacionados à rota metabólica de fenilpropanóides (fenilalanina amonio liase - FAL; antocianidina sintase - ANS e UDP flavonóide glicosil transferase -UFGT) juntamente com a enzima álcool acetil transferase - AAT (responsável pela produção de aromas) em frutos de morango submetidos a tratamentos com água de xisto e estresse salino.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

2.1 Tratamentos aplicados aos morangos

Morangos da cultivar Camarosa foram cultivados em casa de vegetação na Sede da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, tendo recebido igual adubação de base e fertirrigação durante seu desenvolvimento. Os tratamentos utilizados neste trabalho estão demonstrados na Tab. 1.

Tabela 1 - Tratamentos aplicados em morangos com intuito de analisar a expressão de genes relacionados ao estresse abiótico.

Tratamentos	Descrição
T1	Água destilada
T2	SS 40mmol
T3	AX D1
T4	AX D2

AX: água de xisto; SS: solução salina; D1: dose 1; D2: dose 2

Frutos maduros foram coletados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido, sendo mantidos em *ultrafreezer* a temperatura de -80 °C até o momento das análises

2.2 Métodos utilizados

Todos os materiais foram previamente tratados com inibidor de RNase (RNase Away – Invitrogen™). As amostras congeladas foram maceradas com auxílio de Nitrogênio líquido. A extração de RNA total foi realizada pelo método CTAB com modificações (MESSIAS et al., 2010) e a concentração foi calculada utilizando a técnica de fluorometria (QuBit-RNA BR, Invitrogen™). A partir de 75 ng de RNA total, foi realizada a digestão com 1U DNase e 1x DNase I Reaction Buffer, e posteriormente a síntese de cDNA com a enzima MMLV, conforme instruções do fabricante (Invitrogen™). Após serem sintetizados, os cDNAs foram amplificados por PCR em tempo real, utilizando *primers* específicos para os genes que codificam para as enzimas fenilalanina amonio liase (FAL), antocianidina sintase (ANS), UDP flavonóide glicosil transferase (UFGT), álcool acetil transferase (AAT) juntamente com o *primer* 18S para normalização da expressão. Estes *primers* foram construídos com o auxílio do programa Vector NT110 (Invitrogen™) a partir de sequências de *Fragaria x ananassa* obtidas no banco NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A eficiência destes *primers* foi previamente avaliada mostrando-se superior a 90%. As condições da reação de PCR foram: volume final de 20 µL contendo 3µL cDNA, 10µL de Platinum Sybr green UDG (Invitrogen™), e 2-5 pmol de cada *primer*. A amplificação foi padronizada em um termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems) utilizando as seguintes condições: 5' a 95°C seguidos por 40 ciclos de 1' a 95°C, 1' a 50°C, 1' a 72°C e extensão final de 7' a 72°C. Condições da curva de dissociação: 50°C por 2', 95°C por 10', seguido por 45 ciclos de 15" a 95°C e 1' a 60°C. O gráfico de expressão relativa foi gerado segundo Pfaffl (2001).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Posteriormente à avaliação da expressão gênica relativa através de PCR em tempo real foi possível obter um gráfico de expressão dos genes a partir dos dados gerados pela curva de amplificação. A Fig. 1 apresenta os diferentes níveis de expressão dos genes ANS, AAT, FAL e UFGT para os tratamentos propostos.

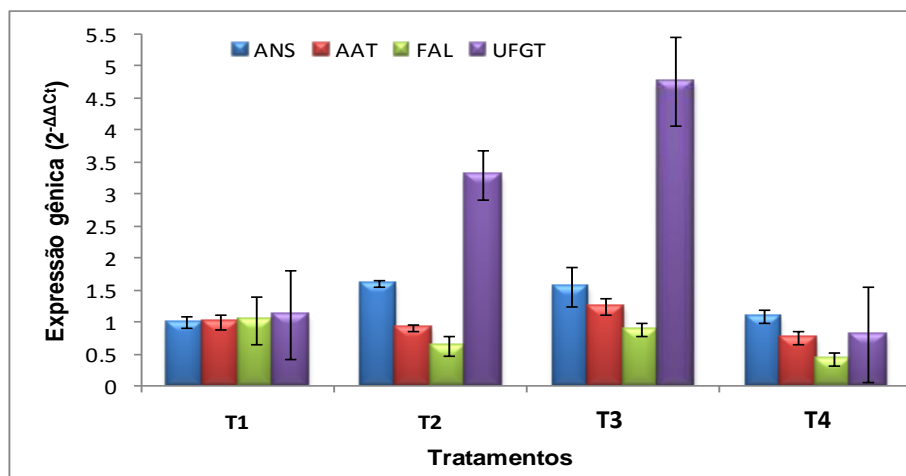


Figura 1 - Diferentes níveis de expressão dos genes AAT, ANS, FAL e UFGT para os tratamentos propostos.

Os resultados mostram que houve um aumento na transcrição do gene ANS e UFGT nos tratamentos T2 e T3 comparados ao controle, sendo o UFGT o gene que obteve o maior nível de expressão nestes tratamentos. Em relação aos genes FAL e AAT, houve uma diminuição dos níveis de transcritos para os tratamentos T2 e T4 em relação ao controle, sendo AAT ligeiramente aumentado somente no tratamento T3.

O gene FAL codifica a fenilalanina amônio-liase, enzima chave na rota metabólica de fenilpropanóides. Esta enzima, a partir da reação de desaminação do aminoácido L-fenilalanina forma o ácido cinâmico, precursor de flavonóis, ácidos fenólicos, isoflavonóis, antocianinas entre outros fenóis.

Neste estudo, este gene teve sua expressão ligeiramente diminuída em T2 e T4. Porém, foi observado um aumento na expressão de ANS e UFGT, indicando que os mesmos foram induzidos pela cascata de reações iniciada pela enzima FAL. Desta forma, podemos dizer que em algum momento esta enzima foi induzida, visto que não existe outro braço da rota metabólica onde ANS e UFGT atuem que não a iniciada pela FAL. Esta aparente ausência de alteração na expressão pode ter ocorrido baseado no momento de coleta dos frutos pois eles já se encontravam maduros e o pico de expressão já poderia ter ocorrido, visto a mesma ser de início de rota. Outra explicação é o fato de a coleta ter sido realizada 24h após a aplicação dos tratamentos na qual também já poderia ter ocorrido o pico de expressão deste gene e, portanto, não ter sido detectado diferenças na sua expressão.

A ANS (antocianidina-sintase) e UFGT (UDP flavonóide glicosil transferase) tiveram sua expressão aumentada nos tratamentos T2 e T3. Os valores correspondentes a esse aumento são, aproximadamente, 0.5 e 0.5 (ANS) respectivamente e 2.5 e 3.75 (UFGT) vezes mais em relação ao controle. Este aumento para os tratamentos T2 e T3 sugerem um maior acúmulo de

antocianidinas, antocianinas e flavonóides, substâncias as quais são atribuídos diversos efeitos benéficos à saúde quando ingeridas na dieta. O gene UFGT atua em duas etapas distintas da rota metabólica, podendo levar à síntese de antocianinas e/ou flavonóides. Os resultados em relação às diferenças de expressão entre ANS e UFGT (enzimas que atuam na etapa anterior a síntese de antocianinas e antocianinas/flavonóides, respectivamente) indicam que poderia estar havendo direcionamento para o braço de síntese de flavonóides, visto que os níveis de expressão do UFGT foram maiores.

A expressão do gene AAT foi ligeiramente aumentada no tratamento T3, dose 1 de água de xisto. Este gene codifica a enzima álcool acetil transferase, que auxilia na esterificação de alcoóis sendo responsável pela produção do aroma nos morangos (EL SHARKAWY et al., 2005). Desta forma, o tratamento T3 contribuiu para uma melhor qualidade sensorial dos frutos.

4 CONCLUSÃO

A dose 1 de água de xisto (T3) apresentou a expressão dos genes avaliados similar à expressão dos genes dos morangos tratados com solução salina (T2), sugerindo que parte do seu efeito sobre o aumento do metabolismo secundário ocorre por atuar como tal, ou seja, como um causador de estresse moderado. Desta forma sugere-se a primeira dose de água de xisto como a mais adequada para aplicação em morangos da cultivar Camarosa, com foco no acúmulo de metabólitos funcionais de interesse a alimentação.

5 REFERÊNCIAS

EL-SHARKAWY, I.; MANRIQUEZ, D.; FLORES, F. B.; REGAD, F.; BOUZAYEN, M.; LATCHE, A.; PECH, J. C. Functional characterization of a melon alcohol acyltransferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity, **Plant Molecular Biology**, v. 59, p. 345-362, 2005.

LICHTENTHALER, H. K. El estrés y la medida del estrés en plantas. In: **La Ecofisiología Vegetal – Una ciencia de síntesis**. Madrid: Thomson, 2004. p.59-111.

MESSIAS, R. **Respostas bioquímico-fisiológicas e agronômicas em alface e milho em função da aplicação de água de xisto**. 2011. 152f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial)-Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

PFAFFL, M. W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, 29, 2003-2007.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001.