UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Instituto de Biologia

Ciências Biológicas - Bacharelado

Trabalho Acadêmico

Expressão de genes relacionados à síntese de fenilpropanoides, aromas e degradação da parede celular em morangos tratados com água de xisto e submetidos a estresse salino

Julia Labonde

Pelotas, 2013

JULIA LABONDE

EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À SÍNTESE DE FENILPROPANOIDES, AROMAS E DEGRADAÇÃO DA PAREDE CELULAR EM MORANGOS TRATADOS COM ÁGUA DE XISTO E SUBMETIDOS A ESTRESSE SALINO

Trabalho Acadêmico apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas

Orientador: Dr. Rafael da Silva Messias
Co-orientador: Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

L122e Labonde, Julia

Expressão de genes relacionados à síntese de fenilpropanoides, aromas e degradação da parede celular em morangos tratados com água de xisto e submetidos a estresse salino / Julia Labonde. – 69f. : il. color. – Monografia (Conclusão de curso). Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2013. – Orientador: Rafael da Silva Messias. Co – orientador: Cesar Valmor Rombaldi.

1. Biologia. 2. Fragaria x ananassa. 3. Biofortificação. 4. Estresse moderado. 5. Compostos funcionais. I. Messias, Rafael da Silva. II. Rombaldi, Cesar Valmor. III.Título.

CDD: 634.25

Banca examinadora:

Dr.Rafael da Silva Messias (Orientador)

Prof. Dr. Fabio Clasen Chaves

Me. Vanessa Galli

Me. Joyce Moura Borowski

Agradecimentos

Primeiramente agradeço aos meus pais: Glade Almir Labonde (*in memorian*) e Jorge Boemeke por todo apoio emocional, psicológico e motivacional durante estes cinco anos de aprendizado. E a minha mãe, “Tuti” Knapp, aquela que soube administrar com maestria minhas fases entre a escrita do TCC, aulas da faculdade, aulas de inglês e estágio. Dentro do espectro familiar prolongo os agradecimentos a minha irmã e grande amiga Maria Luyza, que apesar de fisicamente parecer-se muito comigo, tem personalidade bastante distinta, o que nos proporciona experiências engrandecedoras.

Muito obrigada aos colegas do laboratório de Biologia Molecular, Joyce Borowski, Julieti Buss, Vanessa Galli e demais estagiários e bolsistas, que, apesar de pertencerem a outros projetos, trabalharam junto comigo todos esses dias. Muito obrigada ao pessoal da equipe de campo, Ellen Perin, Esmael Souza, Alexssandra Campos, Felipe Klasen e Adilson Harter por me auxiliarem na sofrida manutenção do experimento.

Agradeço ao meu orientador, Rafael da Silva Messias, por todos os ensinamentos durante todo este período.

Agradeço também a Embrapa Clima Temperado e ao Projeto Xisto Agrícola por terem disponibilizado minha bolsa de iniciação científica e demais recursos para a manutenção e execução deste projeto.

Não posso deixar de agradecer às colegas de quarto, Carolina Ferreira, Dana Pestano e Dayene Ribeiro em época de Casa do Estudante, motivadoras do meu crescimento intelectual, mas principalmente social, devido às nossas conversas de cunho democrático.

Além de todas essas pessoas a quem devo agradecimentos especiais, agradeço fortemente ao meu melhor amigo e namorado Juliano Stefan por aturar meu comportamento birrento e as loucuras da minha cabeça, mas principalmente pela paciência e amor dedicados a mim nesses quase quatro anos juntos.

Resumo

LABONDE, Julia. **Expressão de genes relacionados à síntese de fenilpropanoides, aromas e degradação da parede celular em morangos tratados com água de xisto e submetidos a estresse salino.** 2013. 69f. Trabalho de Conclusão de Curso - Graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Dentre as pequenas frutas, a espécie de maior expressão econômica hoje é o morango. Atualmente, para produtores e programas de melhoramento vegetal, o incremento da produtividade é o maior interesse; porém, o que mais atrai os consumidores são as características que promovem qualidade ao fruto, sendo elas: sabor, aroma, textura, cor, compostos nutricionais e funcionais. Neste contexto, estratégias que visam incrementar estas características vêm sendo analisadas. Desta forma, este trabalho buscou avaliar o efeito de duas estratégias de biofortificação baseadas na indução de estresse moderado por meio da aplicação individual ou em conjunto de cloreto de sódio (NaCl) e água de xisto (AX) a fim de verificar se estas estratégias são capazes de melhorar aspectos de qualidade na cultura do morangueiro. O trabalho constou de dois experimentos, sendo que o primeiro avaliou o efeito individual da aplicação de AX e NaCl, e o segundo avaliou a aplicação conjunta destas duas soluções. O desenho experimental foi constituído por blocos randomizados com quatro repetições, com dez plantas cada repetição. A técnica de PCR em tempo real foi utilizada para analisar a expressão de genes relacionados a aspectos de qualidade (genes da rota de fenilpropanoides - *FAL*, *UFGT*, *FLS* e *ANS* - a qual está relacionada à produção de compostos funcionais e cor, gene relacionado à produção de aromas – *AAT*, e genes que atuam na degradação da parede celular – *PME* e *PG*, os quais estão relacionados com a textura), sendo as análises realizadas com frutos maduros. No experimento 1, morangos submetidos à aplicação individual de AX (menor dose) mostraram um incremento nos níveis de transcritos dos genes da rota de fenilpropanoides, indicando um possível aumento dos compostos funcionais. Porém, nos demais tratamentos (NaCl e maior dose de água de xisto), os outros genes avaliados obtiveram um decréscimo nos níveis de transcritos comparados ao controle ou não apresentaram valores estatisticamente significativos. Em relação ao experimento 2, os morangos apresentaram aumento nos níveis de transcritos comparados ao controle tanto para os genes da rota metabólica de fenilpropanoides, quanto para os genes relacionados à rota de produção de aromas e degradação da parede celular. Sendo assim, pode-se dizer que a aplicação combinada destas duas soluções possivelmente promoveu uma ativação do metabolismo de defesa da planta, maior produção de aroma, e também uma modificação da parede celular em direção à rápida aceleração do amadurecimento dos frutos. Desta forma, o uso combinado de ambas as soluções possivelmente causa um aumento considerável das características de qualidade para esta cultura.

Palavras-chave: *Fragaria* x *ananassa*; biofortificação; estresse moderado; compostos funcionais.

Abstract

LABONDE, Julia. **Gene expression related to the synthesis of phenylpropanoids, aromas and cell wall degradation in strawberries treated with shale water and subjected to salt stress**. 2013. 69f. Completion of course work - Undergraduate Biological Sciences - Bachelor. Federal University of Pelotas, Pelotas.

Among small fruits, the species of greatest economic expression today is the strawberry. Currently, for producers and plant breeding programs, increasing productivity is the biggest concern, but what attracts consumers are more features that promote quality of the fruit, which are: taste, aroma, texture, color, and nutritional and functional compounds. In this context, strategies to enhance these characteristics have been analyzed. Thus, this study evaluated the effect of two biofortification strategies based on induction mild stress by applying alone or together of sodium chloride (NaCl) and shale water (SW) to verify whether these strategies are able to improve aspects of quality in strawberry culture. The study consisted of two experiments, the first of which evaluated the effect of applying individual SW and NaCl, and the second evaluated the combined application of these two solutions. The experimental design consisted of randomized blocks with four replicates of ten plants each repetition. The technique of real-time PCR was used to analyze the gene expression related to quality aspects (genes of phenylpropanoids pathway – *FAL*, *UFGT*, *FLS* and *ANS* - which is related to the production of functional compounds and color - gene related production of flavorings - *AAT*, and genes that act in cell wall degradation - *PME* and *PG*, which are related to the texture), and the analyzes performed with ripe fruit. In experiment 1, strawberries submitted to the individual application SW (lowest dose) showed an increase in transcript levels of genes of phenylpropanoids pathway, indicating a possible increase of functional compounds. However, in the other treatments (NaCl and higher dose of shale water), the other genes evaluated had a decrease in transcript levels compared to control or no showed statistically significant values. Regarding the experiment 2, strawberries showed an increase in transcript levels compared to control for both the metabolic pathway genes of phenylpropanoids, as for genes related to the production of flavorings patchway and cell wall degradation. Thus, it can be said that a combination of these two solutions possibly promoted activation of the plant defense metabolism, increased production of aroma, and also a modification of cell wall towards rapid acceleration of the ripening of fruits. Thus, the combined use of both solutions possibly cause a considerable increase of the quality characteristics for this culture.

Keywords: *Fragaria* x *ananassa*; biofortification; mild stress; functional compounds.

Sumário

Projeto de pesquisa.....8
1 Introdução 8
1.1 Objetivo 9

2 Material e métodos.....10
2.1 Desenho experimental.....10

3 Cronograma 13

4 Orçamento.....15
4.1 Material permanente.....15
4.2 Material de consumo 16

Referências 19

Relatório do trabalho de campo 21

Revisão da Literatura 23
1 Cultura do morangueiro.....23

2 Estresse salino 25

3 Qualidade de frutos de morango 28
3.1 Componentes da parede celular vegetal 28
3.2 Compostos aromáticos.....29
3.3 Compostos do metabolismo de defesa das plantas com função na manutenção da saúde humana.....31

4 Técnicas de biofortificação 34
4.1 Água de xisto.....34

5 Expressão gênica 36

Artigo: Revista Horticultura Brasileira 37
Estresse salino moderado associado à aplicação de água de xisto induz a expressão de genes relacionados à qualidade dos frutos de morangueiro 37

Introdução 38

Material e métodos 41

Resultados e discussão.....44

Referências 53

Anexos 57

Conclusões.....62

Referências 63

Projeto de pesquisa

1 Introdução

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) é uma planta herbácea, rasteira e perene da família Rosaceae, propagada por via vegetativa, através de estolhos. A parte comestível é um pseudofruto, originário do receptáculo floral o qual se torna carnoso e suculento. Em geral, a cultura para produção de frutos é renovada anualmente. O morango é consumido nas mais variadas regiões do mundo, sendo, entre as pequenas frutas, a espécie de maior expressão econômica (OLIVEIRA; NINO; SCIVITTARO, 2005). No Brasil, a cultura do morangueiro é uma importante atividade de famílias de pequenos e médios agricultores. No estado do Rio Grande do Sul, embora cultivada há muitos anos, só a partir da década de 90 a cultura tomou maiores proporções, passando a ter importância econômica e social e ocupando um grande contingente de mão - de - obra familiar, advindo de produtores estabelecidos em minifúndios (EMBRAPA, 2005).

Embora o incremento da produtividade seja o maior interesse de produtores e de programas de melhoramento vegetal, a qualidade nutricional e funcional de frutas tornou-se uma exigência do mercado consumidor. Em relação ao morango, um dos benefícios do seu consumo é geralmente conferido pelos flavonoides, uma vez que a esta classe de substâncias antioxidantes são atribuídos diversos efeitos biológicos que incluem, entre outros: ação anti-inflamatória, anti-hemorrágica, anti-alérgica e anti-cancerígena (YUNES; CALIXTO, 2001).

Neste contexto, diferentes estratégias têm sido avaliadas visando aumentar o conteúdo destes compostos em frutas. Embora condições rigorosas de estresses abióticos afetem drasticamente a fisiologia do crescimento de plantas, estudos mostram que condições moderadas destes estresses poderiam ser utilizadas para induzir o aumento no conteúdo de compostos antioxidantes (LICHTENTHALER, 2004). Isto ocorre porque estresses moderados não acarretariam danos à planta,

porém resultariam na produção de compostos relacionados ao metabolismo de defesa contra estas alterações nos frutos, incluindo compostos de metabolismo secundário, onde muitos destes compostos apresentam esta capacidade antioxidante quando ingeridos. Outra consequência seria uma resistência aumentada à possíveis adversidades que ocorrem no ambiente, uma vez que seu metabolismo já estaria direcionado à produção de metabólitos de defesa (LICHTENTHALER, 2004).

A água de xisto (AX) é um dos subprodutos do processamento industrial do xisto (rocha formada pela deposição sedimentar de algas e animais marinhos a mais de 250 milhões de anos). A diversidade de compostos orgânicos e inorgânicos em sua matriz pressupõe um potencial uso deste subproduto líquido como matéria-prima para a produção de fertilizantes foliares. Estudos demonstram que a aplicação foliar de AX estimula a síntese de metabólitos secundários na cultura do milho (MESSIAS, 2011, p.11). Estes resultados, associados ao fato de sua composição ser diversa em minerais e elementos traço, além de compostos orgânicos, sugere que esta pode apresentar função bioestimulante, auxiliando no desenvolvimento de plantas quando submetidas a condições de estresse, por meio de um mecanismo de indução de estresse moderado. Este efeito proporcionaria aumento do acúmulo de compostos com potencial antioxidantes e, portanto, da qualidade funcional dos frutos (MESSIAS, 2011, p.11).

1.1 Objetivo

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar a expressão de genes relacionados à síntese de metabólitos secundários de defesa, da rota de fenilpropanoides, em frutos de morango submetidos a tratamentos com AX e/ou a diferentes níveis de estresse salino (SS), com o intuito de verificar se estes causam um estresse moderado às plantas, aumentando, desta forma, a qualidade funcional dos frutos.

2 Material e métodos

2.1 Desenho experimental

Mudas de morango comerciais (cv. Camarosa) serão transplantadas para vasos de 9L contendo como substrato uma mistura de solo e vermiculita. A irrigação será realizada com água destilada por gotejamento de forma a manter o nível ideal de umidade no solo constante. O fornecimento de nutrientes será realizado semanalmente via fertirrigação de acordo com as recomendações técnicas para a cultura (CQFS, 2004). O desenho experimental será constituído por blocos randomizados, com quatro repetições e dez plantas por repetição.

A SS será aplicada diretamente ao solo, e a AX aplicada via pulverizações foliares, semanalmente. Os tratamentos propostos estão representados na tab.1.

Tabela 1 – Tratamentos propostos para aplicação em morangos com a finalidade de analisar a expressão de genes relacionados ao estresse abiótico

Tratamentos	Descrição
T1	Água destilada
T2	SS D1
T3	SS D2
T4	AX D1
T5	AX D2
T6	AX D1 + SS D1
T7	AX D1 + SS D2
T8	AX D2 + SS D1
T9	AX D2 + SS D2

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

Os morangos coletados serão diretamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em sacos plásticos em ultrafreezer a -80ºC.

Para cada tratamento, seis genes da rota metabólica de fenilpropanoides serão avaliados em relação à sua expressão gênica, sendo eles: *FAL* (codifica a enzima fenilalanina amônio liase), *ANS* (codifica a enzima antocianidina sintase), *UFGT* (codifica a enzima UDP flavonoide glicosil transferase), *FLS* (codifica a enzima flavonoide sintase), *FLS* (codifica a enzima leucoantocianidina redutase), *AAT* (codifica a enzima álcool acetil transferase) (ALMEIDA et al., 2007).

Será realizada a maceração das amostras previamente congeladas. O RNA será extraído pelo método do CTAB com modificações (MESSIAS et al., 2010), sendo sua concentração avaliada por fluorometria (QuBit-RNA BR, Invitrogen™), respectivamente. O cDNA será sintetizado utilizando a enzima MMLV, conforme fabricante (Invitrogen™). Posteriormente à reação de RT-PCR, as amostras serão amplificadas por PCR em tempo real, utilizando *primers* específicos para os genes denominados acima.

Os *primers* serão construídos com o auxílio do programa Vector NTI10 (Invitrogen™) a partir de sequências de *Fragaria* x *ananassa* obtidas no banco NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). A sequência dos *primers,* que serão utilizados neste trabalho, está apresentada na tabela abaixo (tab.2).

Tabela 2 – Sequência dos *primers* que serão utilizados para avaliar a expressão dos genes relacionados à síntese de fenilpropanoides e produção de aromas

Primers	Forward	Reverse
ANS	CACCTTCATCCTCCACAACATGGTT	AATGCTCTTCTACTTGCCGTTGCTT
FAL	CGAAAAACTGCAGAAGCAGTTGACA	TCAAGTTCTCCTCCAAATGCCTCAA
UFGT	CAAGCAGTCCAACAGCTCAATC	GAAAACATACCCCTCCGGCAC
FLS	AACCACGACATTTCCAACGAGGC	GCCCTACCATTGATTTCAGCGAC
AAT	CAAGTCAACGTTTTCGATTCTGGAA	TGATATTTTCACGACACCCTCGAAA

A eficiência destes *primers* será previamente avaliada, e serão utilizados somente os que mostrarem-se superior a 90%.

2.2 Análise de Dados

Os dados do PCR em tempo real serão analisados pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (PFAFFL, 2001), e empregado o teste F na análise de variância e o teste de Tukey na comparação de médias de tratamento, ambos ao nível de 5% de significância, utilizando o software REST (PFAFFL et al., 2002).

3 Cronograma

As atividades executadas de fevereiro de 2011 a novembro de 2012 estão apresentadas na tab. 3.

Tabela 3 – Cronograma das atividades iniciadas em fevereiro de 2011 e com previsão de encerramento em novembro de 2012

Atividades	2011												2012							
	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Transplante das mudas		X																		
Aplicação dos tratamentos					X	X	X	X												
1º coleta						X														
2º coleta							X													
3º coleta								X												
Extração de RNA									X	X	X	X	X	X						
Síntese de cDNA									X	X	X	X	X	X	X					
Padronização dos *primers* para qRT-PCR		X	X	X								X	X	X	X					
qRT-PCR com amostras da 1º coleta														X						
qRT-PCR com amostras da 2º coleta															X					
qRT-PCR com amostras da 3º coleta																X				
Análise dos dados														X	X	X	X	X		
Redação da monografia															X	X	X	X	X	
Defesa da monografia																				X

4 Orçamento

4.1 Material permanente

A relação de preços dos materiais permanentes está listada na tab. 4.

Tabela 4 – Relação de preços e materiais permanentes utilizados para realização do experimento

Quantidade	Descrição	Valor un. R$	Valor total R$
1	Ultrafreezer -50 a -86ºC*	60.000,00	60.000,00
1	Espectrofotômetro*	6.185,00	6.185,00
1	Máquina de gelo*	14.141,00	14.141,00
1	Freezer -20ºC*	14.250,00	14.250,00
1	Sistema de PCR em tempo real*	190.000,00	190.000,00
1	Autoclave de mesa*	1.920,00	1.920,00
1	Banho Maria digital*	800,00	800,00
1	Balança de precisão*	3.580,00	3.580,00
1	Capela de fluxo laminar*	15.625,00	15.625,00
1	Cuba eletroforese*	711,00	711,00
1	Fonte eletroforese*	1567,00	1.567,00
1	Deionizador 100L/h*	1368,00	1.368,00
1	Agitador vórtex*	687,00	687,00
1	Purificador água*	8.262,00	8.262,00
1	Termociclador 96 poços*	25.000,00	25.000,00
1	Fluorômetro*	430,00	430,00
1	Fotodocumentador*	60.000,00	60.000,00
1	Notebook*	1.400,00	1.400,00

1	Capela Workstation*	4.600,00	4.600,00
Total			410.526,00

(*) Contrapartida.

4.2 Material de consumo

A relação de preços do material de consumo está listada na tab. 5.

Tabela 5 – Relação de preços e material de consumo utilizados para realização do experimento

Quantidade	Descrição	Valor un. R$	Valor total R$
1	Bandeja mudas 200 céls. *	5,95	5,95
45	Vasos plásticos 6L.*	3,87	174,15
1	Pulverizador manual*	18,50	18,50
1	Grau + pistilo*	150,00	150,00
1	Micropipeta 0,1 - 2µL*	330,00	330,00
1	Micropipeta 0,5 - 10µL*	330,00	330,00
1	Micropipeta 2 - 20µL*	330,00	330,00
1	Micropipeta 10 - 100µL*	330,00	330,00
1	Micropipeta 20 - 200µL*	330,00	330,00
1	Micropipeta 100 - 1000µL*	330,00	330,00
8	Caixa armaz. Eppendorf 100 tubos*	11,80	94,40
1	Espátula caneleta*	3,30	3,30
1	Espátula 3mm*	9,23	9,23
1	Becker 50ml*	7,60	7,60
1	Proveta 100ml*	4,24	4,24
8	Caixa papelão 100 epp.*	4,56	36,48
2	Rack para 80 epp.*	6,67	13,34
1	Cubeta 7mL vidro*	30,77	30,77
1	Vermiculita 150L	57,00	57,00
360	Etiquetas adesivas	15,00	15,00
100	Sacos plásticos	18,00	1800,00
1	N_2 líquido 50L	6200,00	6200,00

3	Pact. Epp. (1000un.)	50,00	150,00
3	Ponteira 10µL (1000un.)	38,00	114,00
3	Ponteira 200µL (1000un.)	38,00	114,00
3	Ponteira 1000µL (1000un.)	38,00	114,00
3	Ponteira filtro 10µL (96un.)	20,00	60,00
3	Ponteira filtro 20µL (96un.)	20,00	60,00
3	Ponteira filtro 200µL (96un.)	20,00	60,00
3	Ponteira filtro 1000µL (96un.)	20,00	60,00
2	Kit RT – PCR	1130,00	2260,00
2	Kit extração RNA	1251,00	2502,00
1	RNAse 10mg.mL^{-1} 5 mL	205,00	205,00
1	dNTP 100mM 1000mL	320,00	320,00
1	Taq DNA polimer. 2500U	500,00	500,00
1	DTT 5g	250,00	250,00
1	EDTA 250g	160,00	160,00
1	SDS 100g	120,00	120,00
1	Tampão TBE 10x	75,00	75,00
1	TRIReagent TRIZOL 100mL	470,00	470,00
1	Agarose 100g	310,00	310,00
1	Kit PCR 100 reações	350,00	350,00
2	SYBERGreen/Rox 1000 reações	1800,00	3600,00
20	Álcool comercial	3,60	72,00
2	Caixa papel toalha	62,00	124,00
15	Fita adesiva autoclave	5,87	88,05
10	Luvas sem talco 100un.	32,43	324,30
1	Máscara proteção 20un.	42,80	42,80
1	Microtubos 1000un.	62,70	62,70
1	Parafilm	78,90	78,90
1	Borracha vedar placa 10un.	112,50	112,50
1	Filme adesivo microplaca	179,10	179,10
1	Placa PCR 96 poços 50un.	199,00	199,00
Total			23,737,31

(*) Contrapartida.

O valor total do projeto será de R$ 434.263,31, sendo que o material permanente já consta no laboratório e o material de consumo será subsidiado pelo Projeto Xisto Agrícola e Embrapa Clima Temperado.

Referências

ALMEIDA, J. R. M.; D'AMICO, E.;PREUSS, A.; CARBONE, F.; RIC DE VOS, C.H.; DEIML, B.; MOURGUES, F.; PERROTTA, G.; FISCHER, T. C.; BOVY, A.; MARTENS, S.; ROSATI, C. Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria* x *ananassa*). **Archives of Biochemistry and Biophysics.** v.465, p.61-71, 2007.

CQFS – Comissão de Química e Fertilidade do Solo- RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10.ed. Porto Alegre: SBCS - Núcleo Regional Sul/UFRGS, 2004. 400 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Sistema de produção do morango, [2005]. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/SistemaProducaoMorango/index.htm>. Acesso em: 28 ago. 2012.

LICHTENTHALER, Hartmut, K. El estrés y la medida delestrésen plantas. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; SÁNCHEZ, A. **La Ecofisiología Vegetal - Una ciencia de síntesis**. Madrid: Thomson, 2004. p.59-111.

MESSIAS, Rafael da Silva et al. **Metodologias de extração e avaliação semi-quantitativa da expressão de genes de metabolismo secundário do milho (*Zeamays* L.).**Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 25p.

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.

OLIVEIRA, R. P.; NINO, A. F. P.; SCIVITTARO, W. B. Mudas certificadas de morangueiro: maior produção e melhor qualidade da fruta**. A Lavoura**, v.108, n. 655, p.35-38, dez. 2005.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.9, p.2002-2007, maio 2001.

PFAFFL, M. W; Horgan, W. G.; Dempfle, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**. v.30, n.9, p.1-10, march 2002.

YUNES, Rosendo. A.; CALIXTO, João. B. **Plantas Medicinais**: sob a ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó: Argos, 2001. 523p.

Relatório do trabalho de campo

A realização deste trabalho foi possível devido a uma parceria entre Embrapa Clima Temperado e a Petrobrás, através do Projeto Xisto Agrícola, o qual disponibilizou recursos financeiros para o desenvolvimento e execução do trabalho.

O projeto foi realizado no período de maio de 2011 a novembro de 2012 na Sede da Embrapa Clima Temperado, Rodovia BR 392, km 78 - Pelotas, RS - Brasil - 96010-971. As mudas de morango foram transplantadas para vasos de 9L em maio de 2011, permanecendo em casa de vegetação até o momento da última coleta dos frutos. Foram realizadas aplicações de soluções que podem causar estresse moderado com um possível potencial bioestimulante, sendo elas água de xisto - AX e solução salina contendo NaCl - SS (aplicações individuais ou conjuntas, em diferentes concentrações). A manutenção do experimento (poda das folhas, irrigação, aplicação dos tratamentos, etc) foi feita pela equipe de campo ligada ao Projeto Xisto Agrícola, sendo a parte laboratorial de minha responsabilidade. No total, três coletas foram realizadas, que ocorreram entre novembro e dezembro de 2011. Os frutos coletados foram congelados em nitrogênio líquido e levados ao laboratório para as devidas análises de expressão gênica. O trabalho em laboratório iniciou aproximadamente logo após os frutos terem sido coletados pela primeira vez e terminou apenas em novembro de 2012.

Este experimento foi preliminar e diversas mudanças ocorreram durante o processo de execução. Após a primeira coleta foi observado que a dose mais concentrada de SS causou efeitos desfavoráveis às plantas (distúrbios morfológicos), de modo que todos os tratamentos que continham essas doses foram excluídos do trabalho. Decorrido estas alterações e mais alguns ajustes, outras maneiras mais eficientes de realizar o trabalho foram propostas, sendo assim, a partir deste momento o delineamento do experimento foi alterado, porém, o foco do trabalho permaneceu o mesmo. Foi decidido separar o trabalho em dois experimentos, onde a aplicação individual de AX e de SS foi mantida, caracterizando

o experimento 1. Para o experimento 2, as mesmas plantas do primeiro experimento foram utilizadas, porém, com as seguintes alterações: o tratamento controle, além de água destilada, recebeu duas aplicações de SS, caracterizando um estresse pontual; o tratamento que já recebia SS permaneceu recebendo esta solução, totalizando 15 aplicações, caracterizando um estresse prolongado; e os dois tratamentos que vinham recebendo aplicações de AX (totalizando 18 aplicações), receberam também duas aplicações de SS. O experimento 1 objetivou verificar se a aplicação dessas duas soluções causavam, de forma semelhante, um estresse moderado às plantas, e o experimento 2 buscou analisar se a aplicação em conjunto dessas duas soluções poderia ocasionar um aumento das características que promovem qualidade ao fruto. Com as análises de apenas duas coletas (1° e 3°) foi possível obter resultados interessantes, sendo assim, não foram realizadas mais análises.

As pesquisas com AX e a cultura do morango são ainda recentes e mais análises são necessárias para que possamos ter respostas concretas sobre o efeito da utilização deste produto sobre as plantas de morangueiro, de forma que este trabalho servirá de referência para trabalhos futuros.

Revisão da Literatura

1 Cultura do morangueiro

O morango é um pseudofruto de clima temperado que tem apelo peculiar devido à sua coloração vermelha brilhante, odor típico, textura macia e sabor levemente acidificado. As atuais plantas cultivadas com finalidade de consumo de seu pseudofruto são resultado de um sucessivo esforço de melhoramento genético e cruzamento entre espécies do gênero *Fragaria* sp. (DARROW, 1966).

O grande e crescente interesse pela implantação desta cultura é devido ao amplo conhecimento e aceitação da fruta (termo utilizado popularmente) pelo consumidor, pela diversidade de opções de comercialização e, principalmente, pela elevada rentabilidade da cultura. Dentre as pequenas frutas, o morango é a espécie de maior expressão econômica (OLIVEIRA; NINO; SCIVITTARO, 2005). No Brasil, só a partir de 1960 a produção desta pequena fruta começou a se expandir com a criação da cultivar Campinas desenvolvida pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC). Desde então, na busca por plantas resistentes a doenças e frutos com maior durabilidade, a cultura passou por diversos processos de melhoramento genético, sendo lançadas novas cultivares e novas variedades, que passaram a ser plantadas em diversos locais do país como Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul (maiores produtores brasileiros atualmente), Santa Catarina, Goiás, dentre outros (EMBRAPA, 2005).

Atualmente, as cultivares mais utilizadas são Santa Clara, Burlkey e Dover, sendo estas destinadas à industrialização, e Tangi, Campinas, Osogrande, Tudla, Selva e Seascape, destinadas ao consumo ‘in natura’. Camarosa e Aromas são cultivares que possuem as duas finalidades (EMBRAPA, 2005). Na região sul do Rio Grande do Sul, a Camarosa é a cultivar que apresenta o melhor desempenho. Este comportamento é confirmado por resultados apresentados por Duarte Filho, Antunes e Pádua (2003) que relatam que a mesma vem sendo cultivada na maioria dos

países produtores de morango, pois possui boa adaptação a diversos tipos de ambiente e clima. Os principais produtores de morango *in natura* do Rio Grande do Sul encontram-se no Vale do Rio Caí, Caxias do Sul e Farroupilha. Em Pelotas e municípios vizinhos a produção é mais direcionada a morangos para indústria (EMBRAPA, 2005).

A cultura do morangueiro é uma importante atividade de famílias de pequenos e médios agricultores. No estado do Rio Grande do Sul, embora cultivada há muitos anos, só a partir da década de 1990 a cultura tomou maiores proporções, passando a ter importância econômica e social e ocupando um grande contingente de mão - de - obra familiar, advindo de produtores estabelecidos em minifúndios (EMBRAPA, 2005).

2 Estresse salino

As plantas muitas vezes enfrentam condições adversas como estresses abióticos devido a sua natureza séssil, o que pode acarretar negativamente uma série de mudanças morfológicas, fisiológicas, moleculares e bioquímicas (MAHAJAN; TUTEJA 2006). Tais estresses são causados pelas mudanças nas condições climáticas, tais como: temperaturas extremas, baixa disponibilidade de água, inundação e alta salinidade (SHINOZAKI; YAMAGUCHI - SHINOZAKI; SEIKI, 2003). O setor agrícola, responsável pela produção mundial de alimentos, muitas vezes é fortemente afetado devido a estes fatores (EMBRAPA, 2012), pois tais mudanças podem limitar o crescimento dos vegetais, diminuir sua taxa de reprodução e produtividade (MAHAJAN; TUTEJA 2006).

Dados apresentados por KRIEG (1993) mostram perdas de até 87% devido a fatores bióticos e abióticos em relação à média obtida nas lavouras dos EUA, sendo mais significativas as perdas por estresses abióticos para a maioria das culturas, representando um valor aproximado de quatro vezes mais em relação a estresses bióticos.

A salinidade é um dos principais estresses ambientais que afetam o desenvolvimento das plantas, pois tende a inibir o crescimento vegetal por efeito osmótico e restringir a disponibilidade de água, podendo levar a modificações morfológicas e fisiológicas. O nível de salinidade que influencia o crescimento das plantas é dependente de alguns fatores, dentre eles: espécie utilizada, cultivar, estádio de maturação e composição salina do meio (SHANNON, 1997).

Com a percepção do estresse pela planta, ocorrem respostas complexas onde há a ativação das vias de transdução de sinal que manifestam mudanças moleculares, aumentando as funções de proteção celular e a regulação de outros genes envolvidos. Grande parte desta mudança biológica se dá devido ao processo de regulação na expressão de genes envolvidos nessas estratégias de resposta às

alterações ambientais podendo promover aumento na tolerância à desidratação nos vegetais (BRAY, 1993; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997).

Jia et al, (2009) submeteram *Malus zumi*, planta da família Rosaceae, à condições de estresse salino, e analisaram o perfil de expressão gênica utilizando a técnica de *microarray*. Desta forma, 388 genes foram identificados em resposta às alterações, onde 249 tiveram seus níveis de transcritos aumentados e 139 tiveram seus níveis de transcritos diminuídos.

Kim et al. (2005) relataram que, sob estresse salino, plantas de arroz mostraram um aumento na regulação dos genes codificantes da enzima ribulose - 1,5-bifosfato-carboxilase / oxigenase (RuBisCO) e de suas subunidades de ligação, indicando que a exposição ao sal promove ativação destas proteínas. Kim et al. (2005) relataram também que as proteínas relacionadas ao Ciclo de Calvin são diferencialmente expressas sob este tipo de estresse, o qual provoca redução na condutância estomática, levando a uma condição de anaerobiose pela redução do efluxo de CO_2. Esta condição desencadeia a fotorrespiração e o metabolismo do glicolato, o qual dá origem a espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo.

Heuer e Nadler (1998) mostraram que plantas de batata sob estresse salino perdem clorofilas, acumulam prolina e sofrem efeitos fisiológicos negativos, apresentando um aumento na atividade de algumas enzimas antioxidantes.

Em espécies de trigo foram identificadas várias proteínas transportadoras de membrana que sofrem mudanças na sua regulação gênica quando submetidas a estresse salino. Um aumento na expressão do gene codificante da proteína *ABC-transporter* foi identificado sob este estresse, sendo esta alteração de grande importância na planta, pois permite um aumento na tolerância ao estresse abiótico por esta se tratar de uma proteína transmembrana responsável pelo transporte de metabólitos secundários nas células (YAZAKY, 2006, p. 1183).

Em frutas, estes compostos originados do metabolismo secundário, além de auxiliarem o vegetal contra danos provenientes do estresse ambiental e contribuírem com a cor, também ajudam a estabilizar os radicais livres presentes em nosso organismo quando ingeridos na dieta, agindo desta forma como antioxidantes. Sendo assim, as chances de iniciação e progressão de distúrbios degenerativos causados pelo ataque destes radicais aos componentes celulares por espécies de oxigênio ativo (estresse oxidativo) são reduzidas (SUN; LIU, 2006).

Embora estresses severos causem efeitos desfavoráveis à fisiologia de desenvolvimento vegetal, uma alteração suave e moderada pode proporcionar um efeito contrário, podendo estimular o metabolismo celular e o crescimento vegetativo de forma a não prejudicar a planta, permitindo também um maior acúmulo de compostos do metabolismo secundário (LICHTENTHALER, 2004).

Turhan; Gulen; Eris (2008) avaliaram o efeito do estresse salino moderado sobre a atividade de enzimas oxidativas (auxiliam na remoção de espécies reativas de oxigênio) como catalase, ascorbato peroxidase e lutationa redutase em três cultivares morango, sendo elas Camarosa, Tioga e Chandler. Os resultados apresentaram um acréscimo acentuado na atividade da ascorbato peroxidase nas cultivares Tioga e Camarosa, sendo esta última, a cultivar que apresentou maior atividade também da glutationa redutase. A atividade das enzimas estudadas permaneceu inalterada em Chandler, sendo assim, Camarosa e Tioga indicaram maior potencial de tolerar o estresse salino.

Em um trabalho realizado por Cornish (1992) foi analisado o rendimento de frutos e conteúdo de sólidos solúveis totais em tomates submetidos a aumento da condutividade elétrica da solução nutritiva (utilizando íons de NaCl e KCl). As três cultivares utilizadas apresentaram respostas semelhantes ao aumento da salinidade de 1.5 para 9.0 mS/cm, sendo a cultivar Flora Dode a apresentar o maior incremento no conteúdo de sólidos solúveis totais (1,26 Brix) com pouco ou nenhum efeito sobre a produtividade.

Desta forma, o conhecimento das diversas alterações ocorridas na expressão dos genes pode nos revelar o mecanismo desenvolvido pelas plantas para tolerar os estresses abióticos (SHINOZAKI; YAMAGUCHI - SHINOZAKI; SEIKI, 2003), suportar os estresses moderados sem acarretar danos, e também desvendar se há um incremento na qualidade nutricional e funcional dos frutos que foram submetidos a estas alterações (CAMARA; WILLADINO, 2005).

3 Qualidade de frutos de morango

Os morangos são economicamente e comercialmente importantes devido ao seu amplo consumo ao redor do mundo. É por isso que estão entre os frutos mais estudados do ponto de vista agronômico. Os principais parâmetros que levam à alta qualidade destes frutos são: textura - a qual está diretamente relacionada com a rigidez e flexibilidade oferecida pelos compostos da parede celular; aroma e sabor - o qual se relaciona aos compostos voláteis, açúcares e ácidos produzidos durante o amadurecimento; cor - originada principalmente pelo pigmento antocianina; e a presença de compostos funcionais - provenientes do metabolismo de defesa dessas plantas (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

3.1 Componentes da parede celular vegetal

As células vegetais possuem uma parede celular constituída por diferentes polissacarídeos com função estrutural que promovem rigidez e flexibilidade. Estes polissacarídeos se reúnem de forma organizada em uma matriz formada por hemiceluloses (polissacarídeos flexíveis), microfibrilas de celulose (relativamente rígidos), pectina (formam uma fase de gel hidratada) e uma pequena quantidade de proteína estrutural (TAIZ; ZAIGER, 2004).

No morango, o desenvolvimento do fruto é caracterizado pelo aumento do tamanho, mudança de coloração do verde para o branco e posteriormente para o vermelho, aumento da síntese de compostos voláteis e redução na firmeza da polpa. Esta baixa firmeza nos tecidos facilita o ataque de patógenos, limita a vida de prateleira e o transporte e armazenamento dos frutos, constituindo um grande impedimento para a comercialização (POMBO et al., 2009). A ação de enzimas atuantes nas paredes celulares de frutos, no decorrer da maturação, promove o amolecimento dos tecidos vegetais devido à despolimerização e desagregação destes polissacarídeos. Este processo se dá devido a uma série de fatores

genéticos e ambientais (SALENTIJN et al., 2003) e afeta diretamente a qualidade do fruto.

Este processo de amolecimento tem sido associado à ação de enzimas hidrolíticas envolvidas na solubilização dos componentes da parede celular tais como expansinas (*EXP*), pectina metilesterases (*PME*), poligalacturonases (*PG*), pectatoliases (*PL*), β-galactosidases (*β-GAL*), dentre outras. No entanto, o mecanismo exato envolvendo estas proteínas e a redução da firmeza dos frutos não é completamente compreendido (SALENTIJN et al., 2003).

No processo de amadurecimento, frutos em geral expressam altos níveis do gene codificador da enzima *PME*, que tem a função de hidrolisar os ésteres metílicos das pectinas liberando H_2O e metanol. Esta hidrólise torna a pectina mais suscetível às hidrólises subsequentes, que podem ocorrer com o auxílio da enzima *PG*. Tal enzima realiza a despolimerização do pectato através da quebra dos ácidos galacturônicos da pectina (TAIZ; ZAIGER, 2004).

Através de estudos de expressão gênica utilizando a técnicade PCR em tempo real, Severo et al. (2011) demonstraram que em diferentes estágios do amadurecimento do morango e consequente amolecimento da polpa, muitos transcritos de genes relacionados a esse processo puderam ser quantificados. Nos diferentes estágios de amadurecimento, diferentes enzimas atuam na parede celular vegetal promovendo a desagregação dos polissacarídeos. O momento de atuação das enzimas envolvidas neste processo também pôde ser identificado de acordo com os picos de transcrição, que demonstraram um processo coordenado entre as enzimas: expansinas (não são proteínas enzimáticas, mas são conhecidas por atuarem no início da maturação), pectatoliases, pectina metiltransferases, poligalacturonases e por fim β-galactosidades, respectivamente.

3.2 Compostos aromáticos

O morango é uma das frutas frescas mais apreciadas especialmente pela sua aparência atraente combinada a sabor e aroma, sendo este último um dos principais atributos de qualidade dos frutos e fator relevante no momento da compra destes pelo consumidor. Ele corresponde a um conjunto de percepções tidas pelo olfato, o qual é estimulado pelos componentes voláteis que caracterizam o aroma:

ésteres, aldeídos, terpenos, cetonas, lactonas, dentre outros (LUCCHETTA 2007, p.35).

Na maioria das vezes os compostos voláteis encontram-se em misturas complexas combinados a açúcares e ácidos formados durante o amadurecimento dos frutos (BUTTERY; LING, 1993). A junção destes compostos em diferentes proporções, ou até mesmo a predominância de algum deles sobre outro é que caracteriza a individualidade do aroma de cada fruto (LUCCHETTA 2007, p35).

O principal grupo de voláteis contribuintes para o aroma do morango são os ésteres. A biossíntese dos ésteres tem origem principalmente na degradação de ácidos graxos e aminoácidos onde são convertidos em aldeídos ramificados e alifáticos, para então, através da enzima álcool desidrogenase (*ADH*) serem reduzidos a alcoóis e posteriormente a ésteres com a participação da enzima álcool acetiltransferase (*AAT*) na rota de produção de ésteres (BEEKWILDER et al., 2004; LUCCHETTA 2007).

A atividade da *AAT* já foi mensurada em diversos frutos como maçã (FELLMAN et al., 1991), banana (HARADA; UEDA; IWATA, 1985), melão (UEDA; FUJISHITA; CHACHIN, 1997), morango (PEREZ; SANZ; OLÍAS, 1993) e uva (WANG; DE LUCA, 2005), visto a importância causada pelos compostos voláteis na maturação dos frutos e na decisão de compra dos frutos pelos consumidores.

Em morangueiros ocorre um incremento da atividade da *AAT* ao longo da maturação, sendo sua máxima atividade observada quando os frutos apresentam coloração vermelho escuro (PEREZ et al., 1996).

PEREZ et al. (1996) avaliaram também os níveis de expressão desta enzima em morangos armazenados e envoltos por filme plástico, onde houve um aumento no acúmulo de transcritos deste gene devido as condições de anoxia, que favoreceu a produção de álcoois, os quais liberam substrato para a *AAT*.

Um comportamento similar foi observado no trabalho de Severo (2009, p.74), onde a exposição ao UVC (radiação ultravioleta) também induziu o aumento da transcrição da *AAT*, a qual está relacionada a um consequente aumento da produção de aromas.

Miller et al. (1998) observou uma diminuição no conteúdo de ésteres em maçãs quando as mesmas passaram por processo de redução à exposição solar. Por fim, Inúmeros fatores promovem mudanças no perfil aromático dos frutos como a forma de manejo, as condições de cultivo, os produtos aplicados, dentre outros.

3.3 Compostos do metabolismo de defesa das plantas com função na manutenção da saúde humana

Em ambientes naturais os vegetais sofrem diferentes tipos de estresses tanto bióticos como abióticos. Sendo assim, eles necessitam desenvolver algumas estratégias para evitar estes estresses como, por exemplo, a camada externa cerosa (cutícula) e o tecido protetor secundário (periderme) que servem como barreira à entrada de patógenos e herbívoros. Além dessas estratégias, os vegetais apresentam outro mecanismo de proteção às adversidades ambientais: um grupo de compostos considerados de defesa que agem como antioxidantes quando ingeridos pelos humanos (TAIZ; ZEIGER, 2004). Os antioxidantes podem ser classificados em dois grupos: possuidores de atividade enzimática, onde os compostos são capazes de bloquear a iniciação da oxidação (enzimas como superóxido desmutase, catalase e peroxidase removem as espécies reativas de oxigênio) ou compostos sem atividade enzimática, os quais interagem com os radicais livres formados durante a reação. Nesta segunda classe incluem-se os compostos como os derivados da rota de fenilpropanoides em vegetais, em especial em morangos, tais como ácidos fenólicos, flavonóis e antocianinas (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004).

Estes compostos de defesa fazem parte do metabolismo secundário, assim chamados por não terem influência direta no crescimento e desenvolvimento das plantas, entretanto, possuem grande importância na resposta à ação de predadores e adversidades ambientais, além de atraírem animais polinizadores e dispersores de sementes, entre os quais os seres humanos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Dentre os principais grupos de compostos do metabolismo secundário de plantas encontram-se os compostos fenólicos. Estes compostos são biossintetizados por meio de duas rotas metabólicas básicas: rota do ácido chiquímico e rota do ácido malônico, sendo a primeira rota responsável pela biossíntese da maioria dos fenóis vegetais e a segunda rota mais significante em grupos de fungos e bactérias. Precursores de carboidratos derivados da glicólise e da rota das pentoses fosfatadas são convertidos em aminoácidos aromáticos na rota do ácido chiquímico. A enzima fenilalanina amonialiase (*FAL*) cataliza a reação de eliminação de uma molécula de amônia do aminoácido L- fenilalanina para formar o ácido cinâmico, que dará origem a classe de compostos fenólicos mais abundantes em plantas, como por exemplo os flavonoides, antocianinas, antocianidinas, etc (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A Fig. 1 representa a rota metabólica de fenilpropanoides, a qual pertence algumas enzimas codificadas por genes estudados neste trabalho.

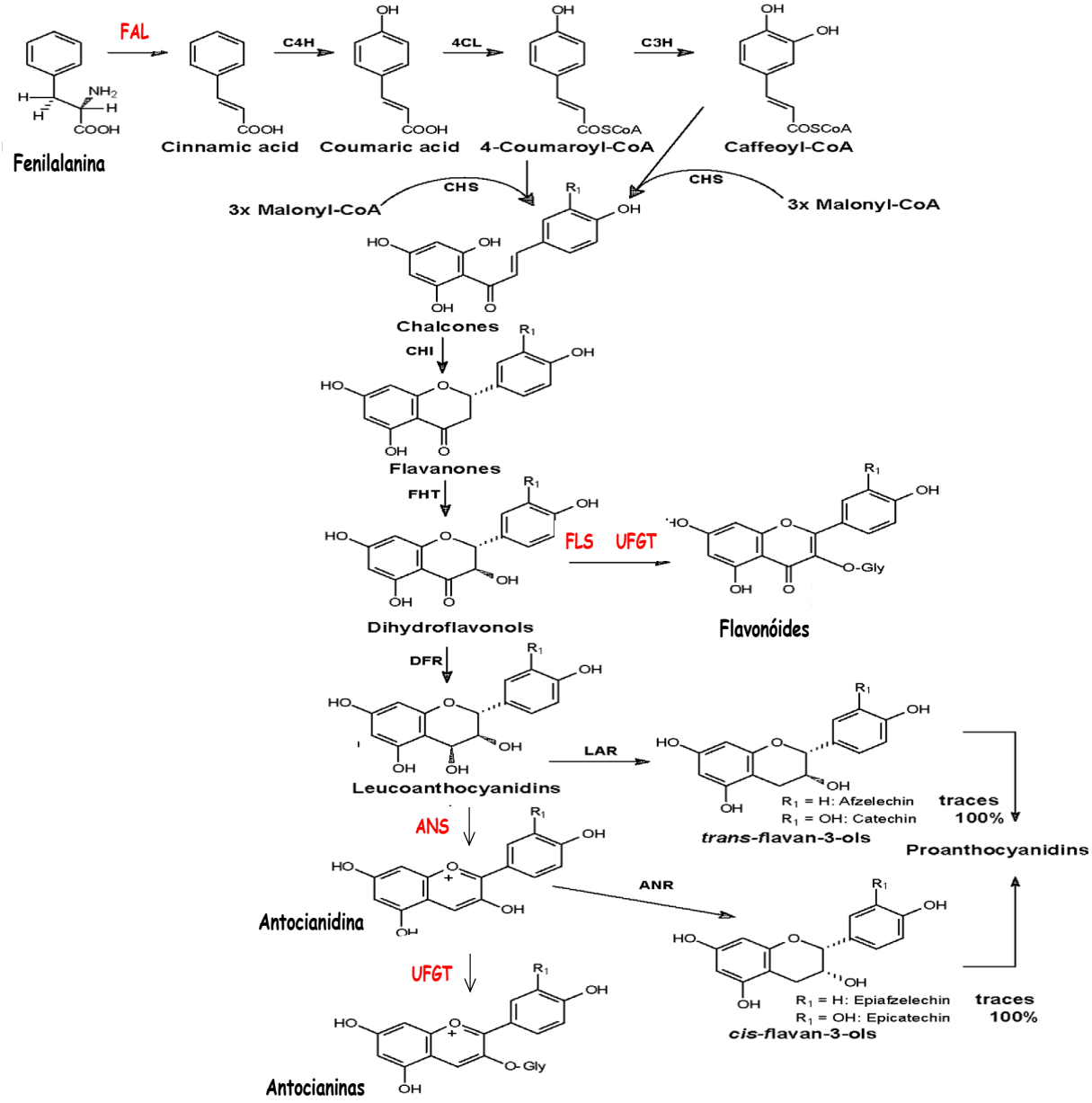


Figura 1 – Esquema representando a rota metabólica de fenilpropanides. Em destaque são mostradas as enzimas chave que são codificadas pelos genes estudados neste trabalho: *FAL* (codifica a enzima fenilalanina amônio liase), *FLS* (codifica a enzima flavonol sintase), *UFGT* (codifica a enzima UDP flavonóide glicosiltransferase) e *ANS* (codifica a enzima antocianidinasintase). Figura adaptada de Almeida, J. R. M. et al (2007)

A atividade da *FAL* é aumentada por fatores ambientais tais como infecção por fungos, alterações das condições ideais de fotoperíodo, baixos níveis de nutrientes, dentre outros, consequentemente promovendo alterações na atividade

das enzimas com ação posterior e mudança nos níveis de acúmulo dos compostos finais (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Do ponto de vista funcional (nutracêutico), os compostos fenólicos derivados das rotas supracitadas conferem vários efeitos benéficos à saúde quando ingeridos na dieta devido a suas propriedades antioxidantes, pois agem sequestrando radicais livres (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004). Pelo fato de os compostos fenólicos agirem como antioxidantes quando ingeridos e por serem um dos maiores grupos de componentes dietéticos não essenciais, esses compostos têm atraído a atenção para a nutrição preventiva, pois, por inibirem os radicais livres, combatem o envelhecimento precoce das células, atuam como antiinflamatório e imunoestimulante, previnem doenças cardiovasculares e crônico-degenerativas e também inibem a proliferação de células cancerígenas (YUNES; CALIXTO, 2001).

No trabalho realizado por Almeida et al. (2007) utilizando PCR em tempo real, uma comparação da expressão gênica entre diferentes órgãos e diferentes fases de desenvolvimento de morangos (*Fragaria* x *ananassa*) da cultivar ‘Queen Elisa’ foi realizada utilizando genes envolvidos na rota metabólica de fenilpropanoides. Os resultados mostraram diferentes padrões de expressão, onde os frutos apresentaram os maiores níveis de transcritos comparados a outros órgãos. Os menores valores foram obtidos em folhas e pétalas, e um distinto padrão de expressão foi apresentado pelas raízes. Em relação às fases da maturação, as amostras coletadas 25 dias após a antese apresentaram os maiores níveis de transcritos para a maioria dos genes alvo.

4 Técnicas de biofortificação

O incremento da produtividade de frutas ainda é o maior interesse de produtores e de programas de melhoramento vegetal, porém, o crescente interesse e demanda por parte dos consumidores por alimentos com maior qualidade nutricional e funcional, tem direcionado as pesquisas visando diferentes formas de biofortificação. As técnicas mais utilizadas abrangem quatro grandes estratégias que são: melhoramento genético convencional, mutagênese, transgenia, e o uso de fertilizantes (ZHU et al., 2007).

A aplicação de produtos com potencial bioestimulante (definidos como mistura de compostos, substâncias e outros produtos que são aplicados às plantas e solos para regular e melhorar os processos fisiológicos da cultura, melhorando o vigor, qualidade de pós colheita, vida de prateleira/conservação e tornando-os mais produtivos) estimulam também a divisão celular e promovem um aumento da absorção de água e nutrientes pelas plantas (VIEIRA; CASTRO 2001), podendo também ser considerados uma estratégia de biofortificação.

4.1 Água de xisto

A água de xisto (AX) é um subproduto do processamento do xisto, rocha originada pela deposição de sedimentos (principalmente algas e animais marinhos) há aproximadamente 250 milhões de anos. Atualmente este folhelho ocorre desde o Planalto Central do Brasil até o Uruguai (MESSIAS, 2011, p.11).

A extração desta rocha por pirólise utilizando pressão e altas temperaturas, desenvolvida pela Petrobras (processo Petrosix®), gera um subproduto líquido que foi denominado água de xisto, o qual tem merecido destaque pela sua concentração de elementos traço, diversidade de nutrientes presentes e compostos orgânicos com potencial indutor de metabolismo secundário, pressupondo um possível uso deste subproduto como matéria prima para produtos de aplicação foliar. Na cultura do

milho, por exemplo, a aplicação de AX proporcionou um maior acúmulo de minerais, metabólitos primários e secundários, atuando como um biofortificador desta cultura (MESSIAS, 2011, p.125). No mesmo trabalho foi possível verificar também um aumento dos teores de alanina e prolina, aminoácidos sabidamente envolvidos na defesa contra estresses osmóticos. Esses resultados, associados ao fato de a AX apresentar em sua formulação os elementos Na e Cl, sugerem que este produto promoveu a indução de um estresse em nível moderado no milho, visto que desencadeou a produção de compostos de tolerância a estas adversidades sem acarretar prejuízo às plantas.

5 Expressão gênica

Muitos genes podem ser codificados por consequência de estresses moderados podendo promover aumento na tolerância à desidratação nos vegetais, aumentando as funções de proteção celular e a regulação de outros genes envolvidos (BRAY, 1993; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997). Uma resposta fisiológica mais específica ao estresse se dá por combinações de eventos moleculares (ativação da expressão gênica) que podem ser ativados ou desativados pela percepção do mesmo (BRAY, 1993).

A expressão gênica pode ser mensurada através dos níveis de mRNAs transcritos por determinado indivíduo. A reação de amplificação em tempo real, uma variante da reação de PCR convencional, facilita as tarefas de quantificação da expressão gênica de forma precisa e com maior reprodutibilidade em determinadas amostras biológicas (GINZINGER, 2002). O método utiliza um sistema fluorescente em plataforma capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação. Durante a fase exponencial da reação, fluoróforos são emitidos proporcionalmente à quantidade de produto da PCR, durante cada ciclo, sendo então detectados e quantificados pelo equipamento. Para obter uma análise correta é necessário utilizar um gene constitutivo, também chamado de endógeno ou *housekeeping,* o qual sua expressão não varia diante das condições experimentais. As principais vantagens da PCR em tempo real são: maior sensibilidade, maior precisão, facilidade de quantificação e alta reprodutibilidade e velocidade nas análises (BUSTIN, 2005).

Dessa maneira, a biologia molecular assume papel-chave na análise pontual de genes envolvidos em resposta ao estresse, o que permitirá futuramente uma maior compreensão no direcionamento de rotas metabólicas envolvidas nas respostas fisiológicas aos estresses abióticos.

Artigo: Revista Horticultura Brasileira

Estresse salino moderado associado à aplicação de água de xisto induz a expressão de genes relacionados à qualidade dos frutos de morangueiro

Julia Labonde[1]; Vanessa Galli[2]; Joyce. M Borowski[1]; Rafael S Messias[3]

[1]UFPel, C. Postal 354, 96001-970 Pelotas-RS; julialabonde@gmail.com.br; joyceborowski@gmail.com
[2]UFRGS, C. Postal 15002, 90040-060 Porto Alegre-RS; vane.galli@yahoo.com.br
[3]Embrapa Clima Temperado, C. Postal 403, 96010-971, Pelotas-RS; rafael.embrapa@yahoo.com.br

RESUMO

O morango é uma das pequenas frutas que possuem apelo comercial devido ao seu sabor, aroma, cor, compostos nutricionais e funcionais. Neste contexto, estratégias que visam incrementar estas características vêm sendo analisadas. Neste trabalho foi avaliado o efeito de duas estratégias de biofortificação baseadas na indução de estresse moderado por meio da aplicação individual ou em conjunto de cloreto de sódio e água de xisto (AX). Sendo assim, buscou-se analisar a expressão de genes relacionados a características que promovem qualidade ao fruto. Os resultados apresentaram maior ativação do metabolismo de defesa da planta, maior produção de compostos relacionados ao aroma, e também uma modificação da parede celular em direção à rápida aceleração do amadurecimento dos frutos, possivelmente pela maior urgência das plantas em completar seu ciclo fenológico. Desta forma, o uso combinado de ambas as soluções possivelmente causa um aumento considerável das características de qualidade para esta cultura, sendo este efeito estatisticamente significativo com a aplicação conjunta de AX (dose 1) e cloreto de sódio.

Palavras-chave: *Fragaria* x *ananassa*; estresse moderado; compostos funcionais.

ABSTRACT

The strawberry is a small fruit that have commercial appeal because of its taste, aroma, color, nutritional and functional compounds. In this context, strategies to enhance these characteristics have been analyzed. This study evaluated the effect of two biofortification strategies based on induction mild stress by applying individually or in combination of sodium chloride and shale water (SW). Therefore, we sought to analyze the expression gene related to the characteristics that promote fruit quality. The results showed greater activation of plant defense metabolism, increased compounds related to aroma, and also a modification of the cell wall toward the rapid acceleration of fruit ripening, possibly for greater urgency in plant completing its phenological cycle. Thus, the combined use of both solutions possibly cause a considerable increase of the quality characteristics for this culture, and this effect was statistically significant at the joint application of SW (dose 1) and sodium chloride.

Keywords: *Fragaria* x *ananassa*; mild stress; functional compounds.

INTRODUÇÃO

A Família Rosaceae inclui as frutíferas de maior importância econômica, dentre as quais as pequenas frutas mais proeminentes pertencem ao gênero *Fragaria* e *Rubus* (Aharoni *et al*., 2000), sendo *Fragaria* a espécie de maior expressão econômica atualmente (Oliveira *et al*., 2005). Para produtores e programas de melhoramento vegetal, o maior interesse é no incremento da produtividade, porém, o que mais atrai os consumidores são as características que promovem qualidade ao fruto. Os principais parâmetros que levam à alta qualidade destes frutos são: textura - a qual está diretamente relacionada com a rigidez e flexibilidade oferecida pelos compostos da parede celular; aroma e sabor - o qual se relaciona aos compostos voláteis, açúcares e ácidos produzidos durante o amadurecimento; cor, originada principalmente pelo pigmento antocianina; e a presença de compostos funcionais, provenientes do metabolismo de defesa dessas plantas (Chitarra & Chitarra, 2005).

Compostos voláteis provenientes da rota de produção de aromas nos frutos, além de atraírem insetos polinizadores e contribuírem para a dispersão das sementes, são um fator relevante no momento da compra destes pelo consumidor (Lucchetta, 2007). Outro fator relevante é a manutenção de uma textura consistente, pois a baixa firmeza dos tecidos vegetais,

caracterizada pela despolimerização e desagregação dos polissacarídeos da parede celular, além de facilitar o ataque de patógenos, limita a vida de prateleira e o transporte e armazenamento dos frutos, constituindo um grande impedimento para a comercialização (Pombo *et al*., 2009). Além disso, o morango tem despertado interesse do consumidor por apresentar alto valor nutricional devido ao alto conteúdo de vitamina C, a qual é de extrema importância para a saúde, e devido à presença de minerais essenciais para o organismo humano como cálcio, potássio, magnésio, manganês, ferro, zinco e cobre. Além disso, estes frutos possuem também um alto valor funcional que é atribuído aos compostos com propriedade antioxidante, os quais agem sequestrando radicais livres no nosso organismo e promovendo diversos efeitos benéficos, tais como: combater o envelhecimento precoce das células, reduzir a suscetibilidade a infecções, aumentar a atividade anti-inflamatória, dentre outros (Yunes & Calixto, 2001). Dentre os compostos presentes no morango com este potencial estão os ácidos (p-cumárico, caféico, ferúlico, sináptico), flavonoides (flavonas, isoflavonoides, flavanonas) e antocianinas (cianidina, delfinidina, pelargonidina).

Neste contexto, práticas de otimização/biofortificação de culturas agrícolas como seleção de variedades, sistemas de cultivo, utilização de fertilizantes, melhoramento genético e aplicação de produtos com potencial bioestimulante vem sendo avaliadas visando aumentar o conteúdo de compostos fenólicos, voláteis e compostos capazes de promover a manutenção da firmeza em frutas.

Com o objetivo de verificar se morangos submetidos à radiação podem sofrer biofortificação, aumentando desta forma a produção de compostos provenientes do metabolismo secundário, Severo et al. (2009) avaliaram a influência da radiação UVC (4.35 KJm^{-1} que corresponde a 5’ exposto à luz em câmara fechada) sobre a expressão de genes que atuam na rota de síntese desses compostos e também teor de fenóis totais. Os resultados mostraram um aumento nos níveis de transcritos dos genes estudados, além de uma indução da síntese dos compostos sintetizados na rota de fenilpropanoides.

Neste mesmo trabalho realizado por Severo et al. (2009), buscou-se verificar se esta estratégia estimulou a produção de compostos voláteis e compostos que promovem a degradação da parede celular no decorrer do amadurecimento dos morangos. Os resultados mostraram uma prorrogação do processo de amolecimento da parede e também uma indução da síntese de compostos voláteis, aumentando, desta forma, as características de qualidade do fruto.

Embora condições rigorosas de estresses abióticos afetem drasticamente a fisiologia do crescimento de plantas, estudos têm mostrado que, além das práticas de otimização/biofortificação citadas acima, condições moderadas de estresses também poderiam ser utilizadas para induzir um aumento das características que promovem qualidade ao fruto. Ou seja, estresses moderados não acarretariam danos à planta, e sim resultariam na produção de compostos relacionados ao metabolismo de defesa contra estas alterações ambientais, incluindo os compostos de metabolismo secundário, os quais apresentam capacidade antioxidante quando ingeridos. Outra consequência seria uma resistência aumentada a situações de estresse, uma vez que seu metabolismo já estaria direcionado à produção de metabólitos secundários (Lichtenthaler, 2004).

Em outras culturas esta estratégia de biofortificação através de estresse moderado já se mostrou eficiente (ver: Cornish, 1992 e Turhan et al., 2008), porém, este efeito sobre o metabolismo secundário, textura e compostos voláteis sobre condições de estresse moderado é ainda pouco estudado em morango.

Outra forma de biofortificação, também baseada em estresse moderado, foi apresentada no trabalho de Messias (2011), onde, utilizando a cultura do milho, demonstrou que a aplicação foliar de água de xisto (AX) - subproduto do processamento do xisto - induziu um aumento significativo nos níveis dos aminoácidos prolina e alanina, sabidamente envolvidos na tolerância a estresses abióticos. Estes resultados, associados ao fato de a AX apresentar em sua constituição os minerais Na e Cl, sugerem que a mesma possa atuar causando um estresse moderado em plantas, que, além de proporcionar aumento no conteúdo de compostos antioxidantes, melhorando a qualidade nutricional/funcional dos frutos, auxilia no desenvolvimento de plantas quando submetidas a condições de estresses subsequentes.

Desta forma, este trabalho buscou analisar a expressão de genes relacionados à síntese de metabólitos secundários de defesa, síntese de compostos voláteis e à desagregação de parede celular em frutos de morango submetidos a tratamentos com AX e solução com cloreto de sódio (SS), aplicados individualmente ou em conjunto, com o objetivo de verificar se estas estratégias são capazes de melhorar aspectos de qualidade na cultura do morangueiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental - Mudas de morango comercial (cv. Camarosa) foram transplantadas para vasos de 9L contendo como substrato uma mistura de solo e vermiculita (3:1). A irrigação foi realizada com água destilada por lâmina d'água de forma a manter o nível ideal de umidade no solo constante. O fornecimento de nutrientes foi realizado semanalmente via fertirrigação de acordo com as recomendações técnicas para a cultura (CQFS, 2004). O desenho experimental foi constituído por blocos randomizados com quatro repetições, com dez plantas cada repetição. Com o intuito de verificar o efeito da aplicação de um estresse moderado utilizando NaCl (solução salina = SS) aplicado ao solo e sua similaridade com o efeito da aplicação foliar de AX, sobre a indução de genes relacionados a síntese de compostos voláteis, de parede celular e provenientes do metabolismo de fenilpropanoides, foram utilizados os tratamentos descritos na Tabela 1. Este delineamento constituiu o experimento 1, sendo as aplicações de AX realizadas duas vezes por semana e as aplicações de SS realizadas semanalmente (50 mL de cada solução a 40mM), totalizando 13 e 7 aplicações, respectivamente, até o momento da coleta de frutos, a qual foi realizada 24h após a última aplicação de todos os tratamentos.

Tabela 1. Tratamentos aplicados em morangos referentes ao experimento 1 (Treatments applied in strawberries for the experiment 1). Pelotas, Embrapa, 2013

Tratamentos	Descrição	Total de aplicações
T1	Água destilada	13
T2	SS (40mM)	7
T3	AX D1	13
T4	AX D2 (D2 = 2x D1)	13

AX: água de xisto; SS: solução salina; D1: dose 1; D2: dose 2 (AX: shale water; SS: saline solution; D1: dose 1; D2: dose 2) Pelotas, Embrapa, 2013.

Com o intuito de verificar o efeito da aplicação de AX associado à aplicação de SS sob a expressão dos mesmos genes (relacionados à síntese de metabólitos secundários de defesa, síntese de compostos voláteis e à desagregação de parede celular), um segundo experimento foi desenvolvido. Para tanto, após a primeira coleta realizada no experimento 1, as plantas do tratamento T1 passaram a ser submetidas, além de água destilada, também à estresse

moderado com solução salina (duas aplicações de 40mM) caracterizando um estresse pontual, o tratamento T2 recebeu mais duas dose de 40mM de SS (totalizando 9 aplicações), caracterizando desta forma um estresse prolongado, e os tratamentos T3 e T4 receberam mais duas aplicações de AX e SS, totalizando 19 aplicações foliares de AX e a duas aplicações de SS (40mM). Este delineamento constituiu o experimento 2, o qual está apresentado na Tabela 2. A coleta de frutos maduros do experimento 2 ocorreu 24 horas após as aplicações dos tratamentos descritos acima. Todos os frutos coletados foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o momento das análises.

Tabela 2. Tratamentos aplicados em morangos referentes ao experimento 2 (Treatments applied in strawberries for the experiment 2). Pelotas, Embrapa, 2013

Tratamentos	Descrição	Total de aplicações
T1	SS (40mM) + água destilada	2 e 17
T2	SS (40mM)	9
T3	AX D1 + SS (40mM)	19 e 2
T4	AX D2 (D2 = 2x D1) + SS (40mM)	19 e 2

AX: água de xisto; SS: solução salina; D1: dose 1; D2: dose 2 (AX: shale water; SS: saline solution; D1: dose 1; D2: dose 2) Pelotas, Embrapa, 2013.

Extração, quantificação e avaliação da qualidade do RNA - Os morangos coletadas foram macerados com auxílio de nitrogênio líquido, sendo os procedimentos realizados com materiais previamente autoclavados a 120°C por 45min e todos os materiais e bancadas utilizadas para manipular as amostras foram pré-tratadas com inibidor de RNAse (RNAse Away - Invitrogen™). O método utilizado para as extrações foi CTAB com modificações (Messias *et al.*, 2010). O RNA das amostras foi extraído em quadriplicata. A concentração de RNA foi quantificada pelo protocolo Qubit Quantitation Platform que inclui o aparelho Qubit fluorômetro (Invitrogen™) e os reagentes do kit Quant-it (Invitrogen™). Os produtos de extração de RNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) em tampão TBE com auxílio de corante GelRed™, com intuito de avaliar a qualidade do RNA extraído.

Síntese de cDNA – O RNA extraído foi previamente digerido com *DNAse I* Amp Grade, UltraPure ™DEPC-treated Water (Invitrogen™), seguindo o protocolo descrito pelo

fabricante. As amostras foram incubadas em termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems) por 15min a 25ºC, seguido de inativação com 1mM de EDTA a 65ºC por 10min. A reação de transcrição reversa foi realizada com 60ng de RNA utilizando a enzima MMLV e oligo(dt) conforme fabricante (Invitrogen™). RNaseOut™ (Recombinant RNAse Inhibitor) (Invitrogen™) foi adicionada à reação a fim de inibir a ação de RNAses.

Seleção de genes e desenho de *primers* – Para este trabalho foram selecionados genes chave da rota metabólica de fenilpropanoides sendo eles: *FAL* (codifica a enzima fenilalanina amônio liase, principal gene de entrada nesta rota), *FLS* (codifica a enzima flavonol sintase que dá origem aos flavonoides), *UFGT* (codifica a enzima UDP flavonoide glicosil transferase, responsável pela produção de flavonoides e antocianinas) e *ANS* (codifica a enzima antocianidina sintase, responsável pela síntese de antocianidinas) (Taiz & Zeiger, 2004). Em relação à produção de compostos voláteis foi selecionado o gene *AAT* responsável pela produção de aroma no morango (codifica a enzima álcool acetiltransferase) (Beekwilder *et al*., 2004). E por fim, foram também selecionados dois genes que auxiliam na degradação da perede celular dos vegetais, sendo eles *PME* (codifica a enzima pectina metilesterase que tem a função de hidrolisar os ésteres de metil das pectinas liberando H2O e metanol) e o *PG* (codifica a enzima poligalacturonase, tal enzima realiza a despolimerização do pectato através da quebra dos ácidos galacturônicos da pectina (Taiz & Zeiger, 2004). Os *primers* utilizados neste trabalho foram construídos com o auxílio do programa Vector NTI10 (Invitrogen™) a partir de sequências de *Fragaria* x *ananassa* obtidas no banco NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizando os seguintes critérios: temperatura média de anelamento entre 52ºC e 56ºC; conteúdo de CG entre 40% e 60%, ausência de estruturas secundárias (dímeros e *hairpins*) (Bustin et al., 2009). Foram desenhados *primers* para uso como genes de referência, sendo eles: *18S* (codifica RNA ribossômico *18S*) e *GAPDH* (codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). A Tabela 3 apresenta as sequências dos *primers* desenhados para cada gene de interesse empregado neste trabalho.

Avaliação da especificidade e eficiência dos *primers* utilizados - A capacidade de alguns dos *primers* propostos neste trabalho de gerar um *amplicom* específico foi previamente testada em reação de PCR convencional com auxílio de termociclador 7500 (Applied Biosystems) utilizando as seguintes condições: 5’ a 95°C seguidos por 40 ciclos de 1’ a 95ºC, 1’ a 50ºC, 1’ a 72ºC e extensão final de 7’ a 72°C. As concentrações utilizadas nas PCRs foram 3mM, 4mM e 6mM para cloreto de magnésio e 0,04µM, 0,08µM, 0,16µM e 0,2µM para os *primers*.

O produto da PCR foi corado com GelRed™ e verificado em eletroforese em gel de agarose 3% (m/v) com o marcador 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen™).

Para o teste de eficiência dos genes alvo propostos neste trabalho, diluições seriadas de cDNA juntamente com os *primers* propostos foram testadas em PCR em tempo real com as seguintes condições: 50°C por 2', 95°C por 10', seguido por 45 ciclos de 15'' a 95ºC e 1' a 60ºC. O resultado destas reações foi tabelado para o cálculo da equação da reta, o qual, conjuntamente com o valor de inclinação da reta permitiu avaliar a eficiência da reação. Uma eficiência de reação entre 90-110% é considerada adequada para utilização em análises de PCR em tempo real (Bustin et al., 2009).

Avaliação da expressão gênica relativa utilizando PCR em tempo real - Os cDNAs foram amplificados por PCR em tempo real, em um volume final de 20µL, contendo 6ng de cDNA, 10µL de Platinum SYBR Green UDG (Invitrogen™), e 2 a 10pmol de cada *primer*. A amplificação foi padronizada em um termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems) utilizando as seguintes condições: 50°C por 20'', 95°C por 10'', seguido por 45 ciclos de 15'' a 95ºC e 1' a 60ºC. As condições da curva de dissociação foram: 15'' a 95°C, 1' a 60°C, 30'' a 95°C e 15'' a 60°C. Todas as análises foram realizadas em quadruplicata.

Análise de dados - Os dados do PCR em tempo real foram analisados pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (PFAFFL, 2001), e empregado o teste F na análise de variância e o teste de Tukey na comparação de médias de tratamento, ambos ao nível de 5% de significância, utilizando o software REST (PFAFFL *et al*., 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Posteriormente à extração, o RNA total foi submetido à eletroforese em gel de agarose onde foi avaliada a qualidade das amostras. O anexo 1 mostra o resultado da eletroforese para algumas amostras escolhidas aleatoriamente. A sequência de cada *primer* utilizado neste trabalho, assim como o tamanho (pb), a eficiência de amplificação e temperatura de dissociação (*melting*) estão apresentadas no anexo 2. Os *primers* propostos foram avaliados em PCR convencional e apresentaram *amplicon* específico somente com a utilização de 3mM de MgCl sendo apresentadas no anexo 3 as melhores concentrações utilizadas para cada *primer*. O resultado dos testes de eficiência de amplificação de cada *primer* proposto foi

ajustado de acordo com o valor de inclinação da reta, de modo que todos foram considerados adequados para utilização nas análises de PCR em tempo real. O anexo 4 apresenta um exemplo da curva de amplificação, curva de *melting* e curva padrão, que neste caso são relacionados ao *primer AAT*. Todos os genes utilizados neste estudo foram amplificados em PCR em tempo real e submetidos à eletroforese, apresentando bandas específicas e de tamanho esperado em gel de agarose (Figura 1).

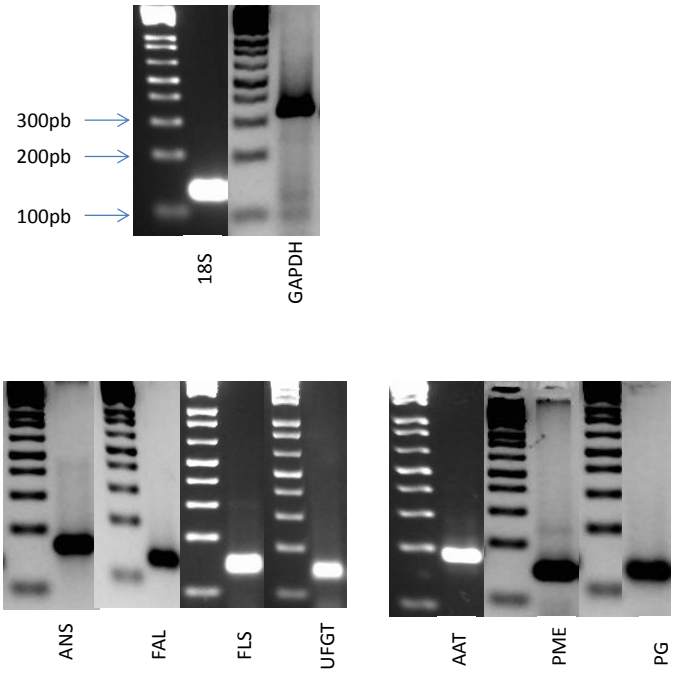


Figura 1. Géis de agarose mostram banda específica (após reação de PCR em tempo real) para cada gene estudado neste trabalho (Agarose gels show specific band (after real time PCR reaction) for each gene studied in this work). Embrapa, Pelotas, 2013

Os produtos da amplificação em PCR em tempo real não apresentaram dímeros ou outros produtos inespecíficos, mostrando apenas um único pico de *melting*, confirmando a especificidade da amplificação. Dados obtidos por PCR em tempo real das amostras referentes ao experimento 1 mostram que o estresse salino (T2) e o estresse provocado pela AX (T3 e T4) apresentaram alterações nos níveis de expressão dos genes estudados (Figura 2).

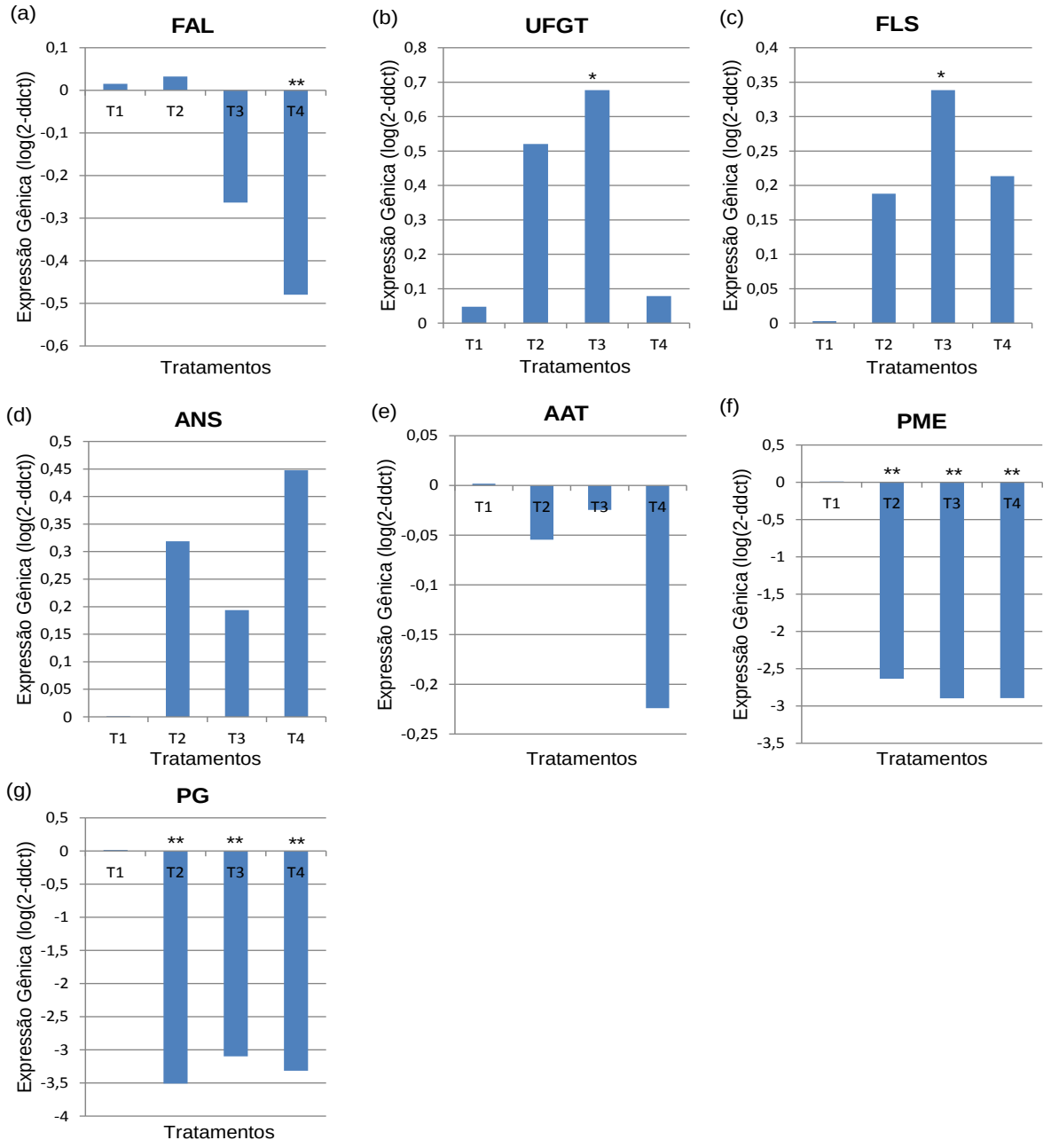


Figura 2. Expressão transcricional dos genes *FAL* (a), *UFGT* (b), *FLS* (c), *ANS* (d), *AAT* (e), *PME* (f) e *PG* (g) em morangos tratados com: (T1) água destilada, (T2) SS, (T3) AX dose 1 e (T4) AX dose 2. O asterisco (*) indica diferença estatística em relação ao tratamento T1 ao nível de 5% de significância pelo programa REST sendo: *aumento dos níveis de transcrito e **diminuição dos níveis de transcrito (Transcriptional expression of genes *FAL* (a), *UFGT* (b), *FLS* (c), *ANS* (d), *AAT* (e), *PME* (f) and *PG* (g) in strawberries treated with: (T1) distilled water, (T2) SS, (T3) SW dose 1 and (T4) SW dose 2. The asterisk (*) indicates statistical difference compared to T1 at 5% significance by being REST program: * Increased levels of transcript ** and decreased levels of transcript). Pelotas, Embrapa, 2013

FAL, *UFGT*, *FLS* e *ANS* são genes que codificam enzimas que atuam na rota de fenilpropanoides nos morangos. O gene *FAL*, o qual codifica a fenilalanina amônio liase, enzima de entrada nesta rota (Taiz & Zeiger, 2004), foi regulado negativamente no tratamento com a segunda dose de AX (T4) sugerindo uma possível redução dos compostos fenilpropanoides neste tratamento (Figura 2a). Porém, o mesmo resultado não foi observado em relação à expressão de *UFGT*, *FLS* e *ANS* (Figuras 2b, 2c, 2d), as quais são enzimas subsequentes desta rota metabólica. Os genes *UFGT* e *FLS*, por outro lado, apresentaram um aumento significativo nos níveis de transcritos com a primeira dose de AX (T3), embora os níveis de *FAL* não tenham sido significativamente alterados. Uma possível explicação para esta inalterada expressão da *FAL* é que, inicialmente ela foi induzida e posteriormente reprimida, momentos antes da coleta, quando apenas o aumento de *UFGT* e *FLS* pôde ser detectado, como consequência da cascata de reações iniciada pela enzima *FAL*. Estes resultados indicam que pode ter havido um incremento nos compostos flavonoides das plantas submetidas a este tratamento (T3), visto que *UFGT* e *FLS* fazem parte do braço da rota que leva à produção destes produtos metabólicos (Taiz & Zeiger, 2004). Por outro lado, a expressão do gene *ANS* não foi estatisticamente alterada no T3 (e em nenhum outro tratamento) comparado ao controle, mostrando que de fato o braço da rota que leva à produção de antocianinas não foi favorecido, (visto que *ANS* codifica para antocianidina sintase, enzima responsável pela produção de antocianidinas, mas que também é dependente de UDP flavonoide glicosil transferase - *UFGT* - para produzir antocianinas) (Taiz & Zeiger, 2004).

Embora o tratamento com AX tenha induzido a expressão de enzimas da rota de fenilpropanoides, a enzima *AAT* - álcool acetiltransferase, responsável pela produção de aromas no morango (El Sharkawy *et al*., 2005) não apresentou diferença significativa em nenhum tratamento comparado ao controle (Figura 2e).

No tratamento T2, apesar de sete aplicações de solução salina já terem sido realizadas ao longo deste período, não foi observado regulação dos genes da rota de fenilpropanoides e de voláteis, embora o desenvolvimento da planta tenha sido visualmente afetado (Figura 3), sugerindo que outras rotas de produção de compostos antioxidantes ou enzimas antioxidantes possam estar sendo produzidas para auxiliar na defesa contra o estresse causado.

Por outro lado, a expressão dos genes *PME* e *PG*, os quais codificam enzimas que atuam na despolimerização da parede celular de frutos e vegetais (Salentijn et al., 2003), foi regulada negativamente comparada ao tratamento controle (Figura 2f, 2g). Este resultado foi observado tanto em plantas submetidas ao estresse com dose de salina (T2) quanto em plantas submetidas ao estresse com AX (T3 e T4), sugerindo que sua textura não foi alterada em direção ao amolecimento, ou seja, a aplicação de um estresse salino moderado ou água de xisto em nível moderado possivelmente promove firmeza nos frutos mesmo havendo processo de maturação.

Todos os resultados observados no experimento 1 mostram que, em relação aos genes da rota de fenilpropanoides, houve incremento de compostos flavonoides somente no T3 devido à significativa regulação positiva dos genes *UFGT* e *FLS*, pois no T2 nenhum gene desta rota foi significativamente alterado, e no T4 parece ter havido redução dos compostos fenilpropanoides devido a redução dos níveis de transcritos da *FAL* e pela inalteração dos genes subsequentes desta rota. Os níveis de expressão de *AAT* não apresentaram alteração significativa em nenhum tratamento, sugerindo que não houve melhora na qualidade aromática dos frutos. E por fim, os genes relacionados à degradação da parede celular foram regulados negativamente em todos os tratamentos comparados ao controle, sugerindo que a textura dos frutos não foi alterada em direção ao amolecimento.

Em relação ao experimento 2, comparados ao tratamento controle, a aplicação concomitante de AX e SS, além de promover o aumento de *FAL* (Figura 4a) e *UFGT* (Figura 4b) ambos no T4, o que já havia sido observado com a aplicação isolada de AX, também proporcionou aumento de *ANS* (Figuras 4c) no T3, indicando que a indução do metabolismo de fenilpropanoides foi persistente durante o ciclo de desenvolvimento da planta.

Embora não tenha sido possível avaliar a expressão de *FLS* nesta mesma coleta, é possível que neste tratamento o braço da rota metabólica favorecida tenha sido o de produção de antocianinas e/ou antocianidinas, possivelmente porque o gene *ANS* apresentou níveis de expressão bem elevados, quando comparados aos níveis de expressão de *UFGT* (Figura 4b). Sabe-se que aos flavonoides são atribuídos diversos efeitos benéficos à saúde, uma vez que possuem ação anti-inflamatória e anticancerígena, e também por atuarem como antioxidantes no organismo, prevenindo o envelhecimento precoce. Compostos com propriedades antioxidantes como flavonoides podem ser sintetizados em plantas sob mudanças adversas no

ambiente, resultando em defesa contra agentes patogênicos, herbivoria, atuando no combate à oxidação celular e conferindo resistência a doenças (Baka *et al*., 1999; Taiz & Zeiger, 2004), justificando o resultado observado no presente estudo.

Já o T2 provocou uma diminuição dos transcritos do gene *FAL* (Figura 4a), e do gene *UFGT* (Figura 4b), deste modo podemos dizer que neste tratamento houve uma diminuição dos compostos fenólicos, já que os mesmos são sintetizados a partir da reação enzimática realizada pela *UFGT*. Este efeito pode ter ocorrido devido aos morangos estarem sobre um efeito estressante mais drástico devido às nove aplicações realizadas.

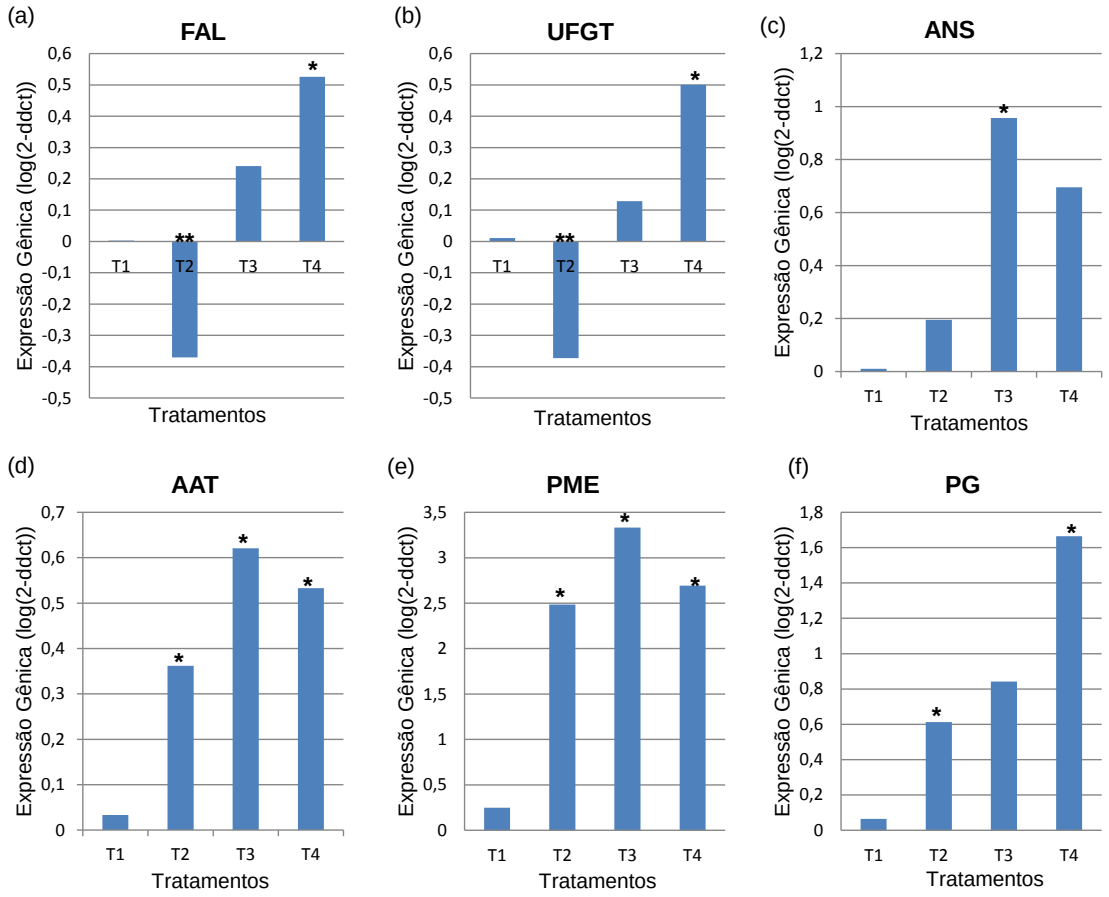


Figura 4. Expressão transcricional dos genes *FAL* (a), *UFGT* (b), *ANS* (c), *AAT* (d), *PME* (e) e *PG* (f) em morangos tratados com: (T1) aplicação pontual de SS, (T2) aplicação prolongada de SS, (T3) AX dose 1 + SS (40mM) e (T4) AX dose 2 + SS (40mM). O asterisco (*) indica diferença estatística em relação ao tratamento T1 ao nível de 5% de significância pelo programa REST sendo: *aumento dos níveis de transcrito e **diminuição dos níveis de transcrito (Transcriptional expression of genes *FAL* (a), *UFGT* (b), *FLS* (c), *ANS* (d), *AAT* (e), *PME* (f) and *PG* (g) in strawberries treated with: (T1) punctual application of SS, (T2)

prolonged application of SS, (T3) SW dose 1 + SS (40mM) e (T4) SW dose 2 + SS (40mM). The asterisk (*) indicates statistical difference compared to T1 at 5% significance by being REST program: * Increased levels of transcript ** and decreased levels of transcript). Pelotas, Embrapa, 2013

Em relação à produção de compostos voláteis dos frutos, no primeiro experimento os valores para *AAT* não apresentaram nenhuma diferença estatística em relação ao controle (Figura 4e). Porém, no segundo experimento foi observado um aumento significativo nos níveis de expressão deste gene para todos os tratamentos comparados ao controle (Figura 4d). Desta forma, os níveis de compostos aromáticos possivelmente foram mais elevados no experimento 2 e possivelmente propiciaram maior qualidade aromática aos morangos.

No segundo experimento, concomitantemente ao aumento dos genes diretamente envolvidos com a produção de flavonoides e do gene relacionado à produção de aromas, o uso de ambas as estratégias de biofortificação resultou também em um aumento considerável da expressão de genes relacionados à degradação de parede celular (comparados ao controle), sugerindo, portanto, que os frutos tratados apresentavam maior produção destas enzimas em função de seu estágio de amadurecimento estar mais avançado, mais maduro. Ou seja, para *PME* ocorre um aumento significativo de transcritos em todos os tratamentos, onde o maior nível de expressão é visualizado no tratamento com AX D1/SS (T3) comparado ao controle (Figura 4e). Os níveis de transcritos da *PG* também sofrem aumentos significativos neste segundo experimento comparados ao controle, e T2 e T4 são os tratamentos que apresentam os níveis de aumento mais significativos (Figura 4f). Este aumento nos níveis de expressão destes genes sugere que os frutos aceleraram seu processo de maturação antes que fossem afetados drasticamente pelo estresse causado pelos tratamentos, ou então um processo de tolerância a essas adversidades foi desenvolvido para que os morangos completassem seu ciclo fenológico.

É sabido que outras estratégias com o objetivo de estimular a produção de compostos que promovem qualidade aos vegetais vem sendo avaliadas. Turhan et al. (2008) avaliaram o efeito do estresse salino moderado sobre a atividade de enzimas oxidativas (auxiliam na remoção de espécies reativas de oxigênio) como catalase, ascorbato peroxidase e lutationa redutase em três cultivares morango, sendo elas Camarosa, Tioga e Chandler. Os resultados apresentaram um acréscimo acentuado na atividade da ascorbato peroxidase nas cultivares

Tioga e Camarosa, sendo esta última, a cultivar que apresentou maior atividade também da glutationa redutase. A atividade das enzimas estudadas permaneceu inalterada em Chandler, sendo assim, Camarosa e Tioga indicaram maior potencial de tolerar o estresse salino. Em um trabalho realizado por Cornish (1992), também utilizando níveis de estresse salino moderado utilizando íons de NaCl e KCl, foi analisado o rendimento de frutos e conteúdo de sólidos solúveis totais em tomate. As três cultivares utilizadas apresentaram respostas semelhantes ao aumento da condutividade elétrica de 1.5 para 9.0 mS/cm, sendo a cultivar Flora Dode a apresentar o maior incremento no conteúdo de sólidos solúveis totais (1,26 Brix) com pouco ou nenhum efeito sobre a produtividade, comprovando que o emprego destas estratégias pode proporcionar mais qualidade às plantas.

Nunes (2009), através de melhoramento genético, conseguiu promover uma biofortificação em alface. O objetivo foi aumentar o teor de folato nesta hortaliça através de transformação genética, sendo utilizado um sistema mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, onde o plasmídio portando a região codificante do gene GTP ciclohidrolase I (*GCHI*) foi inserido nesta folhosa.

O emprego da associação de duas estratégias utilizando estresses abióticos também foi avaliada no trabalho de Cogo et al. (2011), onde foi analisado mudança de cor, compostos bioativos e atividade antioxidante em brócolis submetidos a estresse hídrico moderado e teor normal de água no solo combinado a armazenamento a temperatura ambiente e a baixa temperatura na pós colheita. Os resultados demonstraram uma melhor preservação da cor, atividade antioxidante e conteúdo de ácido L-ascórbico e 5-metil-tetrahidrofolato nas plantas moderadamente estressadas e combinadas com o armazenamento a frio. Sendo assim, houve um incremento de algumas características de qualidade, mostrando que a utilização da associação de estresses moderados podem biofortificar à cultura em questão.

Neste trabalho, a regulação positiva e negativa da expressão dos genes relacionados à qualidade do morango provavelmente ocorreu como uma resposta de defesa aos estresses aplicados, de forma que a aplicação de AX isoladamente ou associada à SS pode ter promovido um efeito bioestimulante, resultando possivelmente em processos de ativação do metabolismo de defesa, maior produção de compostos relacionados ao aroma e aumento da degradação da parede celular. Estes processos promoveram uma aceleração do amadurecimento, uma resultado que pode ser interessante para o produtor, uma vez que a

produtividade destas plantas não foi afetada (em tratamentos com AX ou AX/SS) em relação ao controle (dados não apresentados).

Os resultados de expressão gênica mostraram também que o efeito causado pelos dois tipos de estresses moderados (AX e SS) avaliados neste trabalho foi similar apenas no aspecto "produção de aromas e degradação da parede celular". Porém, além dos aspectos citados, um aumento considerável dos compostos funcionais foi observado somente nas plantas submetidas aos tratamentos que utilizavam AX ou a associação desta com SS, sugerindo então que AX e AX/SS possivelmente causam um aumento mais apreciável das características de qualidade, sendo este efeito estatisticamente significativo com a aplicação de AX D1/SS (experimento 2 – T3).

REFERÊNCIAS

AHARONI A; KEIZER LCP; BOUWMEESTER HJ; SUN Z; ALVAREZ HUERTA M; VERHOEVEN HA; BLAAS J; HOUWELINGEN AV; DE VOS RCH; VOET HVD; JANSEN RC; GUIS M; MOL J; DAVIS RW; SCHENA M; TUNEN AJV; O'CONNELL AP. 2000. Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell* 12: 647-661.

BAKA M; MERCIER J; CORCUFF F; CASTAIGNE F; ARUL J. 1999. Photochemical treatment to improve storability of fresh strawberries. *Journal of Food Science* 64: 1068-1072.

BEEKWILDER J; ALAVAREZ-HUERTA M; NEEF E; VERSTAPPEN FWA; BOUWMEESTER HJ; AHARONI A. 2004. Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. *Plant Physiology* 135: 865-1878.

BUSTIN SA; BENES V; GARSON JA; HELLEMANS J; HUGGETT J; KUBISTA M; MUELLER R; NOLAN T; PFAFFL MW; SHIPLEY GL; VANDESOMPELE J; WITTWER CT. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 55: 611-622.

CHITARRA MIF; CHITARRA AB. 2005. *Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio*. Lavras: Editora UFLA. 783 p.

COGO SLP; CHAVES FC; SCHIRMER MA; ZAMBIAZI RC; NORA L; SILVA JA; ROMBALDI CV. 2011. Low soil water content during growth contributes to preservation of green colour and bioactive compounds of cold-stored broccoli (Brassica oleraceae L.) florets. *Postharvest Biology and Technology* 60: 158-163.

CORNISH PS. 1992. Use of high electrical conductivity of nutrient solution to improve the quality of salad tomatoes (Lycopersicon esculentum) grown in hydroponic culture. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 32: 513–520.

CQFS – COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO- RS/SC. 2004. *Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina*. Porto Alegre: SBCS - Núcleo Regional Sul/UFRGS. 400 p.

EL SHARKAWY I; MANRIQUEZ D; FLORES F B; REGAD F; BOUZAYEN M; LATCHE A; PECH JC. 2005. Functional characterization of a melon alcohol acyl - transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine reside for enzyme activity. *Plant Molecular Biology* 59: 345-362.

LICHTENTHALER HK. 2004. El estrés y la medida del estrés en plantas. In: REIGOSA MJ; PEDROL N; SÁNCHEZ A (eds). *La Ecofisiología Vegetal - Una ciencia de síntesis*. Madrid: Thomson. p. 59-111.

LUCCHETTA L. 2007. *Caracterização de melões transgênicos ACC oxidase antisense e estudo bioquímico de álcool aciltransferases envolvidas na biossíntese de aromas*. Pelotas: UFPel-FAEM.105p. (Tese doutorado).

MESSIAS RS; GALLI V; SILVA SDA; SCHIRMER MA; PILLON CN. 2010. *Metodologias de extração e avaliação semi-quantitativa da expressão de genes de metabolismo secundário do milho (Zeamays L.)*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 25p.

MESSIAS RS. 2011. *Respostas bioquímico-fisiológicas e agronômicas em alface e milho em função da aplicação de água de xisto.* Pelotas: UFPel-FAEM. 152p. (Tese doutorado).

NUNES ACS. 2009. *Biofortificação de plantas de alface (Lactuca sativa L.) geneticamente modificadas para aumento do teor de folato*. Brasília: UNB. 134p. (Tese doutorado).

OLIVEIRA RP; NINO AFP; SCIVITTARO WB. 2005. Mudas certificadas de morangueiro: maior produção e melhor qualidade da fruta. *A Lavoura* 108: 35-38.

PEREZ AG; SANZ C; OLÍAS R; RÍOS JJ; OLÍAS JM. 1996. Evolution of strawberry alcohol acyltransferase activity during fruit development and storage. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 44: 3286-3290.

PFAFFL MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 2002-2007.

PFAFFL MW; Horgan WG; Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30:1-10.

POMBO MA; DOTTO MC; MARTÍNEZ GA; CIVELLO PM. 2009. UV-C irradiation delays strawberry fruit softening and modifies the expression of genes involved in cell wall degradation. *Postharvest Biology and Technology* 51: 141-148.

SALENTIJN EMJ; AHARONI A; SCHAART JG; BOONE MJ; KRENS FA. 2003. Differential gene expression analysis of strawberry cultivars that differ in fruit-firmness. *Physiologia Plantarum* 118: 571-578.

SEVERO J. 2009. *Maturação e UVC na expressão transcricional de genes envolvidos nas rotas metabólicas de parede celular, compostos fenólicos e aromas em morango*. Pelotas: UFPel-FAEM. 94p. (Dissertação mestrado).

TAIZ L; ZEIGER E. 2004. *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre: Artmed. 719p.

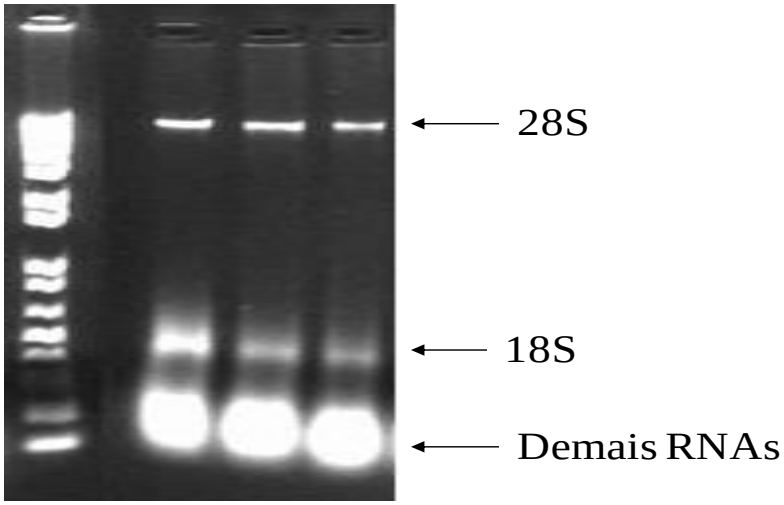
TURHAN E; GULEN H; ERIS A. 2008. The activity of antioxidative enzymes in three strawberry cultivars related to salt-stress tolerance. *Acta Physiologiae Plantarum* 30: 201-208.

YUNES RA; CALIXTO JB. 2001. *Plantas Medicinais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó: Argos. 523p.

Figura 3. Em destaque o tratamento T2 do experimento 1. As plantas submetidas a este tratamento foram visualmente afetadas (Featured T2 treatment of experiment 1. Plants subjected to this treatment were affected visually). Pelotas, Embrapa, 2013

ANEXOS

Anexo 1. A figura abaixo mostra a qualidade (avaliada por eletroforese em gel de agarose) de algumas amostras de RNA escolhidas aleatoriamente (The figure below shows the quality (assessed by agarose gel electrophoresis) of some RNA samples randomly chosen). Pelotas, Embrapa, 2013



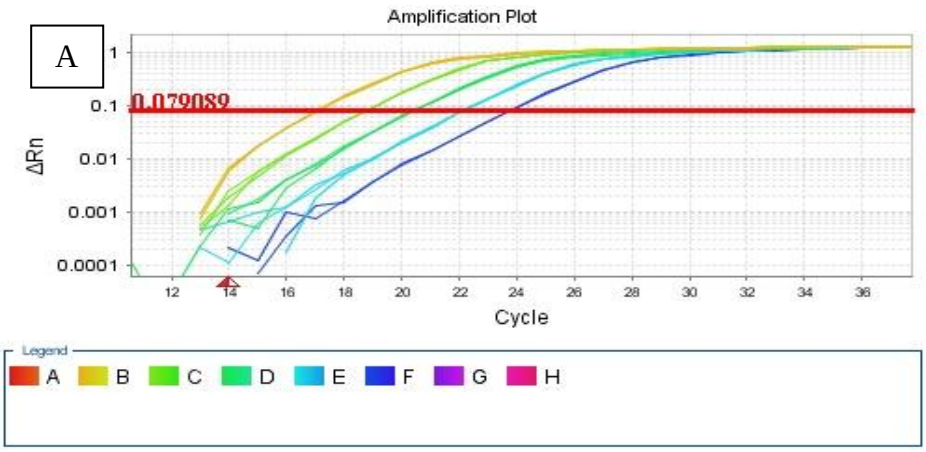
Anexo 2. Sequência, tamanho, eficiência de amplificação e temperatura de dissociação dos *primers* que foram utilizados para avaliar a expressão de genes da rota de fenilpropanoides, aromas e parede celular e *primers* desenhados para uso como genes de referência em morangos submetidos a estresse abiótico (Sequence, size, amplification efficiency and dissociation temperature of the primers that were used to evaluate of gene expression of phenylpropanoids pathway, flavorings, cell wall and primers designed for use as reference genes in strawberries subjected to abiotic stress). Pelotas, Embrapa, 2013

Primer	*Forward*	*Reverse*	Tamanho (pb)	Eficiência (%)	Temperatura de dissociação
ANS	CACCTTCATCCTCCACAACATGGTT	AATGCTCTTCTACTTGCCGTTGCTT	138	66,468	84,29
FAL	AACCACGACATTTCCAACGAGGC	GCCCTACCATTGATTTCAGCGAC	115	101,094	84,39
FLS	TCACCCTCGAGGTTCTGTGA	TCAACGGATATGTAGCGCTGC	101	89,949	82,03
UFGT	CAAGCAGTCCAACAGCTCAATC	GAAAACATACCCCTCCGGCAC	106	87,227	79,89
AAT	CCAGTCAACGTTTTCGATTCTGGAA	TGATATTTTCACGACACCCTCGAAA	125	96,327	81,97
PG	ACCAATTGAAGCCCAATTAGCAAAT	ATTGCAGTCGTTGTCTTTCCAAGAA	130	79,591	78,18
PME	CCGGATTACAGCTTGAAGCGCTAT	AGTAGCATCCATGCCATCTCCGAT	152	80,064	77,66
18S	TGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAA	GAAGTCGGGATTTGTTGCACGTATT	109	75,939	80,97
GAPDH	CCAAGGCTGTCGGAAAGGTT	CAACATCATCTTCGGTGTAACCC	203	112,823	84,77

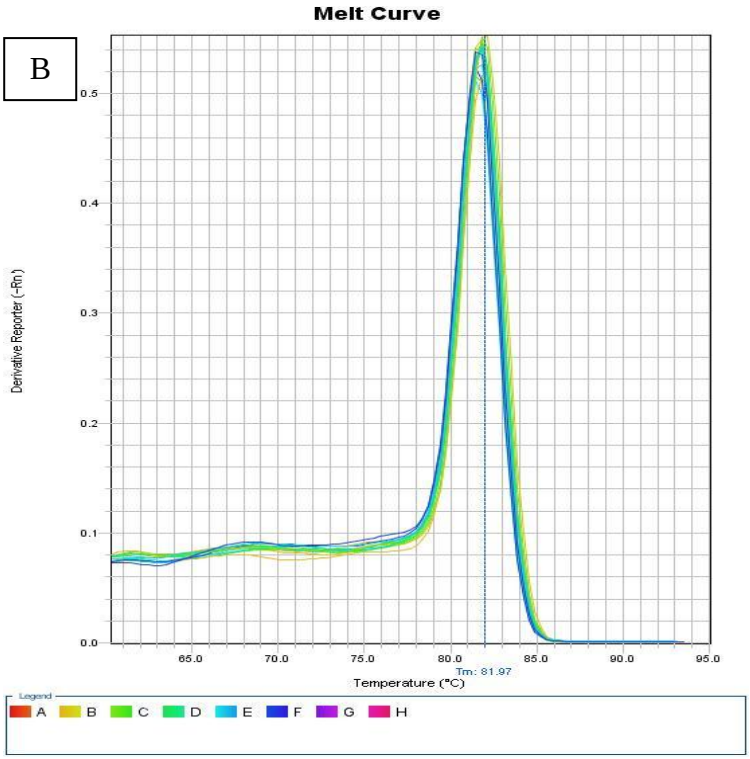
Anexo 3. Os *primers* propostos apresentaram *amplicon* específico quando utilizados nas concentrações apresentadas abaixo (The proposed primers showed specific amplicon when used at the concentrations shown below). Pelotas, Embrapa, 2013

Primer	Concentração (mM)
FAL	0,2
FLS	0,04
UFGT	0,2
ANS	0,2
AAT	0,16
PME	0,2
PG	0,16
18S	0,08
GAPDH	0,08

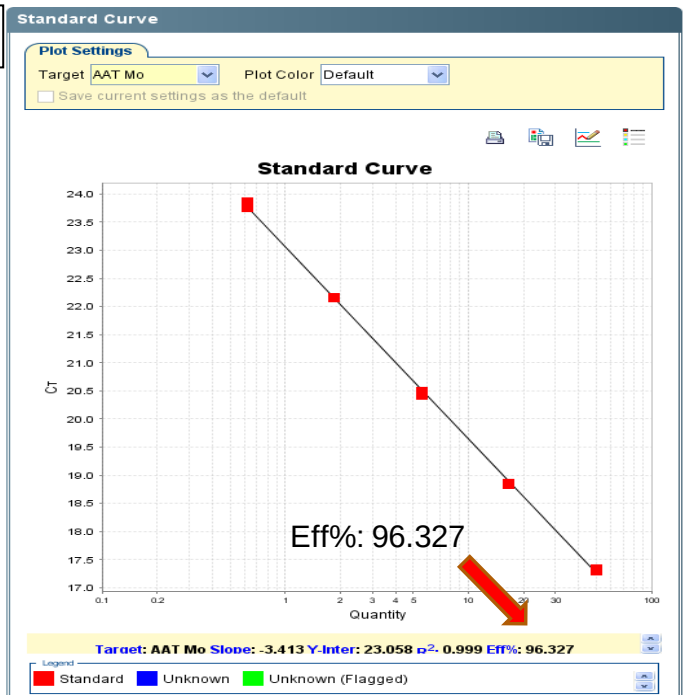
Anexo 4. Teste de eficiência do *primer AAT*. A: curva de amplificação utilizando diferentes concentrações de cDNA. B: curva de melting gerada após a amplificação. C: curva padrão mostrando a eficiência de amplificação do *primer* (Test efficiency of *AAT primer*. A - amplification curve using different cDNA concentrations. B - melting curve generated after amplification. C - standard curve showing the efficiency of amplification *primer*). Pelotas, Embrapa, 2013



B


Melt Curve
Derivative Reporter (-Rn')
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
65.0
70.0
75.0
80.0
85.0
90.0
95.0
Tm: 81.97
Temperature (°C)
Legend
A
B
C
D
E
F
G
H

C


Standard Curve
Plot Settings
Target AAT Mo
Plot Color Default
Save current settings as the default
Standard Curve
Ct
24.0
23.5
23.0
22.5
22.0
21.5
21.0
20.5
20.0
19.5
19.0
18.5
18.0
17.5
17.0
0.1
0.2
1
2
3
4
5
10
20
30
100
Quantity
Eff%: 96.327
Target: AAT Mo Slope: -3.413 Y-Inter: 23.058 R2: 0.999 Eff%: 96.327
Legend
Standard
Unknown
Unknown (Flagged)

Anexo 5. Visão geral do experimento (Overview of the experiment). Pelotas, Embrapa, 2013

Conclusões

Neste trabalho, a regulação positiva e negativa da expressão dos genes relacionados à qualidade do morango provavelmente ocorreu como uma resposta de defesa aos estresses aplicados, de forma que a aplicação de AX isoladamente ou associada à SS pode ter promovido um efeito bioestimulante, resultando possivelmente em processos de ativação do metabolismo de defesa, maior produção de compostos relacionados ao aroma e aumento da degradação da parede celular. Estes processos promoveram uma aceleração do amadurecimento, uma resultado que pode ser interessante para o produtor, uma vez que a produtividade destas plantas não foi afetada (somente para tratamentos com AX ou AX/SS) em relação ao controle (dados não apresentados).

Os resultados de expressão gênica mostraram também que o efeito causado pelos dois tipos de estresses moderados (AX e SS) avaliados neste trabalho foi similar apenas no aspecto “produção de aromas e degradação da parede celular”. Porém, além dos aspectos citados, um aumento considerável dos compostos funcionais foi observado somente nas plantas submetidas aos tratamentos que utilizavam AX ou a associação desta com SS, sugerindo então que AX e AX/SS possivelmente causam um aumento mais apreciável das características de qualidade, sendo este efeito estatisticamente significativo com a aplicação de AX D1/SS (experimento 2 – T3).

Dessa maneira, a análise da expressão gênica assume papel chave no entendimento de genes envolvidos em resposta ao estresse, o que permitirá futuramente uma maior compreensão no direcionamento de rotas metabólicas envolvidas nas respostas fisiológicas aos estresses abióticos.

Referências

AHARONI, A.; KEIZER, L. C. P.; BOUWMEESTER, H. J.; SUN, Z.; ALVAREZ HUERTA, M.; VERHOEVEN, H. A.; BLAAS, J.; HOUWELINGEN, A. V.; DE VOS, R. C. H.; VOET, H, V. D.; JANSEN, R. C.; GUIS, M.; MOL, J.; DAVIS, R. W.; SCHENA, M.; TUNEN, A. J. V.; O'CONNELL, A. P. Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. **Plant Cell**, v.12, n.5, p.647-661, maio. 2000.

ALMEIDA, J. R. M.; D'AMICO, E.;PREUSS, A.; CARBONE, F.; RIC DE VOS, C.H.; DEIML, B.; MOURGUES, F.; PERROTTA, G.; FISCHER, T. C.; BOVY, A.; MARTENS, S.; ROSATI, C. Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria* x *ananassa*). **Archives of Biochemistry and Biophysics.** v.465, p.61-71, 2007.

BAKA, M.; MERCIER, J.; CORCUFF, F.; CASTAIGNE, F.; ARUL, J. Photochemical treatment to improve storability of fresh strawberries. **Journal of Food Science**, v.64, n.6, p.1068-1072, nov.1999.

BEEKWILDER, J.; ALAVAREZ-HUERTA, M.; NEEF, E.; VERSTAPPEN, F. W. A.; BOUWMEESTER, H. J.; AHARONI, A. Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. **Plant Physiology**. v.135, n.4, p.1865-1878, ago. 2004.

BRAY, Elizabeth. A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**.v.103, n.4, p. 1035-1040, dez. 1993.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.34, p.597-601, jun. 2005.

BUSTIN S. A.; BENES V.; GARSON J. A.; HELLEMANS J.; HUGGETT J.; KUBISTA M.; MUELLER R.; NOLAN T.; PFAFFL M. W.; SHIPLEY G. L.;

BUTTERY, R. G.; LING, L. C. Volatile Components of Tomato Fruit and Plant Parts.In: TERANISHI, R.; BUTTERY, R. G.; SUGISAWA, H. **Bioactive Volatiles from Plants**. Washington, DC: American ChemicalSociety,1993. p.23-34.

CAMARA, T. R.; WILLADINO, L. Compreendendo o estresse abiótico in vitro. In: NOGUEIRA, R. J. M.; ARAÚJO, E. L. A.; WILLADINO, L.; MAAZE, U. **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Recife: MXMGráfica e Editora, 2005. p.325-335.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças**: fisiologia e manuseio. 2.ed. Lavras: Editora UFLA, 2005. 783p.

COGO S. L. P.; CHAVES F. C.; SCHIRMER M. A.; ZAMBIAZI R. C.; NORA L.; SILVA J. A.; ROMBALDI C. V. Low soil water content during growth contributes to preservation of green colour and bioactive compounds of cold-stored broccoli (Brassica oleraceae L.) florets. **Postharvest Biology and Technology** v. 60, n.2, p.158-163, maio. 2011.

CORNISH P. S. Use of high electrical conductivity of nutrient solution to improve the quality of salad tomatoes (Lycopersicon esculentum) grown in hydroponic culture. **Australian Journal of Experimental Agriculture** v. 32, n.4, p.513–520, 1992.

CQFS – Comissão de Química e Fertilidade do Solo- RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10.ed. Porto Alegre: SBCS - Núcleo Regional Sul/UFRGS, 2004. 400 p.

DARROW, George M. **The strawberry**: History, Breeding and Phisiology. New York: Holt, Rinehart and Wiston, 1966. 447p.

DUARTE FILHO, J.; ANTUNES, L.E.C.; PÁDUA, J.G. Introdução e avaliação de cultivares de morangueiro no Sul de Minas Gerais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.21, n.2, 2003. Suplemento.CD-ROM.

EL SHARKAWY, I.; MANRIQUEZ, D.; FLORES, F. B.; REGAD, F.; BOUZAYEN, M.; LATCHE, A.; PECH, J. C. Functional characterization of a melon alcoholacyl - transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine reside for enzyme activity. **Plant Molecular Biology**, v. 59, n.2, p.345-362, set. 2005.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Sistema de produção do morango, [2005]. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/SistemaProducaoMorango/index.htm>. Acesso em: 28 ago. 2012.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Estresse biótico e abiótico de plantas, [2012]. Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/_pdi/02pdi_grupo2_estresse_biotico.html>. Acesso em: 12 ago. 2012.

FELLMAN, J. K.; MATTHEIS, J. P.; MATTHINSON, D. S.; BOSTICK, B. C. Assay of acetyl-CoA alcohol transferase in ‘delicious’ apples. **Hort Science**, v.26, n.6, p.773-776, jun. 1991.

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v.30, n.6, p.503-512, jun. 2002.

HARADA, M.; UEDA, Y.; IWATA, T. Purification and some properties of alcohol acyltransferase from banana fruit. **Plant &Cell Physiology**, v.26, n.6, p.1067-1074, set. 1985.

HEUER, B.; NADLER, A. Physiological response of potato plants to soil salinity and water deficit. **Plant Science**, v.137, n. 1, p.43-51, set. 1998.

JIA, L.; QINGTIAN, L.; JIN, K.; XUEFENG, X.; ZHENHAI, H. Microarray analysis of salt-stress responsive genes in Maluszumi mats. **Journal of China Agricultural University**. v.14, n.5, p.61-67, 2009.

KIM, D. W.; RAKWAL, R.; AGRAWAL, G. K.; JUNG, Y. H.; SHIBATO, J.; JWA, N. S.;IWAHASHI, Y.; IWAHASHI, H.; KIM, D. H.; SHIM, I. S.; USUI, K. A hydroponic rice seedling culture model system for investigating proteome of salt stress in rice leaf. **Electrophoresis**, v.26, n.23, p.4521-4539, dez. 2005.

KRIEG, D. R. Stress tolerance mechanisms in above ground organs. In: PROCEEDINGS OF THE WORKSHOP ON ADAPTATION OF PLANTS TO SOIL STRESS, 1993.Nebraska: INTSORMIL, 1993. p. 65-79.

LICHTENTHALER, Hartmut, K. El estrés y la medidadelestrésen plantas. In:REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; SÁNCHEZ, A. **La Ecofisiología Vegetal - Una ciencia de síntesis**. Madrid: Thomson, 2004. p.59-111.

LUCCHETTA, Luciano. **Caracterização de melões transgênicos ACC oxidase antisense e estudo bioquímico de álcool aciltransferases envolvidas na biossíntese de aromas**. 2007. 105f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial)-Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.444, n.2, p.139-158, dez. 2006.

MESSIAS, Rafael da Silva et al. **Metodologias de extração e avaliação semi-quantitativa da expressão de genes de metabolismo secundário do milho (*Zeamays* L.).** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 25p.

MESSIAS, Rafael S. **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.

MILLER, T. W.; FELLMAN, J. K.; MATTHEIS, J. P.; MATTINSON, D. S. Factors that influence volatile ester biosynthesis in 'Delicious' apples. **Acta Horticulturae**, n.464, p.195–200, 1998.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, v.17, n. 4, p.411-424, 2004.

NUNES, Aline C. S. **Biofortificação de plantas de alface (Lactuca sativa L.) geneticamente modificadas para aumento do teor de folato**. 2009. 134f. Tese Tese (Doutorado em Biologia Molecular)-Universidade de Brasília, Brasília.

OLIVEIRA, R. P.; NINO, A. F. P.; SCIVITTARO, W. B. Mudas certificadas de morangueiro: maior produção e melhor qualidade da fruta**. A Lavoura**, v.108, n.655, p.35-38, dez. 2005.

PEREZ, A. G.; SANZ, C.; OLÍAS, J. M. Partial purification and some properties of alcohol acyltransferase from strawberry fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p.1462-1466, 1993.

PEREZ, A. G.; SANZ, C.; OLÍAS, R; RÍOS, J. J.; OLÍAS, J. M. Evolution of strawberry alcohol acyltransferase activity during fruit development and storage. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v.44, n.10, p. 3286-3290, 1996.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.9, p.2002-2007, maio 2001.

PFAFFL, M. W; Horgan, W. G.; Dempfle, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative

expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**. v.30, n.9, p.1-10, march 2002.

POMBO, M. A.; DOTTO, M. C.; MARTÍNEZ, G. A.; CIVELLO, P. M. UV-C irradiation delays strawberry fruit softening and modifies the expression of genes involved in cell wall degradation. **Postharvest Biology and Technology**, v.51, n.2, p.141-148, fev. 2009.

SALENTIJN, E. M. J.; AHARONI, A.; SCHAART, J. G.; BOONE, M. J.; KRENS, F. A. Differential gene expression analysis of strawberry cultivars that differ in fruit-firmness. **Physiologia Plantarum**, v.118, n.4, p.571-578, ago. 2003.

SEVERO, Joseana. **Maturação e UVC na expressão transcricional de genes envolvidos nas rotas metabólicas de parede celular, compostos fenólicos e aromas em morango.** 2009. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial)-Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

SEVERO, J.; TIECHER, A.; CHAVES, F. C.; SILVA J. A.; ROMBALDI, C. V. Gene transcript accumulation associated with physiological and chemical changes during developmental stages of strawberry cv. Camarosa. **Food Chemistry**, v.126, n.3, p.995-1000, jun. 2011.

SHANNON, Michael C. Adaptation of plants to salinity. **Advances in Agronomy**, v.60, p.75-120, 1997.

SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Y. Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiology**, v.115, n.2, p.327-334, out. 1997.

SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Y.; SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Plant Biology**, v.6, n.5, p.410-417, out. 2003.

SUN, J.; LIU, R.H. Cranberry phytochemical extracts induce cell cycle arrest and apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. **Cancer Letters***,* v.241, n.1, p.124-134, set. 2006.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia Vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 719p.

TURHAN E.; GULEN H.; ERIS A. The activity of antioxidative enzymes in three strawberry cultivars related to salt-stress tolerance. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.30, n.2, p.201-208, 2008.

UEDA, Y.; FUJISHITA, N.; CHACHIN, K. Presence of alcohol acyltransferase in melons (*Cucumismelo* L.). **Postharvest Biology and Technology**, v.10, n.2, p.121-126, fev. 1997.

VIEIRA, E. L.; CASTRO, P. R. C. Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor de plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja. **Revista Brasileira de Sementes,** v. 23, n.2, p.222-228, dez. 2001.

WANG, J.; DE LUCA, V. D. The biosynthesis and regulation of biosynthesis of Concord grape fruit esters, including ‘foxy’ methylanthranilate. **The Plant Journal**, v.44, n.4, p.606-619, nov. 2005.

YAZAKI, Kazufumi. ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. **FEBS Letters**, v.580, n.4, p.1183-1191, fev. 2006.

YUNES, Rosendo. A.; CALIXTO, João. B. **Plantas Medicinais**: sob a ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó: Argos, 2001. 523p.

ZHU, C.; NAQVI, S.; GOMEZ-GALERA, S.; PELACHO, A. M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. Transgenic strategies for the nutritional enhancement of plants.**Trends in Plant Science**, v.12, n.12, p.548-555, dez. 2007.