UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec

Curso de Graduação em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso

Isolamento de RNA e definição de oligonucleotídeos para avaliação da expressão de genes relacionados à biofortificação de alface (*Lactuca sativa* L.) em condições de estresse hídrico moderado

Uli Trindade de Almeida

2018

Uli Trindade de Almeida

Isolamento de RNA e definição de oligonucleotídeos para avaliação da expressão de genes relacionados à biofortificação de alface (*Lactuca sativa* L.) em condições de estresse hídrico moderado

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Acadêmico: Profa. Dra. Vanessa Galli

Orientador do Estágio: Tatiane Jéssica Siebeneichler

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

A314i Almeida, Uli Trindade de AlmIsolamento de RNA e definição de oligonucleotídeos para avaliação da expressão de genes relacionados à biofortificação de alface (Lactuca sativa L.) em condições de estresse hídrico moderado / Uli Trindade de Almeida ; Vanessa Galli, orientadora ; Tatiane Jéssica Siebeneichler, coorientadora. — Pelotas, 2018. Alm62 f. : il.

AlmTrabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

Alm1. Hortaliça. 2. Elicitores. 3. Rt-qpcr. 4. Compostos funcionais. I. Galli, Vanessa, orient. II. Siebeneichler, Tatiane Jéssica, coorient. III. Título.

CDD : 583.214

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Uli Trindade de Almeida

Isolamento de RNA e definição de oligonucleotídeos para avaliação da expressão de genes relacionados à biofortificação de alface (*Lactuca sativa* L.) em condições de estresse hídrico moderado

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, do Departamento de Desenvolvimento Tecnológico - Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 30 de Novembro de 2018.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Vanessa Galli (Orientadora)
Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dra. Isabel Lopes Vighi
Doutora em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Pelotas.

Msc. Rosane Crizel
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas.

Tatiane Jéssica Siebeneichler
Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Dedico este trabalho aos meus pais Rui e Simone. Agradeço por estarem sempre ao meu lado e pelo apoio incondicional. A minha luta sempre foi a de vocês, a minha vitória será sempre nossa.

Agradecimentos

A Deus, por conceder o que eu preciso, sempre na hora certa.

Aos meus pais Rui e Simone, por acreditarem no meu potencial, pela força, amor e carinho nos momentos difíceis e pelo constante incentivo ao meu crescimento. Ao meu irmão, Iur, pela grande amizade, cumplicidade, apoio e inúmeros conselhos ao longo dessa caminhada. A minha família, por me inspirarem a ser melhor a cada dia. Amo muito vocês.

Ao meu namorado Kelter, pela paciência, amor e cuidado, por ser meu ponto de paz. Eu existo em dois lugares, um deles sempre será ao seu lado.

Aos meus amigos, por dividirem as alegrias e angústias durante esse período.

Aos meus colegas de laboratório, pela amizade, comprometimento e por me auxiliarem em diversas etapas desse trabalho.

A minha orientadora de estágio Tatiane, pela disposição em sempre estar pronta para ajudar.

A Drª. Isabel e Msc. Rosane, pela amizade e dedicação com que me orientaram, tornando possível a realização desse trabalho.

A minha incrível orientadora, professora Drª. Vanessa Galli, que foi fundamental no meu crescimento e desenvolvimento ao longo do curso, obrigada pela generosidade em ensinar e por confiar na minha capacidade no momento em que eu precisei, serei eternamente grata.

Ao curso de Biotecnologia, pelo ambiente propício à evolução e crescimento, por estimular nossa curiosidade e proporcionar ferramentas para saná-las.

A Universidade Federal de Pelotas, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pelo apoio financeiro e concessão de bolsas.

Meu muito obrigada!

“We must have perseverance and above all confidence in ourselves” – Marie Curie

“Eu não tenho paredes. Só tenho horizontes.” – Mário Quintana

Resumo

ALMEIDA, Uli Trindade de. **Isolamento de RNA e definição de oligonucleotídeos para avaliação da expressão de genes relacionados à biofortificação de alface (*Lactuca sativa* L.) em condições de estresse hídrico moderado**. 2018. 62f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

A aplicação de estresses em plantas é considerado um mecanismo de biofortificação em culturas alimentícias, pois as tornam mais eficientes em ambientes com poucos recursos. A alface (*Lactuca stativa* L.) é uma das hortaliças mais consumidas em todo o mundo. Desta forma, no presente estudo foi realizada a aplicação de estresse hídrico moderado em alfaces, para avaliação futura do efeito sobre o conteúdo de compostos funcionais e a expressão de genes associados ao metabolismo destes compostos, através da técnica de PCR em tempo real. Para realização desta última análise se faz necessário obter RNA em quantidade e qualidade adequados, conhecer os genes associados à síntese desses compostos, e projetar oligonucleotídeos eficientes para uso na técnica. Assim, este estudo objetivou avaliar metodologias de isolamento de RNA e definir oligonucleotídeos para avaliação, por PCR em tempo real, da expressão de genes associados à síntese de compostos funcionais em alfaces cultivadas sob condições de estresse hídrico moderado. Dentre as metodologias utilizadas, a metodologia CTAB modificada foi a que apresentou melhores resultados, possibilitando a obtenção de RNA em quantidade e qualidade satisfatórias. Dois genes do metabolismo de compostos fenólicos, 10 do metabolismo de ácido L-ascórbico e um do metabolismo do tocoferol, além de cinco genes de referência foram amplificados com eficiência em PCR convencional. Sendo esses resultados úteis para trabalhos posteriores afim de elucidar melhor a expressão dos genes avaliados.

Palavras-Chave: hortaliças; elicitores; RT-qPCR; compostos funcionais.

Abstract

ALMEIDA, Uli Trindade de. **Isolation of RNA and definition of oligonucleotides for the evaluation of the expression of genes related to the biofortification of lettuce (*Lactuca sativa L.*) under conditions of moderate water stress.** 2018. 62s. Term paper (Bachelor of Biotechnology) - Technology Development Centre, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2018.

The application of stresses in plants is considered a mechanism of biofortification in food crops, because they make them more efficient in environments with few resources. Lettuce (*Lactuca stativa* L.) is one of the most consumed vegetables in the world. Thus, in the present study the application of moderate water stress in lettuces was carried out for future evaluation of the effect on the content of functional compounds and the expression of genes associated to the metabolism of these compounds through Real time PCR technique. To perform this last analysis it is necessary to obtain RNA in adequate quantity and quality, to know the genes associated to the synthesis of these compounds, and to design efficient oligonucleotides for use in the techique. Thus, this study aimed to evaluate methodologies of RNA isolation and to define oligonucleotides for Real time PCR evaluation of the expression of genes associated with the synthesis of functional compounds in lettuces grown under conditions of moderate water stress. Among the methodologies used, the modified CTAB method was the one that presented the best results, allowing the obtaining of RNA in satisfactory quantity and quality. Two genes from the metabolism of phenolic compounds, 10 from L-ascorbic acid metabolism and one from tocopherol metabolism, as well as five reference genes were amplified efficiently in conventional PCR. These results are useful for future work in order to better elucidate the expression of the evaluated genes.

Keywords: vegetables; elicitors; RT-qPCR; functional compounds

Lista de Figuras

Figura 1 Biossíntese de compostos fenólicos a partir da via do ácido chiquímico..... 23

Figura 2 Rota metabólica de fenilpropanóides em plantas..... 24

Figura 3 Rota metabólica do ácido L-ascórbico mostrando importantes moléculas precursoras envolvidas..... 27

Figura 4 Síntese de tocoferóis a partir de 4-Hidroxifenilpiruvato..... 29

Figura 5 Cutivo de alface sob condições de estresse hídrico 39

Figura 6 Verificação da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos projetados..... 50

Lista de Tabelas

Tabela 1 Tabela referente aos dias de estresse, contendo temperatura e umidade..... 40

Tabela 2 Comparação entre metodologias de isolamento de RNA a partir de folhas de alface..... 43

Tabela 3 Oligonucleotídeos projetados para uso em RT-qPCR..... 47

Lista de Abreviaturas e Siglas

AA	Ácido Araquidônico
ABA	Ácido Abcísico
APX	Ascobato peroxidase
CTAB	*Cetyl trimethyl Ammonium Bromide*
DEPC	Dietilpolicarbonato
DMPQ	2,3–dimetil-5 fitil benzoquinona
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EROS	Espécies reativas do oxigênio
FAL	Fenilalanina amonia-liase
FLS	Flavonol sintase
GDP	Guanidina difosfato
GLDH	L-galactose desidrogenase
GMP	GDP manose pirofosforilase
HGA	Ácido homogentísico
HPP	4-hidroxifenilpiruvato
JA	Ácido Jasmônico
L-Gal	L-galactose
L-GalDH	L-galactona-1,4-lactona desidrogenase
LiCl	Cloreto de Lítio
MPQ	2 metil- 6 fitil- 1,4- benzoquinonametiltransfertase
NaAc	Acetato de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
RT-qPCR	PCR Quantitativa em Tempo Real
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TRIS	Trisaminoetano
UFGT	UDP flavonoide glicosiltranferase
VTE2	Homogenisato preniltransferase

Sumário

1. Introdução **14**
2. Objetivos **16**
Objetivos específicos 16
3. Revisão Bibliográfica **17**
3.1. Alface 17
3.2. Utilização de estresses moderados como estratégia de biofortificação de compostos funcionais 19
3.3. Compostos funcionais de interesse na alface 22
3.4. Análise de expressão genica 31
4. Material e Métodos **34**
4.1 Condições experimentais do material vegetal 34
4.2 Desenho de oligonucleotídeos para RT-qPCR 34
4.2.1. Método CTAB 35
4.2.2. Método CTAB modificado 35
4.2.3. Plant RNA Reagent 36
4.2.4. TRIzol 36
4.2.5. Avaliação da qualidade e quantidade de RNA isolado 37
4.3. Avaliação da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos por RT-qPCR 37
4.4. Extração de RNA utilizando diferentes métodos 37
5. Resultados e Discussão **38**
5.1. Cultivo de alface sob condições de estresse hídrico moderado 38
5.2. Isolamento de RNA a partir de folhas de alface 41
5.3. Amplificação de oligonucleotídeos projetados para uso em RT-qPCR 45
6. Conclusões **52**
7 . Referências Bibliográficas **53**

1 Introdução

Durante o terceiro semestre do curso de Biotecnologia, ingressei como estagiária no laboratório de Biotecnologia Vegetal coordenado pela professora Drª. Luciana Bicca Dode, onde aprendi técnicas de cultivo de tecidos vegetais e participei do projeto intitulado “Cultura de tecidos de Pinhão-Manso”.

No decorrer do sexto semestre, passei a fazer parte do grupo de pesquisa em genômica vegetal, sob orientação da professora Drª. Vanessa Galli e co-orientação do professor Dr. César Valmor Rombaldi, vinculado ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – DCTA. Durante este período fui bolsista de Iniciação Científica UFPel do projeto ‘Aspectos bioquímico-moleculares e tecnológicos de atributos de qualidade nutricional, sensorial e funcional em frutas e hortaliças’, e posteriormente no projeto intitulado ‘Identificação dos mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos nos processos de amadurecimento e de biofortificação de frutos de morango submetidos a estresses osmóticos’.

Para realizar o estágio final de conclusão de curso, passei a estudar o efeito de estresse hídrico controlado sobre os compostos funcionais de alface (*Lactuca sativa* L.). O estágio foi realizado sob orientação da Bacharela em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Tatiane Jéssica Siebeneichler e durante este período tive experiência desde o cultivo da hortaliça até a execução de técnicas de Biologia Molecular, que fizeram com que ampliasse o conhecimento adquirido durante a graduação, em sala de aula, de forma a auxiliar a minha formação e na elaboração deste Trabalho de Conclusão de Curso.

Atualmente a biofortificação se tornou uma ferramenta necessária para incrementar compostos funcionais em diferentes culturas vegetais, devido a demanda populacional e o efeito benéfico que oferece à saúde. A alface é uma das hortaliças de consumo diário mais popular em todo o mundo, se tornando um alimento interessante para biofortificar.

O aumento desses compostos pode ser obtido através de estresses moderados; entretanto trabalhos acerca do assunto são escassos, não havendo confirmações que de fato ocorra o aumento desses compostos, e quais seriam os genes envolvidos nesse processo. Dessa forma, se torna

necessário quantificar os compostos, mas também analisar a expressão de genes associados, que pode ser feito com RT-qPCR, técnica padrão-ouro para esta análise. Para isso é preciso determinar o melhor método de isolamento de RNA visando quantidade e qualidade adequados, e determinar oligonucleotídeos que sejam ideais para uso em PCR em tempo real.

2 Objetivo

2.1 Objetivo geral

Avaliar metodologias de isolamento de RNA e definir oligonucleotídeos para avaliação, por PCR em tempo real, da expressão de genes associados à síntese de compostos funcionais em alfaces cultivadas sob condições de estresse hídrico moderado.

2.2 Objetivos específicos

- Cultivar alface sob condições de estresse hídrico moderado;
- Avaliar a quantidade e a qualidade do RNA isolado a partir de folhas de alface, utilizando diferentes metodologias;
- Projetar oligonucleotídeos para avaliação da expressão por PCR em tempo real de genes relacionados à síntese de compostos funcionais em alface;
- Avaliar a eficiência de amplificação dos genes de interesse através de PCR, utilizando os oligonucleotídeos projetados.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta herbácea, pertencente à família Compositae (CHON et al., 2005), sendo esta espécie a única domesticada de um gênero com mais de cem espécies selvagens (LEBEDA et al., 2013). Esta planta apresenta consistência tenra, folhas que ficam presas, unidas ao pequeno caule, é oriunda de clima temperado, e se mostra a hortaliça folhosa mais popular cultivada e consumida ao longo de todo ano (ZDRAVKOVIC´ et al., 2014). Além disso, é uma fonte de compostos funcionais e nutraceuticos.(LLORACH et al., 2008).

Acredita-se que a alface tenha origem no Mediterrâneo oriental, onde foram localizadas pinturas datadas de 4.500 antes de Cristo. No continente americano teve seu ingresso durante as expedições de Cristóvão Colombo, em 1494, e no Brasil sua descrição inicial ocorreu através de uma carta à Coroa, em que o Padre Jesuíta Fernão Cardim relata que alface e outras hortaliças, trazidas de Portugal, se adaptaram muito bem em nova terra (ECHER et al., 2016).

Essa hortaliça possui significativa relevância em caráter econômico mundial, com destaque para Europa e Estados unidos, áreas nas quais há maior produção e consumo de alface. Itália, Espanha, França, Holanda e Reino Unido são, respectivamente, os principais produtores na Europa. As demais regiões de expressão no cultivo são Canadá, México, América do Sul, África do Sul, Oriente Médio, Japão, China, e sudeste da Austrália. Foram produzidas, em 2016, 26,8 milhões de toneladas ao redor do mundo (FAOSTAT, 2018).

Atualmente, no Brasil, sua produção é realizada de forma contínua, em todos os estados do país, normalmente executada por agricultores familiares, criando, geralmente, cinco empregos diretos para cada hectare cultivado (COSTA; SALA, 2005). Em 2006 eram 66.301 propriedades rurais que produziam alface: 31,6% na região Sudeste, 29,8% na região Sul, 25,6% na região Nordeste, 6,7% na região Centro-Oeste e 6,2% na região Norte (IBGE 2006). Com uma produção de mais de 1,5 milhão de toneladas ao ano, a alface movimenta anualmente, um montante equivalente à R$ 8 bilhões, apenas no varejo (ABCSEM, 2015).

Com características morfológicas e fisiológicas distintas, a alface apresenta grande diversidade de cultivares. No mercado brasileiro, são aproximadamente cinquenta cultivares e variedades de alface que estão disponíveis comercialmente, sendo produzidas por instituições de ensino e pesquisa ou empresas especializadas nesse ramo de produção, possibilitando a escolha do genótipo que mais se adeque às condições climáticas onde será cultivada, incluindo tolerância ou resistência a doenças (SALA; COSTA, 2012). No Sul e Sudeste, durante o inverno são cultivadas alfaces importadas adaptadas a baixas temperaturas. Nas demais regiões predominam as alfaces de verão, que são mais resistentes ao pendoamento e florescimento precoce devido às altas temperaturas e dias mais longos. Entretanto, a maioria dos cultivares tem seu melhor desenvolvimento em temperaturas amenas, de 15ºC à 24ºC (HENZ; SUINAGA, 2009).

Dentre às diferentes possibilidades de escolha, a alface tipo crespa se destaca, sendo a mais cultivada no país. Isso se deve principalmente às suas características folheares, seus padrões de nervação, flabelada, além da ausência de formação da cabeça, sugerindo a esse tipo de alface desempenho agronômico superior (SALA; COSTA, 2012). Através de um cruzamento entre as cultivares ‘Veronica’ e ‘Slow bolting’ foi desenvolvida a cultivar ‘Vera’ que se mostra vastamente produzida e consumida, devido a suas propriedades, apresentando-se com folhas crespas, de coloração verde-claro brilhante e eretas (DELLA VECCHIA; KOCH; KIKUCHI, 1999).

De modo geral, esta hortaliça é altamente aceita pelos consumidores, devido sua facilidade de preparo para consumo, sendo predominantemente consumida fresca, na forma de salada (BORGHI, 2003). Outra alternativa de consumo é na forma de geléia, além de alguns usos menos habituais como em cigarro sem nicotina, fabricado através de suas folhas secas; óleo comestível, o qual é extraído a partir da prensagem das sementes; e fármacos indutores de sono, tais como os sedativos constituído de látex seco contido nas hastes e outros tecidos (RYDER, 2002).

Assim como as frutas, as hortaliças folhosas se tornaram muito populares na dieta humana devido à maior conscientização a respeito de alimentos saudáveis e prevenção de doenças, como a diminuição no risco de algumas doenças crônicas (LLORACH et al., 2008). A alface é estudada por

fornecer compostos benéficos à saúde, se mostrando como fonte de diversos compostos funcionais, como por exemplo, vitaminas, minerais e compostos fenólicos, que, juntamente com seu baixo valor calórico, resultam no crescente interesse em ingerir verduras frescas (KOŁTON et al., 2014; LEE et al., 2009). Entretanto, quando confrontados com outras hortaliças, seus teores na parte aérea são baixos. Sendo assim, o acréscimo na síntese e acúmulo de metabólitos tem despertado interesse para estudos envolvendo a biofortificação da alface (HAWRYLAK-NOWAK, 2013; BOROWSKI et al., 2014).

3.2 Utilização de estresses moderados como estratégia de biofortificação de compostos funcionais

A modificação genética, técnicas agronômicas e a aplicação de elicitores, são ferramentas utilizadas para aumentar os teores de compostos funcionais em frutas e hortaliças. Entre estes, os elicitores se tornaram populares devido ao seu baixo custo e simplicidade de uso. Os elicitores podem ser bióticos ou abióticos e, quando aplicados nas plantas, desencadeiam respostas de defesa (MORENO-ESCAMILLA et al., 2017).

Um dos instrumentos de defesa das plantas contra o crescimento adverso em condições como a seca, deficiências nutricionais, escassez de luz, temperatura extrema, salinidade e metais pesados, baseia-se na produção de antioxidantes (HERMS E MATTSON, 1992), os quais atuam capturando espécies reativas de oxigênio (EROS). Os antioxidantes podem ser de natureza enzimática ou não enzimática, sendo esta última classe representada por compostos de metabolismo secundário das plantas. Nas alfaces, esta classe é representada especialmente pelo ácido ascórbico, tocoferóis, carotenóides e alguns compostos fenólicos (McKERSIE e LESHEM, 1994). Uma vez que estes compostos funcionais apresentam benefícios à saúde quando ingeridos na dieta humana, a utilização de estresses ambientais moderados pode ser uma estratégia eficiente para aumentar o conteúdo de compostos funcionais da alface. Embora a alface seja sensível ao estresse osmótico, quando aplicado em moderação mostra-se indutor de compostos de defesa de grande valor nutricional/funcional atribuído à hortaliça (OH, 2010).

Recentemente a utilização de elicitores tornou-se uma maneira popular como forma de aumentar a resistência das plantas a estresses, bióticos e abióticos, e também para melhorar a qualidade das plantas, especialmente em relação aos seus compostos funcionais e compostos promotores de saúde (MARTÍNEZ-BALLESTA et al., 2008; LEE et al., 2017). O efeito das tensões abióticas nas propriedades agronômicas e nutricionais de diversas culturas tem sido intensamente estudado. Por exemplo, foi demonstrado que a limitação hídrica durante o cultivo afeta significativamente a qualidade da cultura, de forma que a seca aumentou o conteúdo de caroteno em mudas de trigo e tocoferol em plantas de lavanda (KELES e ÖNCEL, 2002; MUNNÉ-BOSCH et al., 2001), bem como o teor de fenólicos em plantas aromáticas como folhas de *Salvia offcinalis* L. (BETTAIEB et al., 2011). Além disso, estudos já mostraram essa estratégia em vegetais, como o brócolis, visando alcançar um aumento nutricional através da manipulação das condições de crescimento por elicitores, sendo exemplo deles, NaCl (cloreto de sódio) e ácido salicílico, afim de avaliar compostos fenólicos totais, flavonóides totais, antocianinas totais, vitamina C e E, mostrando essa estratégia como eficaz para o aumento nutricional (NATELLA et al., 2016). No mirtilo, a utilização de metil jasmonato como elicitor, induziu uma resposta ao estresse, resultando em níveis elevados de compostos bioativos no fruto, como foi encontrado em framboesas (WANG e ZHENG 2005); bem como aumento dos níveis de flavonóides em mirtilos, amoras e maçãs (PERCIVAL e MACKENZIE, 2007; WANG et al., 2008; SHAFID et al., 2011).

A literatura mostra que estresse hídrico e aplicação de luz UV, quando aplicado imediatamente antes da colheita, possibilita um aumento na qualidade da cultura de alface em relação à sua concentração de compostos funcionais, sem algum efeito adverso significativo sobre o seu crescimento ou rendimento (MORENO-ESCAMILLA et al., 2017). Em resposta ao estresse hídrico, as plantas normalmente acumulam uma ampla gama de antioxidantes. Dentre os antioxidantes enzimáticos destacam-se a peroxidase, a superóxido dismutase e acatalase; dentre os não enzimáticos compostos funcionais, o α-tocoferol, o β-caroteno e os flavonoides, em variadas espécies vegetais (SOFO et al., 2005; KELES E ONCEL 2002).

Desta forma, os tratamentos via elicitores desencadeiam a síntese de compostos funcionais em frutas, vegetais e ervas, sendo uma boa estratégia para induzir alterações fisiológicas e estimular respostas de defesa ou induzidas por estresse nas plantas.

Sendo a alface uma das hortaliças folhosas mais populares no mundo, é de grande interesse o aumento no conteúdo destes compostos em suas folhas, especialmente considerando que apesar de apresentar uma composição diversificada de compostos funcionais, estes se encontram em baixos níveis. Dessa forma, alguns estudos demonstram que a aplicação de ácido araquidonico (AA), ácido jasmônico (JA) e ácido abscísico (ABA) induzem um aumento na concentração de compostos fenólicos, dentre eles, flavonoides e ácidos fenólicos, além de outros compostos funcionais como clorofila, carotenóides e vitamina C (ZŁOTEK; SWIECA e JAKUBCZYK, 2014). Já a aplicação de quitosana, possibilitou um aumento no teor de fenólicos totais nas alfaces frescas (VIACAVA et al., 2018). De forma similar, o estresse leve imposto por um curto período de tempo sob elevada concentração de CO_2 resultou no aumento de compostos fenólicos, bem como na capacidade antioxidante, indicando que esta é uma prática de cultivo eficaz para aumentar os benefícios de promoção à saúde conferidos pela ingestão de alface (PÉREZ-LOPÉZ et al., 2018).

A literatura demonstra um aumento no conteúdo de compostos fenólicos e da atividade antioxidante de alfaces cultivadas sob condições de estresse abiótico, os resultados revelam que a síntese desses compostos é dependente de cada estresse, podendo ocorrer síntese de compostos fenólicos específicos e até mesmo individuais que, em condições normais, não seriam sintetizados (GARRIDO et al., 2014). Os mecanismos envolvidos na indução destes compostos em resposta a estes estresses também permanecem não elucidados. Além disso, poucos são os estudos que definem doses que de fato se mostram moderados para esta cultura, ou seja, permitem a indução do metabolismo secundário sem no entanto prejudicar o crescimento e desenvolvimento da planta.

Assim, a compreensão de como os tecidos vegetais e suas vias metabólicas secundárias respondem a tratamentos específicos com elicitores seria a base para a elaboração de protocolos para aumentar a produção de

metabólitos secundários, a fim de produzir alimentos frescos de qualidade e saudáveis (BAENAS, VIGUERA e MORENO, 2014).

Cabe salientar que o conteúdo de água na alface representa cerca de 96% da sua composição (MYFOODDATA, 2018), sendo um componente essencial para os mecanismos de sua sobrevivência (AKINIC et al., 2012). Estudos anteriores já mostraram que pode ocorrer déficits em qualquer momento do ciclo de vida de uma planta (HURD; 1976, LAWBE et al., 2000). De maneira que, com a crescente exigência mundial de alimentos, há uma necessidade de pesquisar formas de melhorar a tolerância ao estresse das plantas cultivadas e desenvolver técnicas de manejo para manter a produção de alimentos em níveis próximos à demanda, considerando a disponibilidade limitada de terra e de recursos hídricos (AKINIC et al., 2012).

3.3 Compostos funcionais de interesse na alface

A ingestão de alimentos funcionais aumentou devido à conscientização da presença de outras moléculas além dos macronutrientes que beneficiam a saúde do consumidor. Essas moléculas, conhecidas como compostos funcionais, podem ser encontradas principalmente em frutas e hortaliças. Sua concentração depende de fatores como práticas agrícolas, clima e condições pós-colheita (MORENO-ESCAMILLA et al., 2017). Ainda que o conteúdo desses metabólitos seja parcialmente pequeno na cultura da alface quando comparado com diferentes vegetais, a alta ingestão dessa hortaliça faz com que seja uma das principais fontes de antioxidantes na dieta humana, na maioria dos países, especialmente por conta do seu consumo na forma fresca (BOROWSKI et al., 2014).

Desta forma, a busca por estratégias que visem aumentar o conteúdo de compostos antioxidantes nesta cultura é de grande interesse, pois além de importante ação benéfica ao organismo, ainda fazem parte do metabolismo de defesa das plantas (HOTZ, 2013). Quaisquer que seja o composto-alvo da biofortificação, o desafio crucial é a necessidade de modular vias metabólicas endógenas de forma a ampliar a síntese dos compostos específicos, sem que interfiram no desenvolvimento e crescimento da planta e igualmente em outras vias de metabolismo (ZHU, et al., 2013). Neste contexto, os principais

compostos funcionais na alface, e suas vias biossintéticas, estão descritas a seguir.

Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são um amplo grupo de compostos funcionais, que possuem diversificadas estruturas, podendo ser convertidos em uma variedade de compostos derivados. Além da contribuição para propriedades sensoriais no alimento, os compostos fenólicos também mostram uma variada gama de funções biológicas e fisiológicas, tais como antialérgicos, atividades anti-inflamatórias, antimicrobiana e antioxidante, que promovem benefícios à saúde humana (TIAN et al., 2017).

Quimicamente esses compostos têm pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila ligados diretamente ao grupo hidrocarboneto, podendo haver diferentes classificações (DEL RIO et al., 2014). Sua síntese origina-se através de percursores acetato e chiquimato (Figura 1). No caso de sintetizados por essa via, a enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) é responsável por catalisar essa reação de forma que a entrada nessa rota acontece através do processo de desaminação do aminoácido L-fenilalanina tornando-o em ácido cinâmico. Após, ocorrem sucessivas reações enzimáticas, que incluem a atuação da flavonol sintase (FLS) como mostrado na figura 2, que atua na formação dos flavonoides; e da UDP flavonoide glicosiltransferase (UFGT), responsável pela síntese de antocianinas (CHEYNIER, 2012).

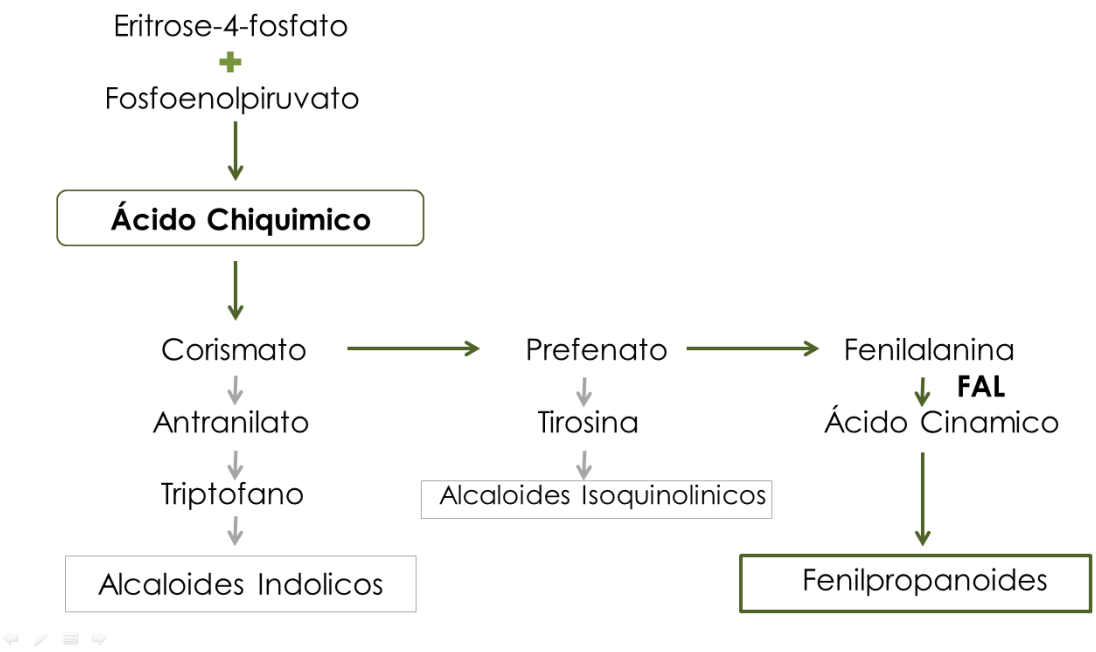

Figura 1: Biossíntese de compostos fenólicos a partir da via do ácido chiquímico
Fonte: Adaptado de Holton et al., 1995.

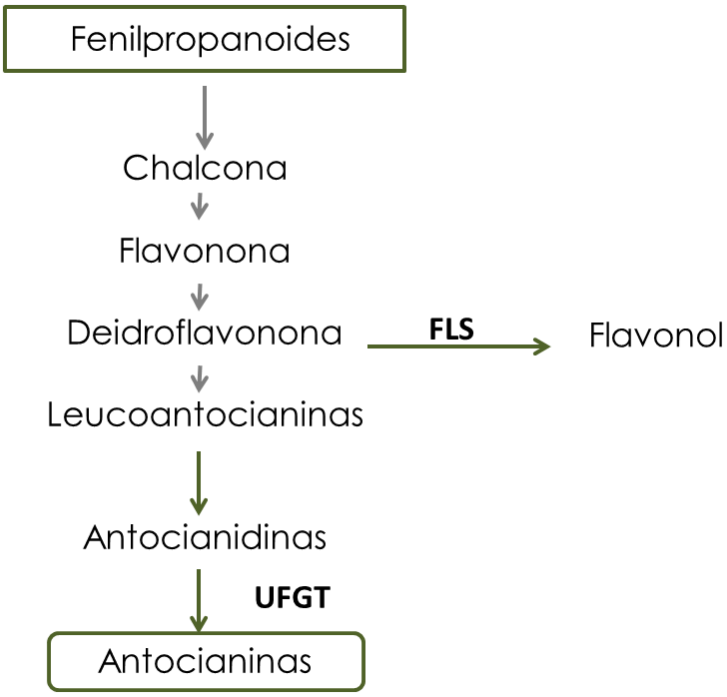

Figura 2: Rota metabólica de fenilpropanóides em plantas.
Fonte: Adaptado de Holton et al., 1995.

Devido às propriedades biológicas e físico-químicas destes compostos, possuem variada estrutura, de forma a variar sua função específica e biodisponibilidade nas plantas. Podem atuar desde pigmentos, no processo de polinização, distribuição das sementes, até proteção contra estresse biótico e abiótico. A distribuição é onipresente em plantas e alimentos provenientes destas; vinho tinto, café, cacau, frutas cítricas, bagas e vegetais frescos foram identificados como elevada fonte alimentar (FENOL EXPLORER, 2018). Sua ação antioxidante é consequência da sua estrutura química, sendo capaz de capturar radicais livres devido seu efeito quelante de íons metálicos, ou capturando radicais livres pelos grupamentos hidroxila, além da inibição de enzimas pró-oxidantes que geram radicais livres (DEL RIO et al., 2014).

O interesse por pesquisas e conhecimento acerca dos compostos fenólicos e a relação entre compostos fenólicos na dieta e a saúde humana tem mostrado um expressivo aumento nos últimos anos, nos diversos segmentos do ramo alimentício, pesquisa, indústria e mercado (VALDÉS et al., 2015). Mostrando o impacto positivo acerca do seu papel na prevenção de doenças crônicas, como cardiovasculares (RANGEL-HUERTA et al., 2015), alguns tipos de câncer, possuindo alta capacidade de inibir a proliferação de células, favorecendo a redução da taxa de crescimento celular e apoptose (ROLEIRA et al, 2015, MITJAVILA; MORENO, 2012), diabetes tipo 2 (LIN et al., 2016) e doenças neurodegenerativas (RODRIGUEZ-MORATÓ et al., 2015). São associados os efeitos benéficos à saúde devido sua capacidade antioxidante e anti-inflamatória, resultando na diminuição dos níveis de colesterol sérico, ácidos graxos, triglicerídeos, e lipoproteínas de baixa densidade (*Low-density lipoprotein – LDL*), e aumentando os níveis de lipoproteínas de alta densidade (*High-density lipoprotein – HDL*) (SINGH et al., 2016).

Os fenóis contidos na alface se mostram em menor abundância do que em vinte e sete vegetais comuns existentes consumidos ao redor do mundo (SONG et al., 2010), explicando dessa forma a relevância dos estudos que visam o incremento desses compostos na cultura. O conteúdo e a composição fenólica da cultura da alface consegue ser alterada por diversos fatores, sendo eles; a intensidade de luz, a disponibilidade de água, o fornecimento de nutrientes, o uso de pesticidas, práticas de cultivo, assim como condições climáticas (DURAZZO et al., 2014; SANTOS et al., 2016).

As características acerca dos compostos fenólicos da alface estão bem esclarecidas na literatura (DU PONT et al., 2000). A máxima porção fenólica (90%) é composta por derivados do ácido cafeico, especialmente esterificados com ácido clorogênico e isoclorogênico, ácido chicórico e ácido málico. Em contrapartida os provenientes de flavonoides representam a porção mais baixa de compostos fenólicos presentes nas folhas de alface (5%), sendo os mais comuns os derivados de quercitina e kaempferol (TAVARINI et al., 2008; LLORACH et al., 2008; RIBAS-AGUSTI et al., 2011).

Ácido L-ascórbico

Ácido ascórbico (Vitamina C) é um abundante componente presente em grande parte dos vegetais, sendo uma das vitaminas mais importantes na dieta humana, por apresentar efeitos em muitos processos fisiológicos (ALSCHER et al., 1993). O ascorbato tem sido implicado na regulação do crescimento, diferenciação e metabolismo em plantas. Em tecidos animais e vegetais, atua essencialmente como um redutor, reagindo e eliminando radicais livres, tendo também efeitos sobre a atividade de muitas enzimas. Além disso, sua forma oxidada, o ácido dehidroascórbico, é importante na dieta humana, visto que os humanos não são capazes de sintetizar esse metábolito (LOCCATO; CIMINI; GARA, 2013).

O ácido ascórbico apresenta baixo peso molecular (20 mM), e sua síntese ocorre através de açucares hexoses, que em condições adequadas representam 10% dos carboidratos solúveis em plantas, o que a torna uma das vitaminas mais simples (SMIRNOFF; WHEELER, 2000; DAVAY et al., 2000). Pode ser sintetizada pela via Smirnoff-Wheeler, chamada também de D-manose/L-galactose, como mostra a Figura 3 (WHEELER; JONES; SMIRNOFF, 1998). Através dessa via, a manose-1-fosfato é convertida em guanosina difosfato (GDP) manose pela GDP manose pirofosforilase (GMP) e essa em GDP-L-galactose pela GPD-manose-3’,5’-epimarase (GME), que é então convertida a L-galactose (L-Gal). L-galactona-1,4-lactona é sintetizada da oxidação da L-Gal pela L-galactose desidrogenase (GLDH), sendo então oxidada a ácido L-ascórbico. Este útimo passo da biossíntese de ascorbato é catalisado por L-galactona-1,4-lactona desidrogenase (L-GalDH) (SMIRNOFF; NICHOLAS, 2018). A síntese de ácido ascórbico a partir de mio-inositol poderia

indicar que uma via alternativa está presente nas plantas, que pode contornar algumas etapas da via D-manose. No entanto, resultados expressivos não são encontrados na literatura; dessa forma a contribuição do mio-inositol na biossíntese do ácido L-ascórbico in vivo ainda precisa ser determinada (VALPUESTA; PORTELLA, 2014)

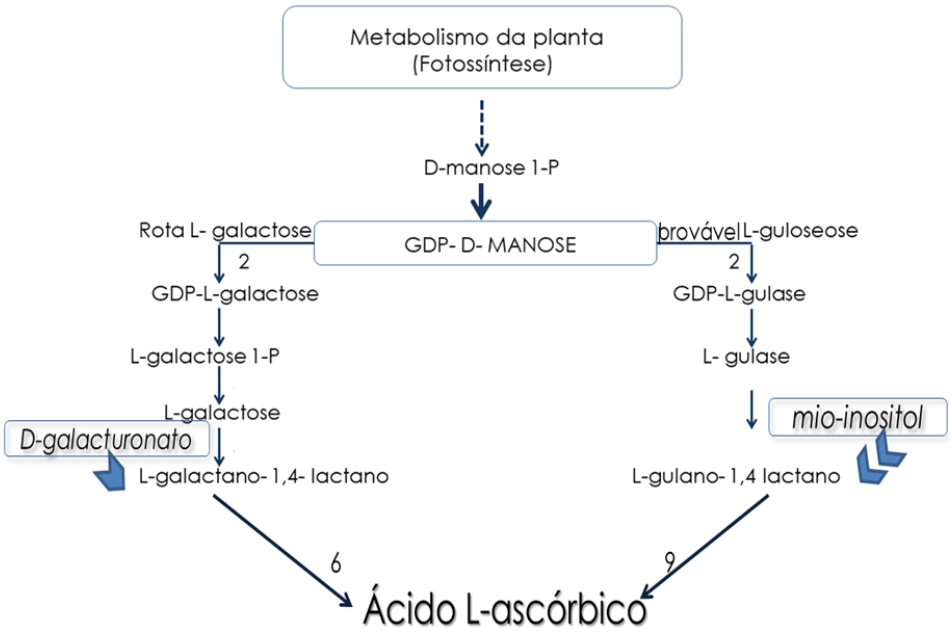

Figura 3: Rota metabólica do ácido L-ascórbico mostrando importantes moléculas precursoras envolvidas, via GDP-manose, através da ação das enzimas (2) GME, (6) GalDH e (9) GLDH Fonte: Adaptado de Smirnoff e Wheeler, 2000.

Além da via de síntese, é encontrada em plantas também a via de reciclagem de ácido L-ascórbico. Essa via cumpre importante função na resposta e adequação ao estresse colaborando também para a regulação de níveis desse metabólito, junto com os processos de síntese, degradação e transporte (STEVENS et al., 2008, YIN et al., 2010). Através da ação da APX (ascorbato peroxidase), o ácido L-ascórbico é convertido em ácido monodehidroascórbico, com a concomitante redução do peróxido de hidrogênio em água. Este composto, devido sua instabilidade, pode espontaneamente ser convertido a ácido dehidroascórbico (GALLIE, 2013).

O Ácido L-áscorbico contido em plantas age como cofator enzimático, com potencial substancial não apenas por eliminar espécies reativas do oxigênio (EROS), mas também por modular um número de funções

fundamentais em plantas, incluindo a resposta a estresse biótico e abiótico, além de atuar na regulação de várias alterações fisiológicas e bioquímicas e processos como germinação de sementes, fotossíntese, indução floral, expansão de frutos, e senescência (AKRAM; SHAFIQ; ASHRAF, 2017).

Em humanos, se mostra importante a ingestão desse composto, pois o organismo deficiente em ácido ascórbico apresenta uma série de problemas como, perda de peso, fadiga, insônia, aumenta suscetibilidade a infecções, e sua falta severa pode ocasionar escorbuto (SMIRNOFF; NICHOLAS, 2018). Além disso, o ácido ascórbico mostra função benéfica na redução do risco de doenças cardiovasculares, certos tipos de câncer, distúrbios relacionados com a idade e doenças bucais. A carência de vitamina C pode ser evitada/suprida através de suplementação alimentar; no entanto, estudos demonstraram que uma dieta rica em vegetais apresenta maior biodisponibilidade do composto do que quando sintetizada quimicamente em suplementos (VISSERS et al., 2011, GESS et al., 2015).

O teor de ácido L-ascórbico na alface é menor do que em outros vegetais como brócolis, couve-flor e espinafre. Apesar disso, essa hortaliça ainda representa uma ótima fonte desse composto, pois é consumida na forma fresca, ao contrário de outros vegetais que são consumidos na forma cozida (LOCATTO; CIMINI; GARA, 2013). Devido a isso e à relevância deste metabólito, tanto para plantas quanto para humanos, as estratégias que visam o incremento nos teores de L-ascórbico em plantas são de grande interesse na pesquisas científica (AKRAM et al., 2017)

α-tocoferol

O *α* -tocoferol pertence ao grupo de compostos de vitamina E, sendo nessa forma o composto que contém maior quantidade da vitamina (MÈNE-SAFFRANÉ; PELLAUD, 2017). É um antioxidante lipofílico que possui várias funções na planta, sendo essencial para manter a integridade e rigidez das membranas fotossintéticas, e desempenha um papel importante na fotoproteção. O *α*-tocoferol elimina os radicais peróxidos, impedindo assim a propagação da peroxidação lipídica, protegendo os lipídios e outros

componentes das membranas, além de atuar na sinalização celular (MUNNÉ-BOSH, 2007).

Quimicamente, o grupo de tocoferóis apresenta semelhança quanto sua cadeia, sendo ela saturada com dezesseis carbonos. Grande parte da síntese dos tocoférois acontece nos plastídeos, onde dois compostos de diferentes vias metabólicas são utilizados como precursores. Um deles é o ácido homogentísico (HGA), derivado do 4-hidroxifenilpiruvato (HPP) proveniente da via metabólica de chiquimato. Este precursor, juntamente com fitidilfosfato (PDP; ROHMER 2003) origina 2-metil-6-fitil-1,4-benzoquinona metiltransferase (MPQ), uma reação catalisada pela enzima homogentisato preniltransferase (VTE2, HPT1). MPQ serve de substrato para a síntese de δ-tocoferol (por ação da enzima VTE1), o qual pode ser convertido a β-tocoferol (por ação da enzima VTE4/TMT). Além disso, MPQ pode ser metilado a 2,3-dimetil-5 fitil benzoquinona (DMPQ), que serve de substrato para a síntese de γ-tocoferol (por ação da enzima VTE1), o qual pode ser convertido a α-tocoferol (por ação da enzima VTE4/TMT) (SMIRNOFF; NICHOLAS 2007).

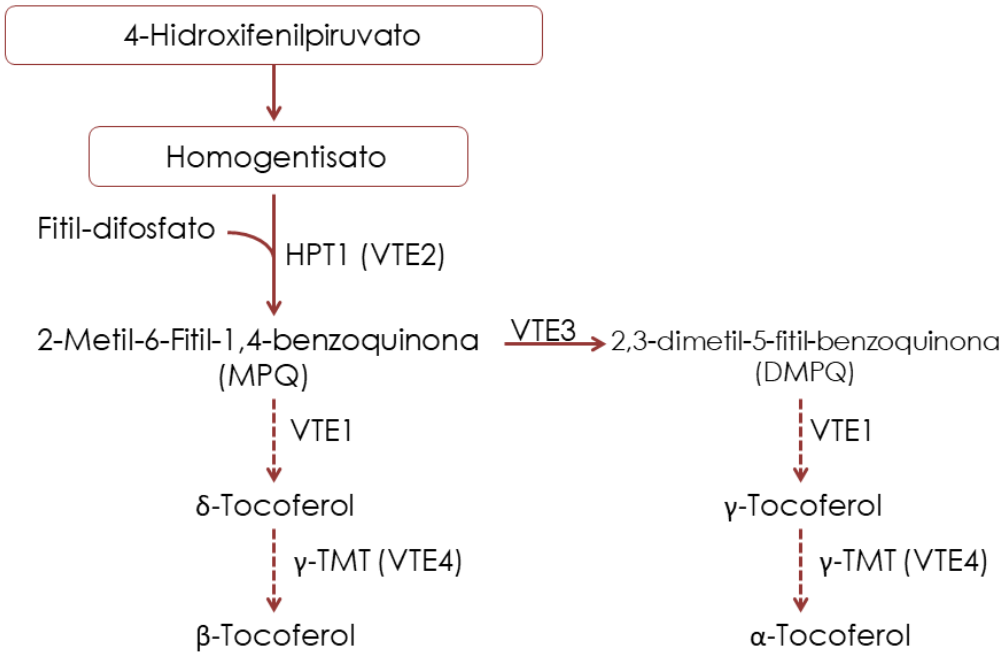

Figura 4: Síntese de tocoferóis a partir de 4-Hidroxifenilpiruvato.

Fonte: Adaptado de Mène Saffrané, 2017

Os tocoferóis são componentes essenciais da dieta humana e são sintetizados exclusivamente por organismos fotossintéticos. Eles executam várias funções críticas, incluindo eliminação de EROS, resultando na melhoria da função imunológica e limitando a incidência e progressão de várias doenças degenerativas humanas, incluindo certos tipos de câncer, catarata, distúrbios neurológicas e doenças cardiovasculares (MENTE et al., 2009, WANG et al., 2015, PEH et al., 2015).

Em plantas o nível de tocoferol varia durante o desenvolvimento. Além disso, fatores como estresse, incluindo alta luminosidade, baixa temperatura, seca e estresse salino afetam sua síntese (GOSSETT ET AL., 1994; STREB ET AL., 1994 ; LEIPNER ET AL., 1999; HAVAUX ET AL., 2000; MUNNE-BOSCH E ALEGRE, 2000). Durante a senescência foliar, um processo acompanhado da degradação da clorofila e de danos oxidativos nas membranas de células fotossintéticas, há um aumento do acúmulo de tocoferóis (MUÑOZ e MUNNÉ BOSCH, 2018). Estes estudos combinados sugerem que a síntese de tocoferóis é altamente regulada durante o crescimento e desenvolvimento das plantas.

Estudos nutricionais mostram que as populações dos países desenvolvidos não consomem quantidades suficientes de vitamina E na dieta, e que uma grande proporção de indivíduos apresenta deficiência de α-tocoferol no plasma. Dessa forma, várias estratégias, incluindo a aplicação de estresse nas plantas, foram realizadas visando melhorar o conteúdo de vitamina E nas culturas alimentícias (MÈNE-SAFFRANÉ e PELLAUD, 2017)

De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - (DAEUA-*USDA*) através do banco de dados de nutriente, o teor total de tocoferol na alface é de cerca de 0,5 µg g^{-1}, com relação α-/γ-tocoferol de 0,26. Portanto, o conteúdo e a composição de tocoferóis na alface podem ser melhorados (MÈNE-SAFFRANÉ; PELLAUD, 2017). Com este objetivo, alguns estudos relatam a possibilidade de biofortificação da alface com tocoferol através da superexpressão de genes que codificam para enzimas localizadas em diferentes pontos da rota metabólica biossintética, incluindo a superexpressão do gene que codifica para *At*HPT de *Arabidopsis thailana.* Outro estudo aponta que a superexpressão do gene que codifica para HPT da própria alface (*Ls*HPT) promove incremento de quatro vezes no teor de α-

tocoferol e de aproximadamente três vezes no teor de γ-tocoferol (REN et al., 2011), sugerindo ser uma estratégia eficiente para incrementar o conteúdo de tocoferol em alface.

3.4 Análise de expressão gênica

Quando um estresse acomete uma planta, diferentes respostas serão geradas frente à esse mecanismo, de forma a determinar a expressão gênica, principalmente quando a tolerância está relacionada à água, que é a molécula principal na maioria dos processos fisiológicos em vegetais, sendo o principal meio de transporte de metabólitos e nutrientes (RAHMAN e HASEGAWA, 2011). As respostas fisiológicas das plantas ao estresse hídrico e sua importância para a produtividade das culturas variam com as espécies. No caso de plantas herbáceas, a água é responsável por 80%-90% do peso fresco. Considerando que o abastecimento de água é restrito em muitas partes do mundo, a produtividade nesses ambientes pode ser melhor executada com o desenvolvimento de culturas bem adaptadas a condições de seca (AKINCI e LÖSEL, 2012). No caso da alface, os compostos associados ao metabolismo de defesa da cultura, tais como compostos fenólicos, ácido L- ascórbico e tocoferóis, exibem grande variação ainda que dentro da mesma espécie, já que são codificados por um grande número de genes e participam de vias de biossíntese exclusivas, sendo dependentes das condições ambientais em que a cultura é produzida (OH; TRICK; RAJASHEKAR, 2009).

Através da análise de expressão gênica é possível avaliar a resposta apresentada na planta a determinado estresse. Devido ao aumento na quantidade de sequencias gênicas e genomas depositados em bancos de dados mundiais, torna-se necessário metodologias capazes de identificar e elucidar os padrões de expressão apresentados por estas sequências na espécie alvo (CALSA; BENEDITO; FIGUEIRA, 2004).

A primeira metodologia utilizada para determinação dos níveis de expressão gênica foi baseada no sequenciamento de Etiquetas de Sequencia Expressas (*ESTs* em inglês) (ADAMS et al., 1993). A técnica se mostrou laboriosa e demorada, dando espaço a novas técnicas que começaram a ser desenvolvidas, como hibridização de sondas, sequenciamento de regiões

específicas e PCR. No caso da hibridização (oligo microarray/ cDNA-microarray), o alto custo, a sensibilidade moderada e a especificidade baixa são limitantes da técnica. De forma similar, o sequenciamento (SAGE/MPSS) é uma técnica laboriosa e também tem um custo alto. Além disso, ambos os métodos necessitam de um passo suplementar que é o refinamento e validação para confirmação dos resultados obtidos, podendo ocasionar cruzamento como falsos positivos e falsos negativos (CALSA; BENEDITO; FIGUEIRA, 2004, MORGANTE; BLAWID, 2016).

Já a técnica de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR; sigla proposta por BUSTIN et al., 2009), é considerada uma técnica padrão ouro, ou seja, bem definida e que assegura resultados confiáveis, sendo amplamente utilizada para verificar expressão gênica. Possui um baixo custo e alta sensibilidade e especificidade (CALSA; BENDITO; FIGUEIRA, 2004). A RT-qPCR relaciona a amplificação exponencial de um fragmento de DNA alvo específico com métodos de quantificação, através de fluorescência combinada à síntese de um amplicon, ao longo dos ciclos da PCR, de maneira a ser um método sensível, eficiente e com boa reprodutibilidade para medidas quantitativas (MORGANTE; BLAWID, 2016).

O funcionamento desta técnica se baseia de forma semelhante ao que ocorre na PCR convencional, através de ciclos consecutivos em que ocorre: (1) através do aquecimento a 90-95ºC a fita simples do DNA é desnaturada; (2) irá ocorrer o anelamento de oligonucleotídeos ou *primers* (iniciadores) à sequência específica complementar nas fitas simples de DNA e; (3) através da enzima DNA polimerase mediando a extensão de novas fitas. Como resultado, uma crescente exponencial do número de amplicons no decorrer dos ciclos da reação ocorre. O que irá diferenciar é que na RT-qPCR esse aumento é registrado em tempo real durante a etapa exponencial, e não medido apenas no final da reação como na técnica convencional. O registro ocorre através da detecção do sinal de uma fluorescência repórter, estando sua intensidade diretamente proporcional ao número de amplicons que se acumulou durante os ciclos, podendo variar em atribuição à quantidade de DNA alvo inicial. Assim, quanto mais moléculas de DNA inicial, maior será o número de DNA amplificado, tornando mais intenso o sinal da fluorescência ao longo dos ciclos da reação. Além disso, na RT-qPCR quando termina a reação, os resultados já

estão pronto para serem analisados, sem a necessidade de aplicar outra técnica para visualização (MORGANTE; BLAWID, 2016).

Para funcionamento de forma adequada desta técnica, é de extrema importância a utilização de um RNA de alta qualidade, isto significa um RNA íntegro, sem degradação, o que é normalmente visualizado através de corrida eletroforética; em quantidades adequadas, o que pode ser mensurado através da leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm, onde uma unidade de densidade óptica corresponde a 40 µg/mL; e puro, sem contaminantes, o que pode ser verificado através da leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm, onde as relações A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} devem ser maiores que 1,8 e menores que 2,2. Por isso, a padronização do isolamento de RNA é uma etapa crucial.

Estudos mostram a importância da qualidade do RNA extraído, e sua relação com a eficiência do resultado da técnica de PCR, demonstrando que, RNA com baixa qualidade pode comprometer os resultados, especialmente em análises de expressão gênica por qRT-PCR. Assim, de forma a assegurar a confiança dos resultados, se faz necessária a utilização de RNA de alta qualidade (FLEIGE et al., 2006, MCCARTHY et al., 2017). Por isso, métodos de extração que atendam a essa necessidade precisam ser testados e adaptados a cada tecido vegetal analisado.

Devido à importância de se manter um RNA integro, a literatura apresenta diferentes estudos comparativos acerca das melhores metodologias para extração em diferentes frutos e hortaliças como, mirtilo, uva e kiwi (JAAKOLA et al., 2001, GAMBINO et al., 2008, AFSHAR-MOHAMMADIAN et al., 2018). Para a avaliação da expressão gênica a partir de folhas de alface, não foram encontrados relatos na literatura avaliando a eficácia de isolamento de RNA com qualidade e quantidade satisfatórias utilizando diferentes metodologias, de forma que este procedimento se faz necessário.

4 Material e Métodos

4.1 Condições experimentais e materiais vegetais

As mudas de alface, obtidas com uma semana de desenvolvimento (cv. Vera) foram transplantadas para sacos plásticos específicos para mudas (dimensões 13 x 13), cultivados em casa de vegetação na Universidade Federal de Pelotas, campus Capão do Leão-RS. Para esse estudo, foram utilizadas 40 mudas, uma por saco, contendo 200-210 g de substrato em cada. A quantidade de água na irrigação foi determinada de acordo com o cálculo de evapotranspiração da cultura, $ETc= 0,006Kc (25 + Tm)^2 (1 – Urm/100)$, em que Kc é o coeficiente de cultura em cada fase de desenvolvimento da planta, Tm é a temperatura média e Urm é a umidade média da casa de vegetação, conforme proposto por Mourelli et al. (2008). De acordo com estes dados, a irrigação foi realizada a cada três dias. Os valores de umidade relativa e temperatura foram monitorados por dataloggers instalados na casa de vegetação. Nesse experimento, as plantas foram dispostas de maneira aleatória, compondo quatro tratamentos, cada um com cinco repetições e cada repetição com duas plantas, sendo eles:

Controle– irrigação de acordo com o indicado para cultura.

Estresse moderado 1 – As plantas foram submetidas à irrigação equivalente a 90% da água utilizada para o tratamento controle.

Estresse moderado 2 – As plantas foram submetidas à irrigação equivalente a 80% da água utilizada para o tratamento controle.

Estresse agudo – As planta foram submetidas à irrigação igual ao controle até uma semana antes da colheita; após a irrigação foi suspensa.

4.2 Extração de RNA utilizando diferentes métodos

Foram avaliados os métodos: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) descrito por Messias et al. (2013); CTAB modificado; *Plant RNA Isolation Reagent*™ (Invitrogen™); e TRIzol™ (Ambion™). É de suma importância que todo processo, independente do método utilizado, ocorra a 4ºC, uma vez que o RNA pode ser facilmente degradado em temperatura ambiente, e também a utilização de capela de fluxo laminar para evitar o contato do manipulador com os reagentes tóxicos destas metodologias.

4.2.1 Método CTAB:

Em microtubos com tecido de alface macerado (150 mg), foram adicionado 1210 µL de CTAB e 42 µL de β-mercaptoetanol 3,3%. Este material foi homogeneizado com o auxílio de vórtex e incubado em banho-maria a 65 ºC por 10 minutos. Em seguida adicionou-se 625 µL de uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (CHISAM) (48:2, V/V) e centrifugou-se por 20 minutos a 13000 *g*. A fase superior foi transferida para um novo tubo, onde foram adicionados novamente 625 µL de CHISAM e centrifugado. Novamente a fase superior foi transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 250 µL de cloreto de lítio (LiCl) à 10M, o qual promove a separação dos açúcares. Para que isto ocorresse, o material foi incubado a 4 ºC durante a noite.

Após este período, o material foi centrifugado a 13000 *g* por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido com 200 µL de tampão contendo 0,5% dodecil sulfato de sódio (SDS), 1M cloreto de sódio (NaCl), 1mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 10mM trisaminoetano (TRIS). Em seguida, foram adicionados 200 µL de CHISAM e a mistura foi centrifugada a 10000 *g* por 10 minutos. A fase superior foi transferida para um novo tubo, e novamente foram adicionados 200 µL de CHISAM. Após centrifugoção a 10000 *g* por 10 minutos, a fase superior foi transferida para um novo tubo, onde foram acrescentados 18 µL de acetato de sódio (NaAc) 3M, e 364 µL de etanol absoluto.

As amostras foram incubadas a -80º C em ultrafreezer por 1 hora. Após, foram centrifugadas por 30 minutos a 18000 *g*, descartado o sobrenadante e o precipitado foi lavado com álcool etílico 70% e centrifugado a 18000 *g* por dois minutos, novamente lavado e centrifugado na mesma força por dois minutos, para remoção de resíduos. Após a lavagem, ao material contendo RNA extraído foram adicionados 25 µL de dietilpolicarbonato (DEPC) contendo 0,1mM EDTA. Após o material foi armazenado em ultrafreezer a -70ºC.

4.2.2 Método CTAB modificado

Essa metodologia foi realizada da mesma forma que a descrita no item 4.2.1, entretanto sofreu modificações em suas lavagens. Quando 625 µL CHISAM é adicionado, após a centrifugação por 20 minutos a 13000 *g*, a fase superior foi transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 250 µL de

10M LiCl. Na segunda etapa após a adição do tampão, foram adicionados 200 µL de CHISAM e a mistura foi centrifugada a 10000 *g* por 10 minutos. A fase superior foi transferida para um novo tubo, e em seguida foram acrescentados 18 µL de 3M NaAc. Na última etapa, a lavagem com etanol 70% só ocorreu uma vez. Após adição de 25 µL de DEPC contendo 0,1mM EDTA o material foi armazenado em ultrafreezer a -70ºC.

4.2.3 Extração por Plant RNA Reagent (Invitrogen ™)

Utilizando o tecido previamente macerado com peso de 150 mg, foram adicionados 500 µL *Plant RNA Reagent* (Invitrogen™), agitando vigorosamente para que a amostra entrasse em contato com o reagente. Após, foi deixado no gelo por 10 minutos e centrifugado por 2 minutos à 12000 *g*. O sobrenadante foi transferido para um novo tudo, onde foram adicionados 100 µL de cloreto de sódio 5M e homogeneizado por inversão. Após acrescentou-se 300 µL de clorofórmio e novamente homogeneizou-se por inversão. Em seguida, o material foi centrifugado por 10 minutos à 12.000 *g*. A fase superior (aquosa) foi retirada, e transferida para um microtubo novo. Adicionou-se volume equivalente de isopropanol ao volume da fase aquosa que foi retirado. Então o material foi homogeneizado por inversão e incubado a -20ºC durante 15 minutos, homogeneizando-se de tempos em tempos, e posteriormente centrifugado por 10 minutos à 12000 *g*. O sobrenadante formado foi retirado, e então acrescentou-se 1000 µL de etanol 75% e centrifugou-se à 12000 *g* por 2 minutos. O etanol foi retirado e diluiu-se o pellet com 25 µL de água DEPC acrescida de 0.1mM EDTA. Após o material foi armazenado em ultrafreezer a -70ºC.

4.2.4 Extração por TRIzol™(Invitrogen™)

Utilizando a pesagem padrão de 150 mg de tecido previamente macerado, 1000 µL de Trizol foram adicionados, e 500 µL de isopropanol. O material foi incubado por 10 minutos e centrifugado pelo mesmo tempo à 12000 *g*. O pellet formado foi mantido de forma a descartar todo sobrenadante. Após ressuspendeu-se o pellet em 1000 µL de etanol 75%, homogeinizou-se em vórtex e centrifugou-se por 5 minutos a 7500 *g*. O sobrenadante foi descartado e o microtubo foi aberto afim de evaporar o etanol restante, durante 5-10

minutos. Por fim foram adicionados 25 µL de água DEPC adicionado de 0.1mM EDTA, e incubado por 10 minutos em banho maria 55-65ºC. Após o material foi armazenado em ultrafreezer a -70ºC.

4.2.5 Avaliação da qualidade e quantidade de RNA isolado

Após a realização das extrações, a qualidade e a quantidade do RNA isolado foi avaliada, utilizando o espectrofotômetro Biochron™ NanoVue Plus GE Healthcare®. A concentração foi determinada através da leitura a 260 nm e apresentada em ng/µL. A qualidade do RNA foi determinada pelas razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}.

4.3 Desenho dos oligonucleotídeos para RT-qPCR

Os *primers* para PCR em tempo real foram desenhados através do programa Vector NTI Advance 11 - Invitrogen® de modo que os *amplicons* não fossem superiores a 250 pares de base, tendo em vista que resultados satisfatórios em RT-qPCR são obtidos com fragmentos amplificados entorno de 100 a 250 pares de base. A temperatura de *melting* (Tm) foi mantida entre 52-55°C. As sequências foram escolhidas de forma a evitar a formação de *hairpin* ou dímero de *primers*.

4.4 Avaliação da eficiência da amplificação dos oligonucleotídeos por RT-qPCR

Para análise da eficiência da amplificação dos oligonucleotídeos desenhados, foram realizadas reações de PCR convencional, com cDNAs previamente sintetizados a partir de RNA extraído de folhas de alface cultivadas sob condições controle. As reações foram realizadas utilizando termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad), sob as seguintes condições: 94 ºC para desnaturar o DNA, seguido de 54 ºC onde irá ocorrer o anelamento dos oligonucleotídeos, e 72 ºC para síntese das fitas pela DNA polimerase. Estas etapas foram repetidas 34 vezes. Para confirmação da amplificação dos genes, foi feita eletroforese, com géis de agarose 1,5%, utilizando o corante BlueGreen, LGC Biotecnologia®, podendo ser confirmada ou não através da presença de bandas visualizadas em luz UV.

5 Resultados e Discussão

5.1 Cultivo de alface sob condições de estresse hídrico moderado

A literatura tem mostrado que a aplicação de estresse hídrico moderado pode ser utilizada como uma estratégia eficaz para aplicação em diferentes culturas agrícolas, como arroz (ZHONG et al., 2018), milho (GAO et al., 2016), tomate (SANCHEZ; ROMERO e RUÍZ, 2016), beterraba (STAGNARI et al., 2016) e espinafre (MOGREN et al., 2015). Baseado nesses estudos, inicialmente foi realizado um experimento onde mudas de alface foram cultivadas sob condições de estresse hídrico envolvendo duas condições, com 80% e com 90% da quantidade total de água, e um terceiro tratamento onde essas plantas receberam a quantidade total de água e nos últimos dias foi realizada uma suspensão no fornecimento de água às plantas (Figura 5).

Para execução do experimento, as plantas foram transplantadas para sacos plásticos, sendo monitorada diariamente a temperatura e umidade relativa. Estes parâmetros foram utilizados para determinar a quantidade de água aplicada nas alfaces. Dessa forma, um determinado volume de água foi aplicado, a cada dois dias, como mostra a Tabela 1. Este experimento encontra-se em condução, o qual servirá para estudos futuros, visando avaliar o efeito destes tratamentos no conteúdo de compostos funcionais e na expressão de genes relacionados ao acúmulo destes compostos.

Figura 5: Cultivo de alface. (A) Primeiro dia de aplicação do estresse hídrico; (B) Cinco dias após aplicação do estresse; (C) Vinte dias após a aplicação do estresse.

Tabela 1: Tabela referente aos dias de estresse, contendo temperatura e umidade (via Agromet – CPACT- Embrapa) e volume de água aplicado utilizando o cálculo de evapotranspiração.

	Dias após o início da aplicação do estresse																							
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**	**23**	**24**
Umidade (%)	80	83	89	83	86	92	83	85	83	83	85	83	93	79	76	70	74	83	93	80	86	72	76	81
Temperatura ºC	27	23	20	25	23	24	30	32	25	34	28	25	22	20	23	23	19	26	23	26	31	24	27	29
Evapotransp. (ETC)	2,9	2,1	1,9	2,2	2,5	1,0	2,7	2,6	2,3	2,8	2,3	2,2	1,3	2,5	2,9	3,7	2,4	2,3	1,4	2,8	2,3	3,3	3,5	2,9
Volume Água (mL) - Controle	120	120	120	72	72	72	96	96	96	91	91	91	101	101	101	106	106	106	81	81	81	120	120	120
Volume Água (mL) - Agudo	120	120	120	72	72	72	96	96	96	91	91	91	101	101	101	106	106	106	81	81	81	120	120	120
Volume Água (mL) - Estresse 90%	108	108	108	64	64	64	86	86	86	82	82	82	90	90	90	95	95	95	73	73	73	108	108	108
Volume Água (mL) - Estresse 80%	96	96	96	57	57	57	76	76	76	73	73	73	80	80	80	84	84	84	64	64	64	96	96	96

5.2 Isolamento de RNA a partir de folhas de alface

É de grande importância testar diferentes metodologias para extração de RNA de forma a avaliar aquela que possa isolar RNA em quantidade e qualidade satisfatória para estudos de RT-qPCR, visto que essa metodologia é extremamente sensível e pode ser prejudicada se o RNA estiver em condições baixas de qualidade. Um RNA considerado de alta qualidade deve estar intacto e livre de contaminantes como, RNAses, proteínas, DNA genômico, enzimas e outras substâncias inibitórias para RT-qPCR (MESSIAS et al., 2014).

A metodologia mais utilizada para verificar a concentração e a presença desses contaminantes após isolamento de RNA é através da leitura espectrofotométrica nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm, sendo que as razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} entre 1,8 e 2,2 indicam que o RNA está livre de contaminação.

Baseado nisso, foram coletadas cinco amostras, de cinco alfaces diferentes, todas cultivadas em condições normais, sem estresse, provenientes do tratamento controle. Essas cinco plantas foram maceradas e uma alíquota de cada uma foi utilizada para avaliação de cada uma das quatro metodologias de estudo. De acordo com a tabela 2 é possível observar que a concentração de forma geral foi relativamente baixa para todas as metodologias testadas. Este resultado era esperado visto que a alface é rica em água, de forma que a quantidade de material genético em 150 mg de amostras é de fato pequena. A maior concentração de RNA foi obtida utilizando a metodologia Trizol, apresentando uma média ± desvio padrão de 191,5 ± 60,56 ng/µl entre as cinco amostras. Por outro lado, a metodologia que resultou em uma menor concentração de RNA foi *Plant RNA Reagent* com 51,02 ± 56,29 ng/µl. Cabe salientar que apenas uma das amostras apresentou concentração de RNA superior a 150 ng/µl, sendo que as demais apresentaram concentrações inferiores a 36 ng/µl, o que refletiu em um desvio padrão elevado.

A modificação na metodologia de CTAB, além de reduzir etapas de lavagem, o que representa menor uso de reagentes e tempo de execução da técnica, resultou no isolamento de concentrações superiores de RNA (64,94 ± 34,7 ng/µl) comparada à metodologia padrão (57,58 ± 18,4 ng/µl). Além disso, embora esta metodologia tenha resultado em concentrações inferiores às do método Trizol, a qualidade do RNA obtido se mostrou adequada e superior às

demais metodologias, com valores de A_{260}/A_{280} que variam de 2,04 à 1,94 com média de 1,99 ± 0,05 e A_{260}/A_{230} de 2,2 à 1,8 com média de 2,00 ± 0,2. As demais metodologias apresentaram uma relação A_{260}/A_{230} aquém do esperado, sugerindo presença de contaminantes que podem vir a interferir nas análises subsequentes.

Tabela 2. Concentração e qualidade do RNA extraído a partir de folhas de alface com diferentes metodologias.

	Trizol			**Plant RNA Reagent**			**CTAB modificado**			**CTAB**		
Amostra	Concentração (ng/µl)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Concentração (ng/µl)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Concentração (ng/µl)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Concentração (ng/µl)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
1	218,8	2,3	0,8	24,4	5,75	0,15	81,9	2,04	2.17	75,8	1,4	0,4
2	145,1	1,6	0,2	35,6	1,9	0,5	16	1,94	1,84	53,2	1,6	0,5
3	156,8	2,2	0,35	20,6	1,6	0,2	58,8	2	2,13	57	1,4	1,05
4	149,2	1,7	0,4	23,3	2	0,5	110,4	2.01	2,24	72,4	2,3	2,15
5	285,2	2,2	0,25	151,2	2	0,4	57,6	2.02	1,8	29,5	1,8	0,8
Média	191,0	2	0,4	51,0	2,6	0,3	64,9	1,9	2,0	57,5	1,7	0,9
DP	60,5	0,3	0,2	56,2	1,7	0,1	34,7	0,05	0,2	18,4	0,3	0,7

Os métodos de isolamento de RNA por TRIzol e *Plant RNA Reagent* contam com apenas um tampão. Através dele ocorre a lise do material e a separação em duas fases, aquosa e orgânica, seguido da precipitação do RNA. Assim, os grandes fragmentos de polissacarídeos presentes após a digestão da amostra podem capturar os ácidos nucleicos presentes nesta amostra arrastado-os para a fase orgânica, ocasionando um baixo rendimento dessa metodologia (McRAE, 2007). Além disso, pequenos fragmentos de polissacarídeos podem permanecer na fase aquosa, durante a separação das fases, e co-precipitar com o RNA, resultando em um RNA de baixa qualidade (DELLACORTE, 1994).

Por outro lado, o método CTAB é mais laborioso e conta com diferentes soluções. Inicialmente a amostra é lisada com um tampão contendo CTAB que é um detergente, que juntamente com cloreto de sódio induzem a osmose de forma que a célula perde água para o meio ocorrendo a plasmólise, rompendo associações hidrofóbicas, destruindo a bicamada lipídica, dissociando proteínas e lipoproteínas. Outro reagente também utilizado é o β-mercaptoetanol, que possui um grupamento SH na sua estrutura, rompendo assim pontes dissulfeto, consequentemente desnaturando proteínas. Já o CHISAM, mistura de clorofórmio e álcool isoamílico, é responsável por desnaturar ribonucleases que podem ser responsáveis pela degradação do RNA, e também coagula proteínas durante a extração. Nesta mistura, o clorofórmio é responsável por separar a solução em fase aquosa, que contém DNA e RNA, e fase orgânica, contendo proteínas, lipídeos e polissacarídeos. A última etapa de lavagem dupla é realizada aplicando etanol 70% para remoção de resíduos de sais. Esta extração em etapas e com uma diversidade maior de reagentes resultou em perda de ácidos nucleicos no processo; porém, o RNA isolado se mostrou mais puro, especialmente quando sua versão modificada foi utilizada.

A modificação realizada, desta forma, se mostrou a metodologia mais satisfatória, por resultar em RNA de alta qualidade, ser uma metodologia menos laboriosa do que sua versão tradicional e menos onerosa, comparada às demais metodologias. Resultados similares foram observados por Messias et al. (2014), utilizando amostras de grãos de milho, e Chang et al. (2016), utilizando amostras de Tuia-da-China (*Platycladus orientalis*). Mraz et al. (2009)

mostra que TRIzol é a melhor metodologia para isolamento e estabilidade de MicroRNA em amostras de RNA armazenadas. Diante disso, os resultados mostram que é necessário testar diferentes metodologias, visto que cada tecido apresenta constituintes químicos diferentes que fazem com que uma determinada metodologia seja mais adequada para isolar o RNA daquele tecido.

5.3 Amplificação de oligonucleotídeos projetados para uso em RT-qPCR

Para amplificação dos genes relacionados à síntese de ácido ascórbico, tocoferol e compostos fenólicos em alface, foram projetados oligonucleotídeos relacionados aos seguintes genes: os genes de referência, Adenosil fosforibosil transferase (APT1), Actina (ACT), Subunidade gama do fator de iniciação de alongamento (EIF2A), Fator de iniciação de tradução eucariótica 4a1 (EIF4a1), Tap42- proteína de interação com 41 kDa (TIP41), Ubiquitina proteína ligase (UBC21) e Ubiquitina (UBC); os genes relacionados à biossíntese dos compostos fenólicos, Fenilalanina amônia-liase (FAL), Flavonol sintase (FLS) e Chalcona sintase (CHS); os genes associados ao acúmulo de ácido ascórbico, L-Galactona 1,4-Lactona desidrogenase (GAL), L-Galactose desidrogenase (GALDH), GDP- Manose 3'-5' epimerase (GME), GDP galacto transferase (VTC2.5.1 E VTC2.5.2), Monodehidroascorbato redutase (MDHR1 e MDHR2), Galactona-lactona desidrogenase (GLDH1 e GLDH2), dehidroascorbato redutase (DHR), L-ascorbato oxidase (LAO) e Galacto fosfato fosfatase (VTC4); e genes associados ao metabolismo dos tocoferóis, Hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPPD) e Tocoferolmetil redutase (TMT/VTE4).

Para isso foram considerados alguns pré-requisitos, como a temperatura de anelamento entre 55-60º, própria para utilização na maioria dos termocicladores de RT-qPCR e o *amplicon* entre 100-150 pb. Além disso, preconizou-se que estes oligonucleotídeos não tivessem predições *in silico* para formação de dímeros e *hairpins,* uma vez que essas estruturas secundárias são detectadas pelo SYBR Green oferecendo uma fluorescência inespecífica, resultando em valores superestimados de expressão gênica

quando utilizados em RT-qPCR. Os oligonucleotídeos projetados, bem como as informações referentes a estes aspectos estão constadas na tabela 3.

Tabela 3: Oligonucleotídeos projetados para uso em RT-qPCR

Gene	G.B./ L.G.R*	Tamanho Gene (pb)	PF	TM	PR	TM	Tamanho amplicon (nt)	Amplificação por PCR
ACT	AY260165.1	386	AGGGCAGTGTTTCCTAGTATTGTTG	-	CTCTTTTGGATTGTGCCTCATCT	-	106	SIM
APT1	AT1G27450	879	CTGTACAAGAAGGAGAACGAGC	55	ACGAGCACATACAGTGGCTT	53,9	184	SIM
EIF4A1	AT3G13920	1066	CTTCATAGGATTGGGCGAAG	53,3	TATGAGATCCGCAACATTCG	54,7	150	SIM
EIF2A	EU028334	1400	TAGGCGAGTGGAGAAGCATT	53,2	GTAGAAACAGCAACAGGCAAA	55	71	SIM
TIP41	LACT_SATI.CST1.6123	**	GAGAGATTTGCTGGAGGGAAACTA	-	CCTTTGACTGATGATGTTTGGA	-	101	NÃO
UBC21	AT5G25760	474	TCTTAGATCACCGTCCCATCGT	55	TCTGAGATTGTCCGAGGATATGAG	55	89	SIM
UBQ	GW397659	285	AAGACCTACACCAAGCCCAA	-	AAGTGAGCCCACACTTACGA	-	197	NÃO
LsFAL	**	**	GACTGCTGACCACGACACACTC	54,7	TTGGTAATGGCGGAGAATGACCC	55	-	NÃO
LsFLS	AT5G63590	927	TGGCTATTGGCACTGCTAACCC	55	CGCACATGCGCTTGAACTTCTC	54,7	117	SIM
LsCHS	AT5G13930	427	TGGCTATTGGCACTGCTAACCC	54,7	CGCACATGCGCTTGAACTTCTC	53,8	105	SIM
LsGalDH	AT4G33670	1292	GGTGTGGGTGTGATAAGTG	54,4	CGACGAAATCTCCTTGTTTGC	55	295	SIM
LsGLDH1	AT3G47930	1833	AAAGTACAAACGCCAACCAAATG	55	ATTTCATCGCTCCACCCTACC	54,4	217	SIM
LsGLDH2	LSA039520.1	1634	GCTTCACCTTTATCAATGGGACTT	54,7	TCACCCTTCATAACTTCCATAGCA	55	248	SIM
LsLAO1	LSA014455.1	2238	TGGGTTGTTGGATATGGAAGTG	53,8	CCCTTCTTCAAACACCGCC	54,4	213	NÃO

*G.B.: GenBank *L.G.R.: Lettuce Genome Resourse
** Retirado de Borowski et al. (2014)

Tabela 3: Oligonucleotídeos projetados para uso em RT-qPCR

Gene	G.B./ L.G.R	Tamanho Gene (pb)	PF	TM	PR	TM	Tamanho amplicon (nt)	Amplificação primer
LsLAO2	LSA077373.1	1936	TATTGGATCTTCGGTGGGTTG	55	TGGTTGGAGGTCGTGGTGA	54,4	199	SIM
LsMDHR1	LSA034218.1	2684	ACTTGGTTGTTATTGGTATTGGAGC	54,7	TGCCACATCACCAATAGCGA	55	146	SIM
LsMDHR2	LSA071054.1	3909	ATGACCAGTGGAGAGGTGAAAGAAGAAGT	55	AAGTAGCAACATCACCAAGAGCAT	54,7	201	SIM
LsDHR1	LSA006289.1	1609	CTGATGTTATTGTGGGTCTGATTGA	54,7	TTTCTCCATTCACATAAGGTCCAT	54	216	SIM
LsDHR2	LSA091703.1	1644	CCAAATCGTCTATCACTGTCCCTA	54,1	CGGGTGGAGTCAACAATGGT	54,4	231	NÃO
LsVTC2_5.1	LSA000378.1	1777	TCCTCCTCCCTCAGTGTTATGC	54,7	ATTTCATCGCTCCACCCTACC	55	245	SIM
LsVTC2_5.2	LSA026928.1	1833	CAATGGCAATGGCAATGACA	55	AGCATAACACTGAGGAAGGACAAAG	55	220	SIM
LsVTC4.1	AT3G02870	1289	CCCTCATTGCTTTACTTCACAGA	52,9	CCACTACAGCATCGCCACTAAA	55	201	SIM
LsGME	Lsa084944.1	4780	ATGGAAAGGCGGAAGGGA	54,2	GCTTACCATCTCATCACTTCCAATA	53,5	199	NÃO
LsTMT	LSA007954.1	1904	CCCTGGTGAAGAATCCCTACG	55	GGCAACATTCTCCGACCAGT	54	163	NÃO
LsTMT2	LSA018192.1	2168	CCCTGGTGAAGAATCCCTACG	55	GGCAACATTCTCCGACCAGT	53,8	163	NÃO
LsHPPD	AF000228	1164	AGGATCCTCAATGGGCCACCAAAACGCCGCCG	53,2	AAGCTTCATCCCACTAACTGT TTGGCT TC	54,2	171	SIM
LsHPPD5	LSA121657.1	8439	AGAGAGATGAAGCGGCGGA	54,8	GTGCCCTCGTTATCTCTGTCTACC	55,1	167	NÃO

*G.B.: GenBank *L.G.R.: Lettuce Genome Resourse

A fim de analisar a expressão de genes em PCR tempo real, primeiramente se faz necessária a verificação da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos projetados, para isso foi feita uma PCR convencional com os oligonucleotídeos desenhados, podendo ser observada na figura 6.

Para essa análise, foram utilizados três cDNAs diferentes, previamente sintetizados em nosso laboratório, afim de auxiliar na verificação da amplificação. Na figura 6, gel 1, foi utilizado nos poços 1, 2 e 3 a amostra A, nos poços 4, 5 e 6 a amostra B, e nos poços 7, 8 e 9 a amostra C. Ambas amostras A, B e C foram obtidas a partir de folhas de alface controle. Pode ser observado que em todos foi apresentado amplificação, indicando integridade desses cDNAs. No gel 2 e 3 a escolha foi a A, já no gel 4 foi a B. A diferença de cDNA pode explicar a não amplificação dos genes VTC4 e MDHR2 no gel 2 e posterior amplificação dos mesmos em gel 4.

Cinco genes de referência ACT, APT1, EIF4a1, EIF2 e UBC21, dois genes do metabolismo de fenilpropanóides FLS e CHS, 10 genes da rota metabólica de ácido ascórbico GalDH, GLDH1, GLDH2, LAO2, MDHR1, MDHR2, DHR1, VTC2.5,1, VTC2.5.1 e VTC4, e um gene relacionado à síntese de tocoferóis HPPD, apresentaram amplificação única e específica, sugerindo que, nas condições utilizadas para essa amplificação, já podem ser utilizados para RT-qPCR. Neste caso, foram utilizados 0,5 µL de cada um dos oligonucleotídeos, e uma temperatura de anelamento de 54 ºC. Entretanto, para os genes TIP41A e TMT2 é possível observar que houve uma amplificação de dois fragmentos, indicando que estes oligonucleotídeos estão amplificando sequências inespecíficas, ou que estes genes apresentam isoformas capazes de serem detectadas com estes conjuntos de oligonucleotídeos. O restante dos oligonucleotídeos não apresentaram amplificação. Esse resultado pode ser devido esses genes serem pouco expressos na folha de alface, podendo ser expressos em outros tecidos ou mediante ativação por condições bióticas, abióticas ou de desenvolvimento. É possível ainda que estes oligonucleotídeos não sejam os mais adequados para amplificação destes genes, necessitando a projeção de novas sequências alternativas.

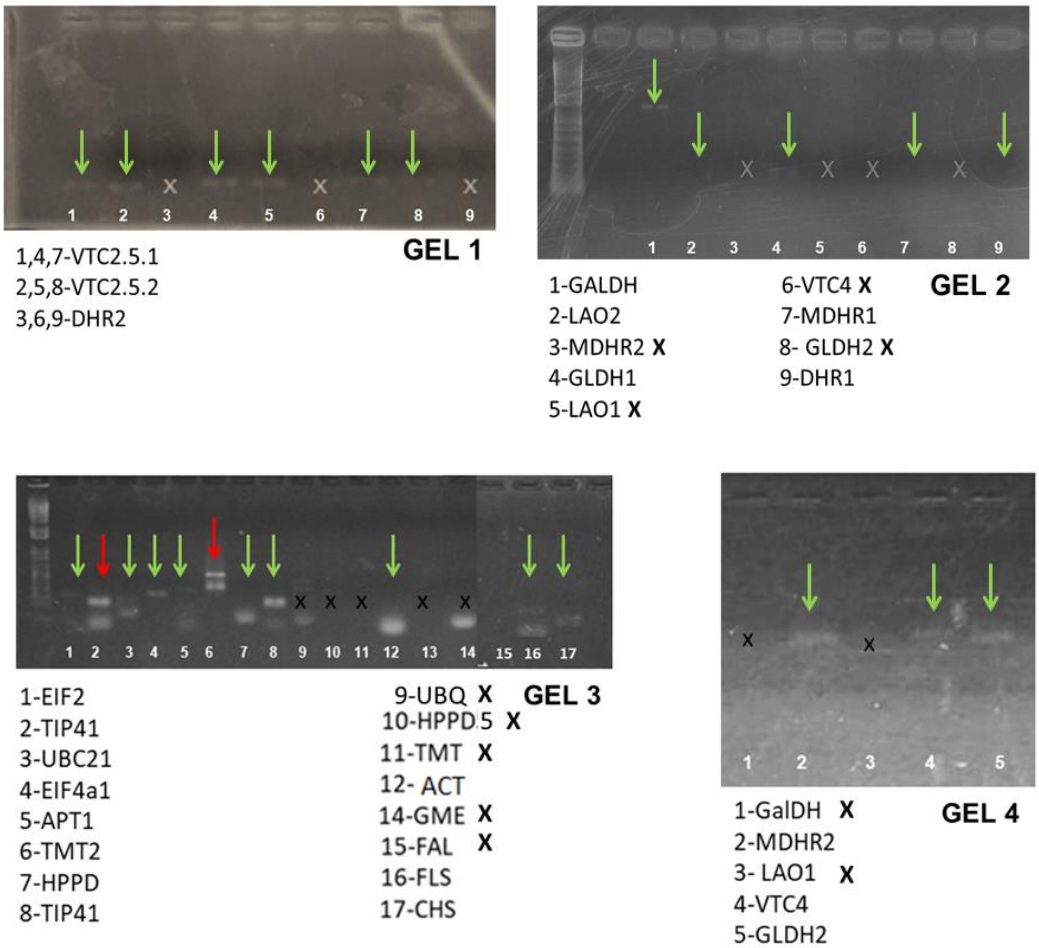

Figura 6: Verificação da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos projetados através de PCR seguida de eletroforese em gel de agarose. As setas verdes indicam amplificados, setas vermelhas indicam formação de bandas inespecíficas e amostras marcadas com 'X' não amplificaram.

Em relação aos genes amplificados, diferentes estudos utilizando a técnica de RT-qPCR revelam comportamentos distintos para esses genes. De acordo com Borowski et al. (2015), o gene UBC21 em alface se mostra eficiente para utilização como *housekeeping* ou normalizador nesta cultura, devido sua integridade em diferentes tecidos e condições. Já em trabalho realizado por Oh et al. (2008), observou-se que estresse por alta luminosidade não altera os níveis de expressão de FAL e TMT, entretanto os transcritos de GalDH apresentaram alta expressão mediante esse estresse. Em *Arabidopsis thaliana,* a expressão de VTC2 é mais pronuncaiada em folhas do que em raízes, durante todos os estádios de desenvolvimento (MÜLLER-MOULÉ, 2008). Já em condições de estresse térmico (calor) na mesma planta (*A. thaliana*) foi verificado um aumento da expressão dos genes *MDHR*, *DHR1* e *DHR2* (LI et al., 2016). De forma concomitante, Galli et al. (2018), observou

aumento da expressão do gene GME em frutos de morango (*Fragaria x ananassa*) submetidos à aplicação de estresse salino e hidrico. Em suma, estes resultados sugerem uma influência destes genes em condições de estresse em diferentes plantas, e, por isso, serão avaliados no experimento de estresse hídrico moderado em alface, descrito neste estudo.

6 Conclusões

Neste estudo, através do cultivo de alface sob condições de estresse hídrico moderado, foi possível testar diferentes metodologias para isolamento de RNA, utilizando folhas de alface adulta, permitindo avaliar quantidade e qualidade do RNA extraído, mostrando que para folhas de alface, a metodologia utilizando CTAB modificada apresentou os melhores resultados comparado as demais.

Dentre todos os genes avaliados, cinco genes de referência (ACT, APT1, EIF4a1, EIF2 e UBC21), dois genes do metabolismo de fenilpropanóides (FLS e CHS), 10 genes da rota metabólica de ácido ascórbico (GalDH, GLDH1, GLDH2, LAO2, MDHR1, MDHR2, DHR1, VTC2.5,1, VTC2.5.1 e VTC4), e um gene relacionado à síntese de tocoferóis (HPPD), apresentaram amplificação única e específica, sugerindo que, nas condições utilizadas para essa amplificação, já podem ser utilizados para RT-qPCR. Os demais oligonucleotídeos ainda precisam ser otimizados, seja alterando condições da PCR, avaliando em outros tecidos e/ou condições experimentais, ou projetando novos oligonucleotídeos de forma a permitir uma amplificação específica.

Estudos futuros serão direcionados em utilizar estes oligonucleotídeos para avaliar a expressão, através da técnica de RT-qPCR, de genes relacionados aos metabolismos de fenilpropanóides, ácido ascórbico e tocoferóis nas amostras provenientes do experimento de estresse hídrico moderado executado no presente estudo.

7 REFERÊNCIA

ADAMS, Mark. 3,400 new expressed sequence tags identify diversity of transcripts in human brain. **Nature Genetics**, v. 4, p. 256−267. 1993.

AKINCI, Nadir et al. Versatile rigid-fluid coupling for incompressible SPH. **ACM Transactions on Graphics (TOG)**, v. 31, n. 4, p. 62, 2012.

AKRAM, Nudrat Aisha; SHAFIQ, Fahad & ASHRAF, Barakat. Ascorbic Acid-A Potential Oxidant Scavenger and Its Role in Plant Development and Abiotic Stress Tolerance. **Frontiers in Plant Science**, 8. 2017.

ALSCHER, Ruth et al. Demmig-Adams, B. (1993). Antioxidants in Higher Plants. Boca Raton: **CRC Press**, 1993

BAENAS, Nievas et al. Elicitation: A Tool for Enriching the Bioactive Composition of Foods hytochemistry Laboratory, Department of **Food Science and Technology**, CEBAS-CSIC.

BETTAIEB, Iness et al. Drought effects on polyphenol composition and antioxidant activities in aerial parts of Salvia officinalis L. Acta Physiol. Plant. 33, 1103–1111. 2011.
BORGHI et al. Special: IV range (vegetables). **Colt Protette** 32:21–43, 2003

BORGHESI, Eva et al. Effects of calcium and salinity stress on quality of lettuce in soilless culture. **Journal of Plant Nutrition**, v.36, p. 677-690, 2013.

BOROWSKI, Joyce et al. Selection of candidate reference genes for real-time PCR studies in lettuce under abiotic stresses. **Planta**. 2014.

BUSTIN, Stephan et al. The MIQE Guidelines: minimum Information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, Washington, D.C., v. 55, p. 611-622, 2009.

CALSA, Junior et al. Análise serial da expressão genérica. Revist **Biotecnologia – Ciência & Desenvolvimento**, ed. 33, jul./dez. 2004.

Chang, Ermei et al. Isolation of high-quality RNA from Platycladus orientalis and other Cupressaceae plants. Electronic Journal of Biotechnology, 23, 21–27. 2016.

CHON, Sang-Uk et al. **Allelopathic potential in lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants.** Scientia horticulturae, v. 106, n. 3, p. 309-317, 2005

COLLAKOVA, Eva. & DELLAPENNA, Dean 'The role of homogentisate phytyltransferase and other tocopherol pathway enzymes in the regulation of tocopherol synthesis during abiotic stress', Plant Physiology 133, 930–940. 2003.

Comissão De Química E Fertilidade DO Solo—CQFS RS/SC (2004) 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, p 400

COSTA, Cyro & SALA, Fernando. A evolução da alfacicultura brasileira. Horticultura Brasileira, Brasília, v. 23, n. 1, p. 118-120, 2005

DAVEY, Mark et al. PlantL-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80(7), 825–860. 2000.

DELLACORTE, C. Isolation of nucleic acids from the sea anemone Condylactisgigantea (Cnidaria: anthozoa). **Tissue Cell** 194;26:613–9.1994.

DELLA VECCHIA, Paulo.; KOCH, Paulo; KIKUCHI, Masami. Vera: Nova cultivar de alface crespa resistente ao florescimento prematuro. **Horticultura Brasileira**, v. 17, p. 171, 1999.

DEL RIO, Daniele; et al. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, 18(14), 1818–1892. 2013.

DuPont, Susan et al. Effect of Variety, Processing, and Storage on the Flavonoid Glycoside Content and Composition of Lettuce and Endive. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48(9), 3957–3964. 2000.

DURAZZO, Alessandra et al. Antioxidants in italian head lettuce (Lactuca sativa var. Capitata L.) grown in organic and conventional systems under greenhouse conditions. J**ournal of Food Biochemistry**, v.38, p. 56-61, 2014.

FENOL EXPLORER, banco de dados http://phenol-explorer.eu/contents/food/314 acessado em 26/10/2018 (acessado em: outubro de 2018)

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (**FAOSTAT**), Crop Lettuce, production quantity, acessado em outubro de 2018.

GALLIE, Daniel. The role of l-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. **Journal of Experimental Botany**, v.63, p. 695–709, 2013

Galli, Vanessa; et al. Transcriptome analysis of strawberry (Fragaria × ananassa) fruits under osmotic stresses and identification of genes related to ascorbic acid pathway. **Physilogia Plantarum.** 2018.

GAO, Yinghzi & LYNCH, Jonathan. Reduced crown root number improves water acquisition under water deficit stress in maize (Zea maysL.). **Journal of Experimental Botany**, 67(15), 4545–4557. 2016.

GARRIDO, Yolanda et al. Physiological, phytochemical and structural changes of multi-leaf lettuce caused by salt stress. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.94, p. 1592-1599, 2013

GESS, B. et al. Ascorbic acid for the treatment of Charcot-Marie-Tooth disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. 2015.

GOSSETT, Dalton et al. Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. **Crop Sci** 34: 706–714. 1994.

HAWRYLAK-NOWAK, Barbara. Comparative effects of selenite and selenate on growth and selenium accumulation in lettuce plants under hydroponic conditions. Plant Growth Regulation, v.70, p. 149–157, 2013.

HAVAUX, Michel et al. Photodamage of the photosynthetic apparatus and its dependence on the leaf development stage in the npq1 Arabidopsis mutant deficient in the xanthophyll cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase. **Plant Physiol** 124: 273–284. 2000.

HERMS, Daniel & MATTSON, Willian. The dilemma of plants: to grow or defend. **Q. Rev. Biol**. 67, 283–335. 1992

HOTZ, C. Biofortification. In: Encyclopedia of Human Nutrition, **Oxford: Elsevier** 3.ed, 2013. p.175-181.2013.

HURD, E. A. Plant breeding for drought resistance. Water deficits and plant growth. (ed. by T.T. Kozlowski). Vol IV. pp. 317-353**. Academic Press**, U.S.A.1976.

KANSAL, Recka; et al. Improved andn convenient method of RNA isolation from polyphenols and polysaccharide rich plant tissues. **Indian J Exp Biol** ;46:842–5.2008.

KELES & ÖNCEL. Response of antioxidative defence system to temperature and water stress combinations in wheat seedlings. **Plant Sci.** 163, 783–790.2002.

LAWBE, et al. Measuring and modelling seasonal variation of carbon dioxide and water vapour exchange of a Pinus ponderosa forest subject to soil water deficit. Global Change Biology, 6: 613-630. 2000.

LEBEDA, Ales; et al.Wild Lactuca species, their genetic diversity, resistance to diseases and pests, and exploitation in lettuce breeding. **European Journal of Plant Pathology**, v.138, 597-640, 2013

LEE, Jung; et al. Effects of dietary supplementation with redpigmented leafy lettuce (Lactuca sativa) on lipid profiles and antioxidant status in C57BL/6J mice fed a high-fat high-cholesterol diet. **British Journal of Nutrition**, v.101, p. 1246-1254, 2009

LEE, Koeun; et al. Overexpression of Arabidopsis homogentisate phytyltransferase or tocopherol cyclase elevates vitamin E content by increasing c-tocopherol level in lettuce (Lactuca sativa L.) **Molecules and Cells,** v.24, p. 301–306, 2007

LEIPNER, Jorg; FRACHEBOUD, Yvan & STAMP Peter. Effects of growing season on the photosynthetic apparatus and leaf antioxidative defenses in two maize genotypes of different chilling tolerance**. Environ Exp Bot** 42: 129–139.1999.

LI, Huang et al.Expression profile analysis of ascorbic acid-related genes in response to temperature stress in the tea plant. **Genetic and Molecular Research**. 2016

LIN, Deron; et al. An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. **Molecules**, 21(10), 174.2016.

LLORACH, Rafael et al. Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. **Food Chem**. 108, 1028–1038.2008.

LUZ, Anny Carolyne. COMPARISON OF RNA EXTRACTION METHODS FOR Passiflora edulis SIMS LEAVES. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 38(1), 226–232. 2016.

LOCATTO, Vittoria; CIMINI, Sara & GARA, Laura De; Strategies to increase vitamin C in plants: from plant defense perspective to food biofortification. **Frontiers in Plant Science**, 2013

MACRAE, Elspeth. Extraction of Plant RNA. Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes, **Springer**.15–24.

MAROUELLI, Waldir; SILVA Washington & SILVA Henoque (2008) Irrigação por aspersão em hortaliças: qualidade da água, aspectos do sistema e método prático de manejo. **Embrapa Informação tecnológica.** Embrapa Hortaliças, Brasília

MASSOT, Capucine et al. High Temperature Inhibits Ascorbate Recycling and Light Stimulation of the Ascorbate Pool in Tomato despite Increased Expression of Biosynthesis Genes. **PLoS ONE**, 8(12), e84474. 2013.

MARTÍNEZ-BALLESTA, Carmen et al. Agricultural practices for enhanced human health**. Phytochemistry Reviews**, 7(2), 251–260.2008.

MCKERSIE & LESHEM. Chilling stress. In: McKersie, B.D., Leshem, Y.Y. (Eds.), Stress and Stress Coping in Cultivated Plants. **Kluwer Academic Publishers,** Dordrecht/Boston/London, pp. 79–103. 1994.

MENÈ-SAFFRANE & SÈBASTIEN-PELLUD Current strategies for vitamin E biofortification of crops .Current Opinion in Biotechnology 44(): 189–197, 2017

MÈNE-SAFFRANÉ, L., & PELLAUD, S. (2017). Current strategies for vitamin E biofortification of crops. **Current Opinion in Biotechnology**, 44, 189–197

MENTE, Andrew et al. A Systematic Review of the Evidence Supporting a Causal Link Between Dietary Factors and Coronary Heart Disease. **Archives of Internal Medicine,** 169(7), 659. 2009.

MESSIAS, Rafael et al. ISOLATION OF HIGH-QUALITY RNA FROM GRAINS OF DIFFERENT MAIZE VARIETIES. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 44(7), 697–707. 2014.

MITJAVILA % MORENO.The effects of polyphenols on oxidative stress and the arachidonic acid cascade. Implications for the prevention/treatment of high prevalence diseases. **Biochemical Pharmacology**, v.84, p. 1113–1122, 2012.

MOGREN, Lars; et al. Moderate water stress prevents the postharvest decline of ascorbic acid in spinach (Spinacia oleraceaL.) but not in spinach beet (Beta vulgarisL.). Journal of the Science of Food and Agriculture, 96(9), 2976–2980. 2015.

MORENO-ESCAMILLA, José Effect of Different Elicitors and Preharvest Day Application on the Content of Phytochemicals and Antioxidant Activity of Butterhead Lettuce (Lactuca sativa var. capitata). **Agricultural and Food Chemestry,** 2017.

MORGANTE, Carolina & BLAWID; Rosana. Análise da Expressão Gênica pela Técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real: Princípios e Fundamentos . **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA-Semiárido**. ISSN 1808-9992, 2016.

MUNNE-BOSCH & ALEGRE .Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in Rosmarinus officinalis plants**. Planta 210**: 925–931.2000.

MUNNÉ-BOSCH. α-Tocopherol: A Multifaceted Molecule in Plants. **Vitamins & Hormones**, 375–392.

MUNNÉ-BOSCH; SCHWARZ & ALEGRE. Water deficit in combination with high solar radiation leads to midday depression of -tocopherol in field-grown lavender (Lavandula stoechas) plants. Aust. J. **Plant Physiology**. 28, 315–321. 2001.

MUÑOZ & MUNNÉ-BOSCH. Photo-Oxidative Stress during Leaf, Flower and Fruit Development. **Plant Physiology**, 176(2), 1004–1014. 2017.

My Food Data: https://tools.myfooddata.com/nutrition-facts.php?food=11253&serv=wt1 acessado em outubro, 2018

OH, Myung-Min et al., Regulated Water Deficits Improve Phytochemical Concentration in Lettuce (2010) **Journal American Society for Horticultural Science**. 135(3):223–229. 2010.

OH, Myung- Min.; TRICK, H. N.; RAJASHEKAR, C. B. Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce**. Journal of Plant Physiology**, v.166, p. 180-191, 2009.

OSAKABE, Yurico et al. Response of plants to water stress. Frontiers in Plant Science, 5. 2014

PEH, Hong; et al. Vitamin E therapy beyond cancer: Tocopherol versus tocotrienol. **Pharmacology & Therapeutics**, 162, 152–169. 2016.

PERCIVAL, David & Mackenzie, Joanna. Use of plant growth regulators to increase polyphenolic compounds in the wild blueberry. **Can J Plant Sci** 87: 336-336 .2007.

PÉREZ-LOPEZ, Usue; et al. Concentration of phenolic compounds is increased in lettuce grown under high light intensity and elevated CO_2. **Plant Physiology and Biochemstry**, 2018.

RAHMAN & HASEGAWA. Water stress. Published **by InTech**. 277p. 2011.

Rangel-Huerta, Omar et al. A Systematic Review of the Efficacy of Bioactive Compounds in Cardiovascular Disease: Phenolic Compounds. Nutrients, 7(7), 5177–5216. 2015.

REN, Weiwei; et al. Overexpression of homogentisate phytyltransferase in lettuce results in increased content of vitamin E. **African Journal of Biotechnology**, v.10, p. 14046-14051, 2013.

RODRÍGUEZ-MORATÓ, José et al. Potential Role of Olive Oil Phenolic Compounds in the Prevention of Neurodegenerative Diseases. **Molecules**, 20(3), 4655–4680. 2015

ROLEIRA, Fernanda et al. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. **Food Chemistry**, 183, 235–258. 2015

SALA, Fernando & COSTA, Cyro. Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, v.30, p. 187-194, 2012.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ; ROMERO & RUIZ (2016). Accumulation of free polyamines enhances the antioxidant response in fruits of grafted tomato plants under water stress. **Journal of Plant Physiology**, 190, 72–78. 2016.

SANTOS, Francielly et al. Comparison of five agro-industrial waste-based composts as growing media for lettuce: Effect on yield, phenolic compounds and vitamin C. Food Chemistry, 209, 293–301. 2016.

SHAFID, Muhammed; SINGH, Zora and KHAN, Ahmad, Pre-harvest spray application of methyl jasmonate improves red blush and flavonoid content in Cripps Pink apple. **J Hortic Sci Biotechnol** 86: 422–430 .2011.

Singh, Balwinder et al. Bioactive compounds in banana and their associated health benefits – **A review. Food Chemistry**, 206, 1–11. 2016.

SMIRNOFF, Nicholas. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. **Free Radical Biology and Medicine**,2018.

SMIRNOFF, Nicholas & WHEELER, Glen. (2000). Ascorbic Acid in Plants: Biosynthesis and Function. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 35(4), 291–314.

STAGNARI, Fábio; et al. Water stress effects on growth, yield and quality traits of red beet. Scientia Horticulturae, 165, 13–22. 2014.

SONG, Wei et al. Cellular antioxidant activity of common vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**., v.58, p. 6621–6629, 2010.

SOFO, Adriano et al. Influence of water deficit and rewatering on the components of the ascorbate–glutathione cycle in four interspecific Prunus hybrids. **Plant Science**, v. 169, n. 2, p. 403-412, 2005.

STEVENS, R. et al. Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress. **Plant, cell & environment**, v. 31, n. 8, p. 1086-1096, 2008.

Streb P. et al. Divergent strategies of photoprotection in high-mountain plants. Planta 207: 313–324.1998.

TAVARINI, Silvia et al. Antioxidant capacity, ascorbic acid, total phenols and carotenoids changes during harvest and after storage of Hayward kiwifruit. **Food chemistry**, v. 107, n. 1, p. 282-288, 2008.

TIAN, Ye et al. Phenolic compounds extracted by acidic aqueous ethanol from berries and leaves of different berry plants. **Food chemistry**, v. 220, p. 266-281, 2017.

VALDÉS, Lorena et al. The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: impact on human health. **Food & function**, v. 6, n. 8, p. 2424-2439, 2015.

VALPUESTA, Victoriano; BOTELLA, Miguel A. Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. **Trends in plant science**, n.12, p. 573-577, 2004.

VIACAVA, Gabriela E. et al. Natural elicitors as preharvest treatments to improve postharvest quality of Butterhead lettuce. **Scientia Horticulturae,** v. 228, p. 145-152, 2018.

VISSERS, Margreet CM et al. Dietary ascorbate intake affects steady state tissue concentrations in vitamin C–deficient mice: tissue deficiency after suboptimal intake and superior bioavailability from a food source (kiwifruit)–. **The American journal of clinical nutrition**, v. 93, n. 2, p. 292-301, 2010

WANG, Shao-wei et al. Alpha-tocopherol quinine ameliorates spatial memory deficits by reducing beta-amyloid oligomers, neuroinflammation and oxidative stress in transgenic mice with Alzheimer's disease. **Behavioural brain research**, v. 296, p. 109-117, 2016.

WANG, Shiow Y.; ZHENG, Wei. Preharvest application of methyl jasmonate increases fruit quality and antioxidant capacity in raspberries. **International journal of food science & technology**, v. 40, n. 2, p. 187-195, 2005.

WANG, Shiow Y.; BOWMAN, Linda; DING, Min. Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (Rubus sp.) and promotes antiproliferation of human cancer cells. **Food Chemistry**, v. 107, n. 3, p.1261-1269,2008.

WHEELER, Glen L.; JONES, Mark A.; SMIRNOFF, Nicholas. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. **Nature**, v. 393, n. 6683, p. 365, 1998.

YIN, Lina et al. Overexpression of dehydroascorbate reductase, but not monodehydroascorbate reductase, confers tolerance to aluminum stress in transgenic tobacco. **Planta**, v. 231, n. 3, p. 609-621, 2010.

ZHONG, Chu et al. Nitrogen metabolism correlates with the acclimation of photosynthesis to short-term water stress in rice (Oryza sativa L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 125, p. 52-62, 2018.

ZŁOTEK, Urszula; ŚWIECA, Michał; JAKUBCZYK, Anna. Effect of abiotic elicitation on main health-promoting compounds, antioxidant activity and commercial quality of butter lettuce (Lactuca sativa L.). **Food chemistry**, v. 148, p. 253-260, 2014.

ZHU, Changfu et al. Biofortification of plants with altered antioxidant content and composition: genetic engineering strategies. **Plant biotechnology journal**, v. 11, n. 2, p. 129-141, 2013.