

COMPOSTOS COM POTENCIAL BIOESTIMULANTE INDUZEM METABOLISMO DE FENILPROPANÓIDES EM MORANGOS

JOYCE MOURA BOROWSKI¹; ELLEN CRISTINA PERIN²; JULIETI HUCH BUSS³;
VANESSA GALLI⁴; RAFAEL DA SILVA MESSIAS⁵

¹Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas - joyceborowski@gmail.com; ²Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas - ellenperin@hotmail.com; ³Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas - julietibuss@hotmail.com; ⁴Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - vane.galli@yahoo.com.br; ⁵Embrapa Clima Temperado - rafael.embrapa@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O crescente interesse por alimentos funcionais, principalmente aqueles ricos em compostos antioxidantes, tem estimulado estudos visando à identificação de fatores que podem controlar a biossíntese destes compostos em plantas; oferecendo a possibilidade de biofortificar culturas agrícolas para que apresentem maior conteúdo de antioxidantes. Dentre as técnicas de biofortificação, o uso de compostos com potencial bioestimulante vem sendo bastante abordado, sendo seus efeitos bem conhecidos no crescimento das plantas e na resistência a estresses bióticos e abióticos (MARFA et al. 2009; SPANN; LITTLE, 2010; KAVIPRIYA et al., 2011). No entanto, pouco se sabe sobre seu efeito na qualidade funcional de culturas agrícolas, relacionada com a síntese de antioxidantes benéficos à saúde, como as antocianinas (HE; GIUSTI, 2010).

Atualmente está sendo comercializado um fertilizante de aplicação foliar que tem como matéria-prima a água de xisto (AX), um subproduto do processo de industrialização do xisto (EMBRAPA, 2008), o qual devido à diversidade de elementos presentes em sua matriz pode apresentar potencial para uso como bioestimulante.

Dentre as frutas ricas em compostos antioxidantes, o morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) destaca-se pelo conteúdo relevante de micronutrientes, vitamina C, ácido fólico e compostos fenólicos, como as antocianinas (TULIPANI et al., 2008; GIAMPIERRI et al., 2013). A biossíntese de antocianinas é mediada por múltiplas enzimas, sendo as principais a fenilalanina amônia liase (FAL), enzima de entrada da rota de fenilpropanóides, e a UDP flavonóide glicosil transferase (UFGT), enzima final que codifica diretamente para antocianinas.

Um estudo abordando a expressão de genes de interesse desta rota, além da atividade enzimática e acúmulo final dos principais metabólitos, será útil para abordagens de biofortificação através de engenharia metabólica. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de compostos com potencial bioestimulante no metabolismo de fenilpropanóides de morangos, com ênfase na biossíntese de antocianinas.

2. METODOLOGIA

2.1 Condições de crescimento e tratamentos

O experimento foi realizado em casa de vegetação, na sede da Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, com mudas de morango (cv Camarosa). A adubação de base foi aplicada de acordo com as recomendações técnicas para a cultura (CQFS, 2004). A irrigação foi realizada com água destilada por capilaridade de forma a manter o nível ideal de umidade no solo constante (25% ± 5%). O desenho experimental foi completamente randomizado, consistindo em três

tratamentos, com quatro réplicas biológicas e seis plantas por parcela. Os tratamentos foram: Controle (Água destilada), ALG (Algattive) e AX+Mn (Água de xisto adicionada de manganês). Foram feitas seis aplicações foliares dos produtos com potencial bioestimulante durante a fase de desenvolvimento da cultura. O tratamento com o bioestimulante comercial ALG (SoloStock®) totalizou uma dose de 2L.ha⁻¹ do produto, de acordo com as doses recomendados pelo fabricante; e o tratamento com AX+Mn totalizou uma dose de 48L.ha⁻¹ de AX adicionada de 3% de manganês.

2.2 Avaliação da expressão gênica

A extração de RNA total foi realizada pelo método proposto por CHANG et al. (1993), sendo a qualidade do RNA avaliada por espectrofotometria (relações A₂₆₀/A₂₈₀ e A₂₆₀/A₂₃₀) e por eletroforese em gel de agarose 1%. A concentração de RNA foi calculada utilizando a técnica de fluorometria (QuBit-RNA BR, Invitrogen™). Para a síntese de cDNA alíquotas de 1µg de RNA total foram digeridas com 1U DNase e 1x DNase I Reaction Buffer (Invitrogen™) e o RNA digerido foi utilizado para transcrição reversa utilizando a enzima M-MLV (conforme fabricante Invitrogen™). Os cDNAs foram amplificados por PCR em tempo real, em um volume final de 20µL, contendo 10ng de cDNA, 10µL de Platinum SYBR Green UDG (Invitrogen™), e 2-5pmol de cada primer. A amplificação foi padronizada em um termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems) utilizando as seguintes condições: 50°C por 20", 95°C por 10", seguido por 45 ciclos de 15" a 95°C e 1' a 60°C. As condições da curva de dissociação foram: 15" a 95°C, 1' a 60°C, 30" a 95°C e 15" a 60°C. Os *primers* para a FAL e UFGT, bem como os *primers* da actina (ACT), 18S ribossomal (18S) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), utilizados como genes de referência, foram construídos com o auxílio do programa Vector NT110 (Invitrogen™) a partir de sequências de *Fragaria x ananassa* obtidas no banco NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A eficiência dos *primers* foi previamente avaliada mostrando-se superior a 90%.

2.3 Determinação da atividade da FAL e do teor de antocianinas totais

A atividade da FAL foi determinada por espectrofotometria segundo CAMPOS et al. (2003). O resultado foi expresso em µmol de enzima por hora por grama de tecido (µmol.h.g⁻¹). A avaliação de antocianinas totais foi realizada por espectrofotometria de acordo com ZHANG et al. (2004). O teor de antocianinas totais foi expresso em miligrama de pelargonidina por 100 gramas de fruta liofilizada (mg.100g⁻¹).

2.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa computacional SAS system for windows versão 9.1.3 (SAS, 2000). Foram analisados os pressupostos nos dados obtidos e posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância (p≤0,05). Foram comparados os efeitos dos produtos com potencial bioestimulante pelo teste Tukey (p≤0,05).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que tanto ALG quanto AX+Mn promoveram um aumento na expressão do gene *FAL*, em relação ao controle, induzindo a transcrição dos genes que codificam para esta enzima, que participa da reação de desaminação do aminoácido L-fenilalanina formando o ácido cinâmico, precursor das

antocianinas, entre outros fenóis. No entanto, este incremento no nível de transcritos do gene *FAL* não foi acompanhado pelo aumento da atividade enzimática da *FAL*, visto que não houve diferença significativa entre os tratamentos e o controle (Fig. 1a).

ALG e Ax+Mn também promoveram aumento nos níveis de expressão do gene *UFGT*, em relação ao controle, indicando que este foi induzido pela cascata de reações iniciada pelo gene *FAL*, pois não existe outra etapa da rota metabólica onde *UFGT* atue que não a iniciada pela *FAL*. A *UFGT* é a última enzima na biossíntese de antocianinas, realizando a reação de glicosilação das antocianidinas; são estes açúcares que conferem estabilidade e solubilidade às moléculas de antocianinas (YOSHIHARA et al., 2005). Porém, o incremento no nível de transcritos de *UFGT* não foi acompanhado pelo aumento do teor de antocianinas total nestes tratamentos (Fig. 1b).

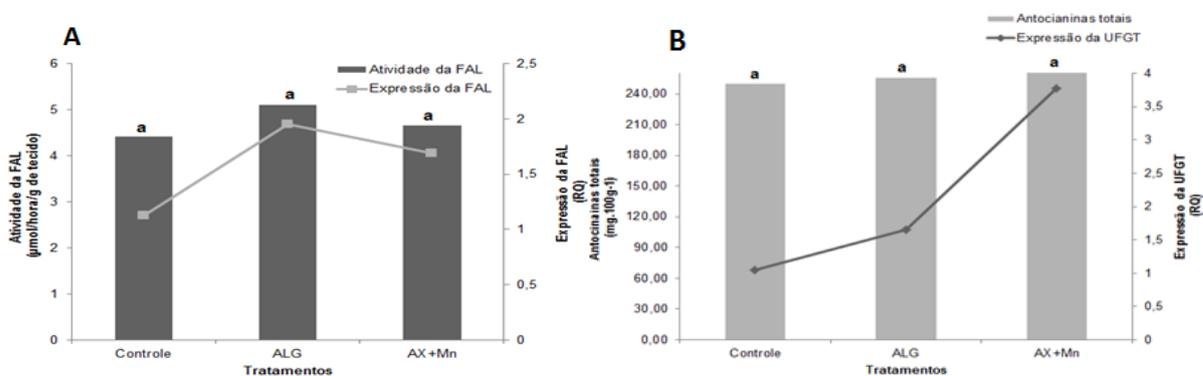


Figura 1 – (A) e (B) Efeito do ALG e da AX+Mn no metabolismo de fenilpropanóides de morango

^{1/}Médias acompanhadas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Frente aos resultados, sugere-se que ALG e AX atuam em duas etapas da rota biossintética de fenilpropanóides: logo no início da rota, através da indução de *FAL*, e no braço da rota que dá origem à antocianinas, pela indução de *UFGT*. Entretanto, existe algum tipo de regulação pós-transcricional durante o processo de síntese de antocianinas, pois não foi observado incremento no acúmulo final deste metabólito, em relação ao controle. Além disso, deve-se considerar que *FAL*, sendo o primeiro gene a ser transcrito da rota de fenilpropanóides, não está relacionado apenas com a síntese de antocianinas, mas também com outros compostos fenólicos derivados desta rota metabólica, tais como taninos, ácido gálico, caféico, clorogênico e cinâmico (BASHA et al., 2006).

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que ALG e AX são compostos com potencial bioestimulante que atuam no metabolismo de fenilpropanóides pela indução de genes importantes desta rota. No entanto, mais estudos precisam ser realizados com intuito de identificar fatores que possam estar regulando esta rota.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASHA, S. A.; SARMA, B.K.; SINGH, D.P.; ANNAPURNA, K.; SINGH, UP. Differential methods of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria induce synthesis of phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds differentially in chickpea. *Folia Microbiologica*, v.51, p. 463–468, 2006.

CAMPOS, Â. D.; FERREIRA, A.G.; HAMPE, M.M.V.; ANTUNES, I.F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E.P.; SILVA, J.B.; OSÓRIO, V.A. Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.15, p. 129-134, 2003.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.11, p. 113-116, 1993.

CQFS. COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO- RS/SC. Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. 10 ed. Porto Alegre: SBCS - Núcleo Regional Sul/UFRGS, 2004. 400 p.

EMBRAPA. Água de xisto é comercializada. Disponível em: <http://www.embrapa.br/embrapa/imprensa/noticias/2008/julho/5a-semana/agua-de-xisto-ja-esta-sendo-comercializada>. Acesso em 04 de outubro de 2013.

GIAMPIERI, F.; ALVAREZ-SUAREZA, J. M.; MAZZONIA, L.; ROMANDINIA, S.; BOMPADREB, S.; DIAMANTIC, J.; CAPOCASAC, F.; MEZZETTIC, B.; QUILESD, J. L.; FERREIROE, M. S.; TULIPANIF, S.; BATTINOA, M. The potential impact of strawberry on human health. **Natural Product Research**, v.27, p. 448-455, 2013.

HE, J.; GIUSTI, M. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. **Annual Review Food of food Science and Technology**, v.1, p. 163–187, 2010.

KAVIPRIYA, R.; DHANALAKSHMI, P.; JAYASHREE, S. K.; THANGARAJU, N. Seaweed extract as a biostimulant for legume crop, green gram. **Journal of Ecobiotechnology**, v.8, p. 16-19, 2011.

MARFA, O.; CÁCERES, R.; POLO, J.; RÓDENAS, J. Animal protein hydrolysate as a biostimulant for transplanted strawberry plants subjected to cold stress. **Acta Horticulturae**, v.842, p. 315–318, 2009.

SPANN, T. M.; LITTLE, H. A. Effect of Stimplex® crop biostimulant on drought tolerance of 'Hamlin' sweet orange. Proceedings of the 37th Annual Meeting of the Plant Growth Regulation Society of America, Portland, Oregon, USA, 8-12 August 2010.

TULIPANI, S.; MEZZETTI, B.; CAPOCASA, F.; BOMPADRE, S.; BEEKWILDER, J.; VOS, C. H.; CAPANOGLU, E.; BOVY, A.; BATTINO, M. Antioxidants, phenolic compounds, and nutritional quality of different strawberry genotypes, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p. 696–704, 2008.

YOSHIHARA, N.; IMAYAMA, T.; FUKUCHI-MIZUTANI, M.; OKUHARA, H.; TANAKA, Y.; INO, I.; YABUYA, T. cDNA cloning and characterization of UDP-glucose: anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase in *Iris hollandica*. **Plant Science**, v.169, p. 496–501, 2005.

ZHANG, Z.; KOU, X.; FUGAL, K.; MCLAUGHLIN, J. Comparison of HPLC methods for determination of anthocyanins and procyanidins in bilberry extracts. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.52, p.688