

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Tese

**ELICITORES ABIÓTICOS NO ESTRESSE OXIDATIVO E NA EXPRESSÃO
DE GENE DA ROTA DE BETACIANINA EM *Alternanthera philoxeroides*
(Mart.) Griseb.**

Márcia Vaz Ribeiro

Pelotas, 2011

Márcia Vaz Ribeiro

**ELICITORES ABIÓTICOS NO ESTRESSE OXIDATIVO E NA EXPRESSÃO
DE GENE DA ROTA DE BETACIANINA EM *Alternanthera philoxeroides*
(Mart.) Griseb.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Fisiologia Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Eugenia Jacira Bolacel Braga

Coorientador: Prof. Dr. José Antonio Peters

Pelotas, 2011

**Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)**

R484e Ribeiro, Márcia Vaz

Elicitores abióticos no estresse oxidativo e na expressão de gene da rota de betacianina em *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb / Márcia Vaz Ribeiro; orientador Eugenia Jacira Bolacel Braga; co-orientador José Antonio Peters - Pelotas, 2011.-56f.: il.- Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011.

1.Erva-de-jacaré 2.Enzimas antioxidantes 3.Cloreto de sódio 4.Tirosina 5.Expressão diferencial 6.*Betanidina 5-O-glucosiltransferase* I. Braga, Eugenia Jacira Bolacel (orientador) II. Título.

CDD 577.1

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Eugenia Jacira Bolacel Braga

Prof. Dr. Luciano Carlos da Maia

Prof. Dr. Sidnei Deuner

Prof. Dr. Valmor João Bianchi

Aos meus pais Lourdes e Joaquim (in memoriam)
Ao meu marido Clóvis e minhas filhas Guilhermina e Theodora
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), através do Departamento de Botânica e do Curso Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pela oportunidade e estrutura física para a realização deste trabalho.

A Prof^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga pela orientação, amizade, carinho, dedicação, ensinamentos e apoio em todas as etapas do trabalho, bem como ao coorientador Prof. José Antonio Peters, meus sinceros agradecimentos.

Ao pesquisador Sidnei Deuner, por todo o apoio, dedicação e colaboração nas análises realizadas no Laboratório de Metabolismo Vegetal.

Ao Laboratório de Genômica e Fitomelhoramento, através do professor Luciano Carlos da Maia e das doutorandas Camila Pegoraro, Naciele Marini e Taciane Finatto pela disponibilidade de uso de aparelhos para as análises moleculares. Em especial ao “Paulista” por acreditar e apostar na nossa ideia e a “Naci” e a “Taci” pela incansável ajuda na interpretação dos resultados.

A esta força superior que nos rege, Deus, que através de meus pais Joaquim (*in memoriam*) e Lourdes me proporcionaram a vida e com ela todas as etapas e obstáculos ultrapassados para resultarem no que sou hoje.

A minha família e principalmente meu marido Clóvis e minhas filhas Guilhermina e Theodora por todo o apoio e compreensão proporcionados nas horas mais difíceis.

A todos os funcionários do Departamento de Botânica e Zoologia e Genética pela amizade nestes longos anos de convivência.

Aos colegas e amigos do LCTP (Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas) por estes anos de convivência e pela colaboração prestada, em especial Aline Scheer da Silva, Alírcia Moares Kleinowski, Andersom Milech Einhardt, Daiane de Pinho Benemann, Cristina Copstein Cuchiara, Daniela De Conti, Ilda Mariclei de Castro da Silva, Isabel Rodrigues Brandão, Letícia Carvalho Benítez, Luis Willian Pacheco Arge.

Gostaria de um agradecimento especial a três colegas e amigas de laboratório que foram muito importantes para a realização deste trabalho: Alírcia, Isabel e Letícia.

Por fim, agradeço a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

RIBEIRO, Márcia Vaz. Elicitores abióticos no estresse oxidativo e na expressão de gene da rota de betacianina em *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. 2011. 56f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas.

As espécies medicinais do gênero *Alternanthera* (Amaranthaceae) como *A. philoxeroides* apresentam uma variedade de compostos bioativos, entre eles as betacianinas, que são pigmentos nitrogenados pertencentes à classe das betalainas. Esses compostos são amplamente utilizados como aditivos de produtos alimentícios e medicamentos devido à sua comprovada ação antioxidante e ausência de toxicidade. Técnicas têm sido desenvolvidas para aprimorar a produtividade e o rendimento deste pigmento, sendo uma delas o uso de elicitores *in vitro* ou agentes estressantes *in vivo*. Ambos apresentam um importante papel no processo de transdução de sinais que regulam os genes de defesa nas plantas, agindo como estimuladores para a produção e ou degradação de diversos metabólitos, tanto primários quanto secundários. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar em plantas de *A. philoxeroides*, as características de crescimento e produção de betacianina em plantas cultivadas *in vitro*; os teores dos pigmentos fotossintéticos, betacianinas, peroxidação lipídica e atividade de enzimas antioxidantes em plantas cultivadas *in vivo*, sob estresse salino, além de, quantificar o teor de betacianina e a expressão do gene *5GT-DBs* envolvido na rota biossintética, deste composto, em plantas *in vitro* submetidas à elicitação por NaCl e pelo aminoácido tirosina. Para isso, foram conduzidos três experimentos. No primeiro, explantes de *A. philoxeroides* foram inoculados em meio MS, com concentrações crescentes de NaCl (0, 50, 100, 150, 200 e 250 mM), durante 35 dias. No segundo, plantas provenientes da cultura *in vitro* foram aclimatizadas em casa de vegetação e irrigadas com solução de cloreto de sódio (0, 200 e 400 mM), por 30 dias. O terceiro experimento contou com dois ensaios, sendo o primeiro composto de plantas de *A. philoxeroides* cultivadas *in vitro*, em meio MS líquido, no substrato vermiculita, durante 35 dias. Após esse período, foi adicionada ao meio, solução de NaCl (400 mM) e coletada a parte aérea das plantas após 0, 12, 24, 36 e 48 horas de exposição ao sal, Já o segundo, segmentos nodais foram inoculados em meio MS, na presença e ausência de tirosina (0 e 75 μ M), tendo sua parte aérea coletada após 35 dias de cultivo. Nas análises de crescimento observou-se redução das médias para as variáveis altura, número de gemas, número de brotos e no número e comprimento de raiz, nas plantas crescidas nos meios contendo cloreto de sódio. As maiores concentrações de betacianinas foram encontradas nos caules de plantas cultivadas em meio MS com 50 mM de NaCl. Após 30 dias de cultivo *in vivo* os teores de clorofilas *a*, clorofila *b*, e carotenóides decresceram à medida que aumentou a concentração de sal, enquanto a razão clorofila *a/b* das plantas submetidas à maior concentração de sal apresentou

diferença em relação ao controle. Foram observados maiores teores de betacianina, nos caules em relação às folhas, nas maiores concentrações de sal. Nas folhas, houve um aumento significativo da peroxidação lipídica e da atividade da superóxido dismutase. Já nas raízes, houve um aumento da atividade das enzimas catalase e ascorbato peroxidase. Na análise da expressão diferencial (qRT-PCR) foi possível observar que a partir das 12h de estresse por sal, ocorreu aumento da expressão do gene da 5-GT até às 24h, seguido por decréscimo e novo aumento em 36 e 48 horas, respectivamente. O gene 5-GT também teve aumento na expressão em resposta a tirosina. Conclui-se que plantas de *A. philoxeroides* elicidadas *in vitro* com cloreto de sódio apresentam uma diminuição nos parâmetros morfológicos avaliados, porém em baixas concentrações há um estímulo da síntese de betacianina. O estresse salino promove maior degradação dos pigmentos fotossintéticos, incremento na síntese de betacianinas no caule e danos às membranas celulares das folhas. O aumento na atividade das enzimas antioxidantes ativou o sistema protetor contra o estresse oxidativo nas plantas de *A. philoxeroides in vivo*. Sugere-se que nesta espécie, a enzima *betanidina 5-O-glucosiltransferase*, tem sua maior expressão nas 48 horas de exposição à elicitação por sal e também quando crescidas em meio contendo tirosina.

Palavras-chave: erva-de-jacaré, enzimas antioxidantes, cloreto de sódio, tirosina, expressão diferencial, *Betanidina 5-O-glucosiltransferase*.

ABSTRACT

RIBEIRO, Márcia Vaz. Abiotic elicitors in oxidative stress and in gene expression of the betacyanin route in *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. 2011. 62f. Thesis (PhD) – Graduation Program in Vegetal Physiology at Federal University of Pelotas.

The medicinal *Alternanthera* (Amaranthaceae) species, such as *A. philoxeroides*, present a great variety of bioactive compounds, among which are the betacyanins, nitrogen pigments that belong to the betalains class. These compounds are widely used as additives for food and drugs, due to their antioxidant action and lack of toxicity, which have already been proven. Techniques have been developed in order to improve productivity and performance of this pigment, one of those is the use of *in vitro* elicitors or *in vivo* stressing agents. Both have an important role in the transduction process of signals that regulate the defense genes in plants, acting as stimulators of production or degradation of several primary and secondary metabolites. This work aimed to assess, in *A. philoxeroides* plants, the growth and production characteristics of betacyanin in *in vitro* plants; the levels of photosynthetic pigments, betacyanins, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in *in vivo* plants under salt stress, and also to quantify the level of betacyanin and the *5GT-DBs* gene expression in the biosynthetic route of this compound in *in vitro* plants submitted to elicitation by NaCl and by tyrosine. For this, three trials were conducted. In the first one, *A. philoxeroides* explants were inoculated in MS medium with increasing NaCl concentrations (0, 50, 100, 150, 200 and 250 mM) for 35 days. In the second one, plants from *in vitro* cultures were acclimatized in greenhouses and irrigated with a sodium chloride solution (0, 200 and 400 mM) for 30 days. The third trial had two essays, one composed of *in vitro* *A. philoxeroides* plants in a liquid MS medium in vermiculite substrate for 35 days. After this period, a NaCl solution (400 mM) was added to the medium and the shoots were collected after 0, 12, 24, 36 and 48 hours of exposure. In the second one, nodal segments were inoculated in MS medium with and without tyrosine (0 e 75 μ M), and its aerial parts were collected after 35 days. In the growth analysis, reduction of the averages was observed for the following variables: height, number of shoots, number of sprouts and root number and length; for the plants that have grown in the sodium chloride medium. The highest concentrations of betacyanins were found in the stalks of plants from MS medium, with 50 mM of NaCl. After 30 days of *in vivo* cultivation, the levels of chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoids decreased as the salt concentration increased, while the reason of chlorophyll *a/b* in plants submitted to a higher salt concentration presented a difference in comparison to the control. Higher levels of betacyanin were observed on stalks, when compared to the leaves, in the highest salt concentrations. On the leaves, there was a significant increase of lipid peroxidation and superoxide dismutase activity. On the roots, there was an increase of enzymes catalase and ascorbate peroxidase. Regarding the analysis of differential expression (*qRT-PCR*), it was possible to observe that from 12 to 24 hours of salt stress, the *5-GT* gene expression firstly increased, then there was a decrease in 36 hours and a new increase in 48 hours. The *5-GT* gene also showed increased expression as a response to tyrosine. It was possible to conclude that *A. philoxeroides* elicited *in vitro* with sodium chloride present a decrease of the assessed morphological parameters, but in low concentrations betacyanin synthesis is stimulated. Salt stress causes greater degradation in the photosynthetic pigments, increment of betacyanin synthesis in stalks and damage to the cell membranes of the leaves. The increase of

antioxidant enzymes activity stimulated the protective system against oxidative stress on *in vivo* *A. philoxeroides* plants. It is suggested that in this species, the enzyme *bethanidine 5-O-glucosyltransferase* reaches its highest expression in 48 hours of exposure to salt elicitation and also when grown in a medium containing tyrosine.

Key-words: alligator weed, antioxidant enzymes, sodium chloride, tyrosine, differential expression, *Bethanidine 5-O-glucosyltransferase*.

SUMÁRIO

1. Introdução geral.....	12
2. Referências bibliográficas	15
Nota Prévia - Crescimento e produção de betacianinas em plantas de <i>Alternanthera philoxeroides</i> (Mart.) Griseb. cultivadas <i>in vitro</i> sob elicitação por sal.....	17
Resumo.....	17
Abstract.....	17
Referências.....	23
Artigo 2 – Alterações bioquímicas em plantas de <i>Alternanthera philoxeroides</i> (Mart.) Griseb. cultivadas sob estresse salino.....	25
Resumo.....	25
Abstract.....	25
Introdução.....	26
Material e métodos.....	27
Material Vegetal e tratamento com sal.....	27
Extração dos pigmentos fotossintéticos.....	28
Extração das betacianinas.....	28
Peroxidação lipídica.....	28
Extração e atividade das enzimas antioxidantes.....	29
Resultados.....	30

	11
Discussão.....	33
Conclusão	37
Referências.....	37
Artigo 3 – Expressão de gene da síntese de betacianinas em plantas de <i>Alternanthera philoxeroides</i> (Mart.) Griseb. sob elicitación por NaCl e	
Tirosina.....	40
Resumo.....	40
Abstract.....	40
Introdução.....	41
Material e métodos.....	43
Material Vegetal.....	43
Tratamento com sal.....	43
Tratamento com tirosina.....	44
Extração e quantificação dos teores de betacianinas.....	44
Construção dos iniciadores.....	44
Extração de RNA total.....	47
Validação dos iniciadores.....	47
qRT-PCR em Tempo Real.....	48
Resultados.....	48
Discussão.....	51
Conclusões.....	53
Referências Bibliográficas	54

1 INTRODUÇÃO GERAL

O uso de espécies vegetais remonta ao início da civilização, onde indivíduos pertencentes a distintas tribos ou povos descobriram que algumas espécies eram adequadas para a alimentação ou possuíam propriedades curativas, hoje então chamadas de plantas medicinais (FRANÇA et al., 2008).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, planta medicinal é qualquer planta que possua em um ou vários de seus órgãos, substâncias usadas com finalidade terapêutica, ou que estas substâncias sejam ponto de partida para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos. Esses compostos naturais, também chamados de metabólitos secundários geralmente ocorrem em baixas concentrações e seu aparecimento na natureza é determinado por necessidades ecológicas e possibilidades biossintéticas (TAIZ; ZEIGER, 2008).

Para sua defesa as plantas sintetizam fitoalexinas ou metabólitos secundários que podem ser estimulados por elicitores, compostos ou tratamentos que induzem em níveis elevados a biossíntese do metabolismo secundário do carbono. Os elicitores podem ser de dois tipos: abióticos, de origem não biológica, tais como metais pesados, luz ultravioleta, íons e componentes inorgânicos; ou bióticos, de origem biológica, como material de parede de fungos, bactérias, vírus ou herbívoros, além de componentes químicos que são liberados no local do ataque do patógeno (ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005).

Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para melhorar a produtividade dos produtos naturais oriundos do metabolismo secundário dos vegetais, incluindo a otimização das condições de cultivo com o uso de elicitores (GEORGEV et al., 2008.), sendo uma dessas técnicas a de cultura de tecidos, através da micropropagação. Esta técnica permite

interferir nas rotas metabólicas mediante o cultivo de plantas em meio preparado com agentes estressantes, elicitores, possibilitando a manipulação da composição fitoquímica dessas plantas de maneira mais simples e confiável, evitando a interferência de fatores externos (WANG et al., 2007; PARK et al., 2008). Além disso, a possibilidade de aumento rápido do número de indivíduos geneticamente idênticos a partir de plantas selecionadas e a produção de mudas o ano todo com elevada qualidade sanitária (DI STASI, 1996; CORRÊA; SIQUEIRA-BATISTA; QUINTAS, 1999; SERAFINI; BARROS, 2001).

Assim, o uso das técnicas que possibilitem a manipulação com utilização de precursores ou elicitores abióticos da via de biossíntese de interesse, proporcionará melhor entendimento sobre como estes compostos são sintetizados e acumulados pelas plantas.

Dos elicitores abióticos, a salinidade é um dos principais fatores que interferem no crescimento e desenvolvimento das plantas (ZHANG et al., 2011), causando efeitos de natureza osmótica, tóxica ou nutricional, afetando processos metabólicos vitais como fotofosforilação, cadeia respiratória, assimilação do nitrogênio e metabolismo das proteínas (MUNNS, 2002). Como resposta aos danos causados pelo excesso de sal, muitas plantas ampliaram os mecanismos de tolerância como, maior proteção do sistema respiratório e fotossintético (MUNNS, 1993), uso eficiente da água (MUNNS; HUSAIN; RIVELLI, 2002), manutenção da parede celular (WINICOV, 1998), alterações de algumas vias bioquímicas e o aumento da expressão de genes (HURKMAN, 1992; JAIN et al., 1993; ZHU, 2000).

Estes genes são divididos em grupos funcionais diferentes, responsáveis pela minimização dos efeitos do excesso de sal, pois codificam proteínas fotossintéticas, proteínas ligadas ao transporte para o vacúolo, à síntese de osmólitos e a ativação de protetores contra as espécies reativas de oxigênio (EROs) (MUNNS, 2005).

As betalaínas são uma classe de compostos nitrogenados, localizadas nos vacúolos das plantas, que apresentam propriedades antioxidantes e de detoxificação das EROs (ESCRIBANO et al., 1998; SUGANYADEVI et al., 2010) e que podem funcionar como osmólitos na defesa de processos fisiológicos contra estresses abióticos (WANG et al., 2006). A via biossintética destes pigmentos tem origem no aminoácido tirosina que por ação de enzimas como tirosinases, dioxigenases e glucosiltransferases, dão origem às betacianinas (TANAKA; SASAKI; OHMIYA, 2008). Esta classe de pigmentos, entre as plantas, é restrita a 13 famílias da ordem Caryophyllales (VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009), sendo a família Amaranthaceae, através da espécie *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb., um excelente modelo biológico para o uso de técnicas que permitam a quantificação da expressão dos genes, da rota de biossíntese das betalaínas. Esta espécie é uma planta medicinal, originária da América do Sul, conhecida como erva-de-jacaré, herbácea e perene considerada em muitas regiões do mundo como uma vigorosa invasora pela sua capacidade de adaptação a diferentes ecossistemas, tanto aquáticos, semiaquáticos, terrestres e até mesmo extremamente secos, como dunas (GAO et al., 2008).

O presente trabalho está dividido em três artigos: o primeiro investiga a influência da elicitação por sal no crescimento de plantas e na produção de betacianinas em *A. philoxeroides*; o segundo avalia os teores dos pigmentos fotossintéticos, betacianinas, peroxidação lipídica e atividade de enzimas antioxidantes em *A. philoxeroides*, cultivada sob estresse salino e o terceiro avalia o teor de betacianina, bem como, o perfil de expressão dos genes envolvidos na rota biossintética deste composto, em plantas de *A. philoxeroides*, submetidas à elicitação por NaCl e por tirosina.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAKHVERDIEV, S. I.; SAKAMOTO, A.; NISHIYAMA, Y.; INABA, M. & MURATA, N. Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. **Plant Physiology**, v. 123, p. 1047–1056, 2000.

CORRÊA, A.D.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; QUINTAS, L.E. **Plantas medicinais – do cultivo à terapêutica**. Petrópolis, RJ: Ed. Vozes, 1999. 246p.

Di STASI, L.C. **Plantas Medicinais: Arte e ciência. Um guia de estudos interdisciplinar**. São Paulo, SP: ED. UNESP, 1996. 230p.

ESCRIBANO J.; PEDREÑO, M.A.; GARCÍA-CARMONA, F.; MUÑOZ, R. Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots. **Phytochemical Analysis**, v. 9, p. 124-127, 1998.

FRANÇA, I. S. X.; SOUZA, J. A.; BAPTISTA, R. S.; BRITTO, V. R. S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, p. 201-208, 2008.

GAO, J.; XIAO, Q.; YIN, L.; HE, G. Isolation of cDNA clones for genes up-regulated in drought-treated *Alternanthera philoxeroides* root. **Journal Molecular Biology Reports**, v. 35, p. 485-488, 2008.

GEORGIEV, V.; MLADENKA. I.; BLEY, T.; PAVLOV, A. Betalain production in plant in vitro systems. **Acta physiologic plant**, v. 30, p. 581-593, 2008.

HURKMAN, W.J. Effect of salt stress on plant gene expression: a review. **Plant and Soil**, v.146, p.145-151, 1992.

JAIN, S.; NAINAWATEE, H.S.; JAIN, R.K.; CHOWDHURY, J.B. Salt tolerance in *Brassica juncea* L> II: salt-stress induced changes in polypeptide pattern of *in vitro* selected NaCl tolerance plants. **Euphytica**, v.65, p.107-112, 1993.

MUNNS, R. Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. **Plant, Cell and Environment**, v. 16, p. 15–24, 1993.

MUNNS, R.; HUSAIN, S.; RIVELLI, A.R. et al. Avenues for increasing salt tolerance of crops, and role of physiologically based selection traits. **Plant and Soil**, v. 47, p. 93-105, 2002.

MUNNS, R. Genes and salt tolerance: bringing them together. **New Phytologist**, v.167, p.645-663, 2005.

PARK, U, S.; UDDIN, M. R.; XU, H.; KIM, Y.K.; LEE, S.Y. Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant. **African Journal of Biotechnology**. v. 7, p. 4959-4965, 2008.

SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M. de. **Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria**. Guaíba, RS: ED. Agropecuária, 2001. 463p.

SUGANYADEVI, P.; SARAVANAKUMAR, M.; ARAVINTHAN, K.M.; ARUNKUMAR, A.; KAVITHA-KRISHNA, R.; KARTHIKEYANI,S. Extraction of Betacyanin from Red Beet (*Beta vulgaris* L.) and to evaluate tis antioxidant potential. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, p. 2693-2696, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Trad. SANTARÉM, E. R. et al. 4. ed. UFV, 220 p. 2009.

TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. **The Plant Journal**, v. 54, p. 733–749, 2008.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e nutrição**, v. 20, p. 157-166, 2009.

WANG, C.Q.; ZHAO, J.Q.; CHEN, M.; WANG, B.S. Identification of Betacyanin and Effects of Environmental Factors on Its Accumulation in Halophyte *Suaeda salsa*. **Journal of Plant Physiology and Molecular Biology**, v.32, p.195-201, 2006.

WANG, C. Q.; SONG, H.; GONG, X.Z.; HU, Q.G.; LIU, F.; WANG, B.S. Correlation of tyrosinase actity and betacyanin biosynthesis induced by dark in C3 halophyte *Suaeda salsa* seedlings. **Plant Science**, v. 173, p. 487-494, 2007.

WINICOV, I. New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants. **Annals of Botany**, 82: 703–710, 1998.

ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology**, v. 23, p. 283–333, 2005.

ZHU, J.K. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 124, p. 941-957, 2000.

NOTA PRÉVIA 1: REVISTA BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS

Crescimento e produção de betacianinas em plantas de *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. cultivadas *in vitro* sob elicitação por sal

RESUMO: O objetivo do trabalho foi avaliar as características morfológicas de plantas de *Alternanthera philoxeroides* cultivadas *in vitro*, sob diferentes concentrações de NaCl, e analisar a influência deste elicitor na produção de betacianina. Explantes de *A. philoxeroides* foram inoculados em meio MS com concentrações crescentes de NaCl (0, 50, 100, 150, 200 e 250 mM) e, após 35 dias, foram avaliadas as características morfológicas e a quantificação de betacianina, através de espectrofotômetro. A maior altura foi obtida nas plantas cultivadas em meio livre de NaCl (4,32 cm), decrescendo conforme o aumento da concentração, chegando a 0,20 cm. Esse comportamento também foi observado para número de gemas, ocorrendo uma redução de 82% na maior concentração utilizada em relação ao controle. Concentrações inferiores a 250 mM não apresentaram diferença entre si para o número de brotos. Em relação ao sistema radicular, tanto para número, como para comprimento da raiz, as maiores médias foram obtidas em plantas cultivadas em meio sem adição de NaCl. As maiores concentrações de betacianina foram encontradas nos caules de plantas cultivadas em meio MS com 50 mM de NaCl. Conclui-se que plantas de *A. philoxeroides* elicidadas com cloreto de sódio apresentam uma diminuição nos parâmetros morfológicos avaliados, porém em baixas concentrações há um estímulo da síntese de betacianina.

Palavras-chave: plantas medicinais, betalainas, erva-de-jacaré.

ABSTRACT: **Betacyanin growth and production in *in vitro* *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. plants under salt elicitation.** This work aimed to assess the morphological characteristics of *in vitro* *Alternanthera philoxeroides* under different NaCl concentrations and to analyze the influence of this elicitor on betacyanin production. *A. philoxeroides* explants were inoculated in MS medium with increasing NaCl concentrations (0, 50, 100, 150, 200 and 250 mM) and after 35 days morphological characteristics and betacyanin quantification were assessed using spectrophotometer. The greatest height was obtained in plants in a NaCl-free medium (4,32 cm), decreasing according to the concentration increase, reaching 0,20 cm. This behavior was also observed regarding the number of shoots, with a reduction of 82% in the highest concentration used, when compared to the control. Concentrations of less than 250 mM did not present a difference among themselves regarding the number of sprouts. As for the root system, both the number and length of roots, the highest averages were obtained in plants in a medium without NaCl. The highest betacyanin concentrations were found in stalks of plants cultivated in a MS medium with 50 mM of NaCl. It was concluded that the *A. philoxeroides* plants which are elicited with sodium chloride present a decrease of the assessed morphological parameters, but in low concentrations there is a stimulation of betacyanin synthesis.

Key-words: medicinal plants, betalains, alligator weed.

A espécie *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. é popularmente conhecida como erva-de-jacaré, sendo utilizada como antiinflamatória e diurética (Rattanathongkom et al., 2009). Ela é encontrada em formações pioneiras do tipo restinga, geralmente em terrenos arenosos recentes, com algum teor salino (Blum, 2008), podendo ser considerada uma planta potencialmente tolerante a salinidade (Gao et al., 2008).

Em sua constituição química foram encontrados flavonoides glicosilados, saponinas e betalaínas conferindo-lhe ação antitumoral e antiviral contra HSV-1, HSV-2, citomegalovírus, vírus do sarampo, vírus MUMPS e HIV (Human- Immunodeficiency-virus) (Si-Man et al., 1988; Blundem et al., 1999; Fang et al., 2007; Fang et al. 2009; Rattanathongkom et al., 2009).

As betalaínas são pigmentos naturais, N-heterocíclicos, solúveis em água, que aparentemente substituem as antocianinas nas famílias da ordem Caryophyllales (Volp et al., 2009), e podem ser divididas em dois grupos estruturais: as betacianinas (vermelho ao vermelho violeta) e as betaxantinas (amarelo). A importância bioativa destes pigmentos é estudada por diversos autores tendo sido comprovados os efeitos antivirais e antimicrobianos dos pigmentos betalaínas (Strack et al., 2003).

As técnicas de cultura *in vitro* proporcionam uma série de vantagens para o estudo de plantas medicinais, pois possibilitam a manipulação da composição fitoquímica dessas plantas, como as do gênero *Alternanthera* de maneira mais simples, confiável e previsível, evitando a interferência de fatores externos (Park et al., 2008). Aliado a isso pode ser empregado o uso de elicitores abióticos com o intuito de aumentar a biossíntese do metabólito de interesse (Korsangruang et al., 2010).

Este trabalho objetivou avaliar as características morfológicas de plantas de *A. philoxeroides* cultivadas *in vitro*, sob diferentes concentrações de NaCl, e analisar a influência deste elicitor na produção de betacianina.

Segmentos nodais de plantas pré-aclimatizadas *in vitro*, foram inoculados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de concentrações crescentes de NaCl (0; 50; 100; 150; 200 e 250 mM), permanecendo, por 35 dias, em sala de crescimento, com 16 horas de fotoperíodo e $48 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de densidade de fluxo de fótons. .

Após esse período foram avaliados os parâmetros de crescimento: altura, número de gemas, brotos, raiz, comprimento da maior raiz, massa fresca da parte aérea e concentração de betacianina, em folhas e caules. Para esta última análise, o material vegetal foi macerado em 5 mL de água destilada e centrifugado a 13.632g a 4°C por 15 minutos. A quantificação de betacianina seguiu a metodologia de Cai et al. (1998), sendo a leitura realizada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 536 e 650 nm e a concentração obtida expressa em mg de Amarantina por 100g de massa fresca.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto de seis tratamentos e quatro repetições, sendo cada uma representada por um frasco contendo cinco explantes. A análise de betacianina foi realizada em esquema fatorial 6x2, sendo seis tipos de meio e dois órgãos diferentes. Os dados foram submetidos à análise da variância, regressão polinomial e as médias comparadas pelo Teste de Tukey (5%), com auxílio do software WinStat (Machado & Conceição, 2002).

A adição de NaCl ao meio de cultura afetou de forma negativa os seguintes parâmetros de crescimento, altura, número de gemas, número de brotos, número e comprimento da raiz.

O aumento da concentração de NaCl implicou na redução da altura das plantas de *A. philoxeroides* (Figura 1a), podendo ser devido a diversos fatores, tais como: o efeito tóxico dos íons que foram absorvidos; o baixo potencial osmótico e hídrico das células em relação ao meio de cultura testado; bem como a utilização de energia metabólica no processo de ajustamento osmótico. Resultados semelhantes foram encontrados em espécies como *Morinda citrifolia* e *M. pubescens* (Nivas et al., 2011), *Solanum*

lycopersicum (Romero-Aranda et al., 2001) e em outras espécies de dunas como *Spartina ciliata*, *Blutaparon portulacoides*, *Cakile maritima* (Cordazzo et al., 2003). A semelhança de tais resultados mostra que o menor crescimento nos vegetais é uma resposta geralmente causada pela presença de sal no meio. Sob alta salinidade, a expansão celular pode ser reduzida pelo acúmulo de sais na parede celular, que pode diminuir o turgor e, conseqüentemente, o crescimento (Cordeiro, 2001).

A variável número de gemas foi afetada com o aumento da concentração de NaCl no meio de cultura, sendo tal efeito mais evidente nas concentrações mais elevadas do sal (Figura 1b). Dentre os prejuízos causados pelo estresse salino, estão o retardo ou a inibição no aparecimento das gemas e atrofiamento das mesmas, sendo, portanto, um efeito comum aos vegetais expostos ao sal (Muscolo et al., 2003).

A concentração de 250 mM de NaCl promoveu uma diminuição de 38% na formação de novos brotos em relação às plantas crescidas em meio MS sem adição de cloreto de sódio (Figura 1c). Concentrações inferiores a esta não diferiram entre si, concordando com resultados obtidos por Pérez-Tornero et al. (2009) e Sotiropoulos & Dimassi (2004), que relataram que baixas concentrações não apresentam efeito negativo sobre essa variável, pois *in vitro* não ocorre diferença de osmolaridade.

Plantas cultivadas em meio MS, livre de NaCl, apresentaram as maiores médias para número de raiz (13,35), sendo as concentrações crescentes de sal prejudiciais para este órgão, chegando a uma diminuição de quase 80% na maior concentração testada (Figura 1d).

Até a concentração de 100 mM de NaCl não ocorreram modificações no comprimento da raiz em relação ao controle (1,85 cm), porém a partir de 150 mM a diminuição foi gradativa, chegando a 0,19 cm na concentração de 250 mM (Figura 1e).

Fernandes et al. (2003), no estudo sobre diferentes concentrações de salinidade no crescimento de *Bactris gasipaes*, verificaram que o sistema radicular foi a parte da planta

mais afetada pela salinidade, diferentemente do que ocorre na maioria das espécies, em que a parte aérea é a mais sensível ao estresse salino do que a raiz.

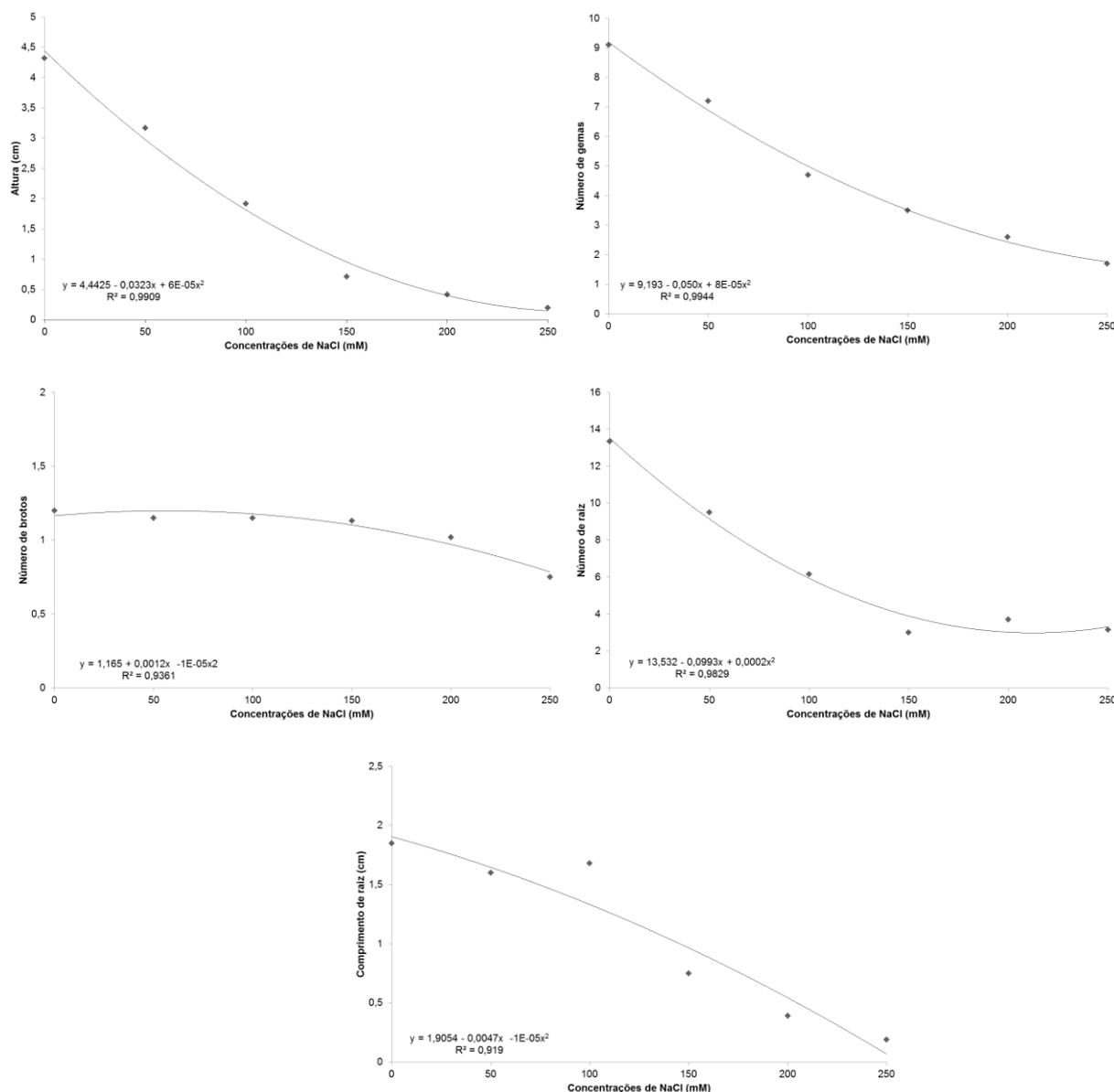


FIGURA 1. Altura (a), número de gemas (b), número de brotos (c), número de raiz (d) e comprimento de raiz (e) de plantas de *Alternanthera philoxeroides* cultivadas *in vitro*, por 35 dias, em meio MS, com diferentes concentrações de NaCl.

Em relação à quantificação de betacianina ocorreu diferença estatística tanto em relação aos órgãos, como para os meios testados, sendo as maiores concentrações de betacianina encontradas nos caules de plantas cultivadas em meio MS com 50 mM de

NaCl. Conforme observado na figura 2, não foi obtido massa de folhas suficientes para a realização da análise, nas concentrações acima de 150 mM, pois não houve formação de gemas.

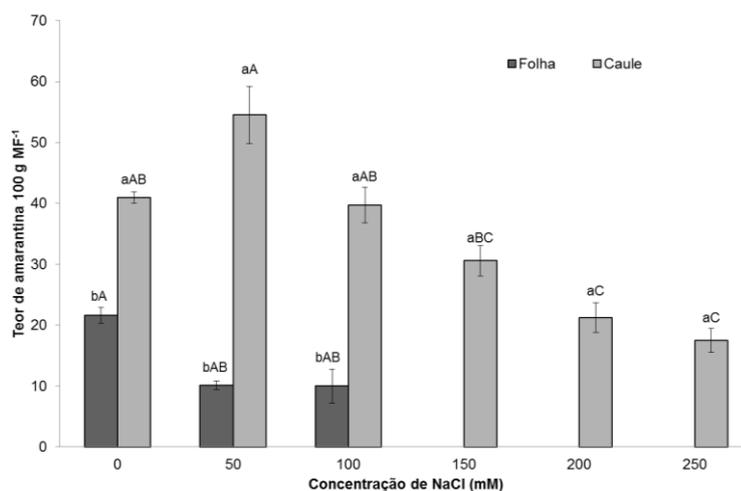


FIGURA 2. Quantificação de betacianina em folhas e caules de plantas de *Alternanthera philoxeroides* cultivadas *in vitro* em meio MS com diferentes concentrações de NaCl, por 35 dias. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, sendo que, letras minúsculas comparam os diferentes órgãos dentro de cada concentração e letras maiúsculas comparam órgãos iguais nas diferentes concentrações. As barras representam o erro padrão.

A salinidade induz o acúmulo de aminoácidos como a fenilalanina e a tirosina, sendo essa precursora da biossíntese das betalaínas, além disso, é comum em plantas elicitadas que a via do metabolismo secundário originados desses aminoácidos aumente (Zhang et al., 2011), proporcionando um acúmulo de compostos nitrogenados, como as betacianinas (Khan et al., 2000; Mansour, 2000).

A elicitação por NaCl de *A. philoxeroides*, cultivadas *in vitro*, interfere negativamente sobre os parâmetros morfológicos, embora baixas concentrações deste elicitor estimulem a síntese de betacianina.

REFERÊNCIAS

- BLUM, C.T. Lista Preliminar de Espécies Vegetais da Formação Pioneira de Influência Marinha (Restinga) no Paraná - versão 2008. FLORAPARANÁ, Sociedade Chauá. Disponível em www.chaua.org.br/restinga, acessado em 01/09/ 2011.
- BLUNDEN, G. et al. Betaine distribution in the Amaranthaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.27, p.87-92, 1999.
- CAI, Y. et al. Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.2063-2070, 1998.
- CORDAZZO, C.V.; SEELINGER, U. Reproduction and vegetative regeneration in *Blutaparon portulacoides* (Amaranthaceae) on backshores of southern Brazil. **Journal of Coastal Research**, v.35, p.481-485, 2003.
- CORDEIRO, G.G. **Salinidade em agricultura irrigada (conceitos básicos e práticos)**. Petrolina, PE: Embrapa Semi-árido, 2001. 38p.
- FANG, J.B. et al. Antitumor constituents from *Alternanthera philoxeroides*. **Journal of Asian natural products research**, v.9, p.511-515, 2007.
- FANG, J.B. et al. Cytotoxic triterpene saponins from *Alternanthera philoxeroides*. **Journal of Asian natural products research**, v.11, p.261-266, 2009.
- FERNANDES, A.R. et al. Crescimento de mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes* H.B.K.) sob diferentes níveis de salinidade. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, p.278-284, 2003.
- GAO, J. et al. Isolation of cDNA clones for genes up-regulated in drought-treated *Alternanthera philoxeroides* root. **Journal Molecular Biology Reports**, v.35, p.485-488, 2008.
- KHAN, M.A. et al. Experimental assessment of salinity tolerance of *Ceriops tagal* seedlings and saplings from the Indus delta, Pakistan. **Aquatic Botany**, v.70 p.259–268, 2001
- KORSANGRUANG, S. et al. Effects of abiotic and biotic elicitors on growth and isoflavonoid accumulation in *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.103, p.333–342, 2010.
- MACHADO, A., CONCEIÇÃO, A.R. **Programa estatístico WinStat – Sistema de Análise Estatístico para Windows**, versão 2.0. Pelotas, RS, 2002.
- MANSOUR, M.M.F. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. **Biologia Plantarum**, v.43, p.491–500, 2000.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- MUSCOLO, A. et al. Effects of salinity on growth, carbohydrate metabolism and nutritive properties of kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum* Hoscht). **Plant Science**, v.164, p.1.103 - 1.110, 2003.
- NIVAS, D. et al. Physiological responses of two *Morinda* species under saline conditions. **American Journal of plant Physiology**, v.3, p.157-166, 2011.
- PARK, U.S. et al. Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant. **African Journal of Biotechnology**, v.7 p.4959-4965, 2008.

- PÉREZ-TORNERO, O. et al. Physiological and growth changes in micropropagated *Citrus macrophylla* explants due to salinity. **Journal of Plant Physiology**, v.166, p.1923-1933, 2009.
- RATTANATHONGKOM, A. et al. Evaluation of saponin IV isolated from *Alternanthera philoxeroides* for its potency against viral replication. **Planta Medica**, v.75, p.829-835, 2009.
- ROMERO-ARANDA, R. et al. Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. **Plant Science**, v.160, p.265 – 272, 2001.
- SI-MAN, Z. et al. Inhibitor against the human immunodeficiency virus in aqueous extracts of *Alternanthera philoxeroides*. **Chinese Medicinal Journal**, v.101, p.816-866, 1988.
- SOTIROPOULOS, T., DIMASSI, K.N. Response to increases in rates of boron and NaCl on shoot proliferation and chemical composition of in vitro kiwi fruit shoot cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 9, p. 285–289, 2004.
- STRACK, D. et al. Recent advances in betalain research. **Phytochemistry**, v.62, p.247–269, 2003.
- VOLP, A.C.P. et al. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição**, v.20, p.157-166, 2009.
- ZHANG, H.C. et al. Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the over-expression of chalcone isomerase gene with the elicitation treatment. **Plant Cell Reports**, v.28, p.1205–1213, 2009.

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS EM PLANTAS DE *Alternanthera philoxeroides* (MART.) GRISEB. CULTIVADAS SOB ESTRESSE SALINO

Resumo: A salinidade é considerada fator limitante ao crescimento e desenvolvimento por afetar vários processos fisiológicos das plantas. Objetivou-se nesse experimento avaliar os teores dos pigmentos fotossintéticos, betacianinas, peroxidação lipídica e atividade de enzimas antioxidantes em *Alternanthera philoxeroides*, cultivada sob estresse salino. Plantas provenientes da cultura *in vitro* foram aclimatizadas e irrigadas com cloreto de sódio (0, 200 e 400 mM), por 30 dias. Os teores de clorofilas *a*, clorofila *b*, e carotenoides totais mostraram respostas semelhantes, decrescendo seus valores com o aumento da concentração de sal, enquanto a razão clorofila *a/b* das plantas submetidas à maior concentração de sal apresentou aumento significativo em relação ao controle. Foram observados maiores teores de betacianina, nos caules em relação às folhas, nas maiores concentrações de sal. Nas folhas, houve um aumento significativo da peroxidação lipídica e da atividade da superóxido dismutase. Já nas raízes, houve um aumento da atividade das enzimas catalase e ascorbato peroxidase. Desta forma, percebeu-se que o estresse salino promoveu maior degradação dos pigmentos fotossintéticos, incremento na síntese de betacianinas no caule e danos às membranas celulares das folhas, porém o aumento na atividade das enzimas antioxidantes ativou o sistema protetor contra o estresse oxidativo nas plantas de *Alternanthera philoxeroides*.

Palavras-chave: erva-de-jacaré, cloreto de sódio, estresse abiótico, pigmentos fotossintetizantes, enzimas antioxidantes.

BIOCHEMICAL ALTERATIONS IN *Alternanthera philoxeroides* (MART.) GRISEB. PLANTS UNDER SALT STRESS

Abstract: Salinity is considered as a limiting factor for growth and development, since it affects several physiological processes in plants. This trial aimed to assess the levels of photosynthetic pigments, betacyanins, lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in *Alternanthera philoxeroides* under salt stress. Plants originated from an *in vitro* culture were acclimatized and irrigated with sodium chloride (0, 200 and 400 mM) for 30 days. The levels of chlorophylls *a*, chlorophylls *b* and total carotenoids presented similar responses, decreasing their values according to salt concentrations, while the reason chlorophyll *a/b* of the plants that were submitted to the highest salt concentration presented a significant increase when compared to the control. Higher levels of betacyanin were observed on stalks, when compared to the leaves, in the highest salt concentrations. On the leaves, there was a significant increase of lipid peroxidation and superoxide dismutase activity. On the roots, there was an increase of enzymes catalase and ascorbate peroxidase. Salt stress caused greater degradation in the photosynthetic pigments, increment of betacyanin synthesis in stalks and damage to the cell membranes of the leaves, however, the increase of antioxidant enzymes activity stimulated the protective system against oxidative stress on *in vivo* *A. philoxeroides* plants.

Key-words: alligator weed, sodium chloride, abiotic stress, photosynthetic pigments, antioxidant enzymes.

INTRODUÇÃO

A salinidade é um dos mais importantes fatores de estresse abiótico limitando o crescimento e a produtividade, pois afeta quase todos os processos fisiológicos e bioquímicos das plantas, reduzindo seu rendimento (Flowers 2004). Altas concentrações de sal promovem um déficit hídrico, causando desequilíbrio iônico celular e, devido à toxicidade destes íons, causam ainda um estresse osmótico (Mandhania et al. 2006, Khan e Panda 2008).

Efeitos específicos do estresse salino sobre o metabolismo das plantas têm sido relacionados ao acúmulo de íons tóxicos como Na^+ e Cl^- (Khan e Panda 2008) e a depleção de íons como o K^+ e o Ca^{2+} (Sreenivasulu et al. 2000, Racagni et al. 2003, Mandhania et al. 2006, Sumithra et al. 2006, Khan e Panda 2008). A consequência primária do estresse salino é o desequilíbrio iônico e estresse hiperosmótico celular e a secundária é o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Panda e Khan 2009), como radicais superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$).

As plantas, para protegerem suas membranas celulares e organelas dos efeitos danosos desses radicais, ativam um sistema de defesa antioxidante formado por enzimas como a Superóxido Dismutase (SOD-EC 1.15.1.1.), a Catalase (CAT-EC 1.11.1.6) e a Ascorbato Peroxidase (APX-EC 1.11.1.1) que reduzem de forma eficiente as EROs sob circunstâncias normais, mas, se a redução completa não ocorrer em condições de produção aumentada, o resultado pode ser um estado de estresse levando à oxidação de biomoléculas, tais como lipídios, proteínas e DNA. Estes eventos podem desencadear inativação dos componentes celulares acelerando o processo de morte celular (Buckner et al. 2000). Neste sentido, o sistema de defesa antioxidativo tem papel fundamental na aquisição de tolerância pelas plantas.

Outros parâmetros que podem ser utilizados como indicativo de estresse nas plantas, como no caso de cultivo em elevadas concentrações salinas, são os pigmentos foliares, como clorofilas e carotenóides. Dependendo da espécie em estudo, cultivar, tempo de exposição e concentração de sal na solução, esse tipo de estresse, pode afetar a absorção de nutrientes constituintes da

molécula de clorofila, a formação de outros pigmentos fotossintéticos e, conseqüentemente, o processo de fotossíntese (Santos 2004).

Neste trabalho a espécie *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb., espécie pertencente à família Amaranthaceae e conhecida popularmente como breo-d'água ou erva-de-jacaré (*alligator weed*). Os extratos desta planta apresentam flavonoides, saponinas e betalaínas, sendo este último de grande importância como aditivo para produtos alimentícios e fármacos, por ser um eficiente corante natural atóxico (Azeredo 2009, Volp et al. 2009). Além disso, sabe-se que as betalaínas desempenham papéis importantes na fisiologia do estresse, agindo como detoxificadoras de EROs, oriundos de estresses bióticos, como observado em *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* por Sepúlveda-Jiménez et al. (2004) e estresses abióticos por radiação UV em plantas de *Mesembryanthemum crystallinum* (Vog et al. 1999)

Nativa da América do Sul esta espécie é preferencialmente encontrada em formações pioneiras do tipo restinga, geralmente em terrenos arenosos recentes (Blum 2008), sendo classificada como uma espécie perene que se desenvolve abundantemente em diferentes ecossistemas, desde ambientes aquáticos até mesmo extremamente secos, como dunas (Gao et al. 2007).

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo investigar o efeito da salinidade sobre os teores de clorofilas, carotenoides totais, betacianinas, peroxidação lipídica e a atividade de enzimas antioxidantes em plantas de *A. philoxeroides* para obter informações sobre quais mecanismos bioquímicos esta espécie apresenta que permitam seu crescimento e desenvolvimento em ambientes com diferentes concentrações salinas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal e tratamento com sal

Plantas de *A. philoxeroides* provenientes do cultivo *in vitro* foram levadas para casa de vegetação e aclimatizadas em bandejas de poliestireno expandido, contendo areia lavada como substrato, mantidas por 10 dias em câmara úmida com microaspersão. Após 10 dias, as plantas foram retiradas da câmara úmida, transferidas para vasos plásticos (capacidade de 2L), contendo o mesmo substrato, e mantidas em casa de vegetação. Durante este período foram aplicadas 100

mL de solução nutritiva de Hoagland completa (Hoagland e Arnon 1938), a cada dois dias. Decorridos 10 dias a solução nutritiva foi suspensa e iniciada a aplicação de 100 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl), por vaso, nas concentrações: zero, 200 e 400 mM, aplicadas em intervalos de quatro dias consecutivos, intercalados com água. Após 30 dias de indução dos tratamentos, foram coletadas folhas, caules e raízes, para posterior análise.

Extração dos pigmentos fotossintéticos

Para análise dos pigmentos fotossintetizantes, foram coletados aproximadamente 200 mg de folhas que foram maceradas, até homogeneização completa, em acetona 80%. A extração das clorofilas *a* (chl*a*), *b* (chl*b*), totais (chl*t*) e carotenoides foi realizada de acordo com a metodologia de Lichtenthaler (1987), com algumas modificações. Os teores de chl*a*, chl*b*, chl*t* e carotenoides totais foram expressos em µg de massa fresca. A partir dos valores obtidos para clorofilas, calculou-se a razão clorofila *a/b*.

Extração das betacianinas

Para a quantificação de betacianinas, foram utilizados aproximadamente 200 mg de folhas e caule, macerados em 5 mL de água destilada seguido de centrifugação a 13.632 g, a 4°C por 25 minutos, segundo metodologia descrita por Cai et al. (1998). A concentração de betacianinas foi expressa em mg de amarantina por 100 g de massa fresca.

Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Buege e Aust (1978). Aproximadamente 200 mg de tecido foliar e radicular foram macerados em N₂ líquido acrescido de 20% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e homogeneizado em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 10 minutos e uma alíquota de 250 µL do sobrenadante foi adicionado a 1 mL do meio de reação composta de 0,5% (p/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (p/v) de TCA, incubando-se, em seguida, em banho-maria a 95 °C, por 30 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e as leituras foram determinadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm. A peroxidação lipídica foi expressa em nmol de Malonaldeído (MDA) por grama de massa fresca.

Extração e atividade das enzimas antioxidantes

As atividades das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Ascorbato Peroxidase (APX) foram determinadas após 30 dias de exposição das plantas aos tratamentos. Aproximadamente 400 mg de tecido fresco de folhas de *A. philoxeroides*, formadas após a aplicação do sal foram macerados em N₂ líquido acrescido de 20% de PVPP e homogeneizados em 1,5 mL de tampão de extração contendo fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 10 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g por 10 min a 4°C e o sobrenadante coletado para determinar a atividade das enzimas. A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (Giannopolitis e Ries 1977) em um meio de reação composto por fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 μM, NBT 75 μM e riboflavina 2 μM. Os tubos com o meio de reação e a amostra (30 μL), totalizando 2 mL de volume final, foram iluminados por sete minutos em uma caixa adaptada com lâmpada fluorescente de 20 W. Foram utilizados como controles tubos com meio de reação sem amostra, iluminado, e um tubo contendo meio de reação sem amostra, no escuro, para zerar o espectrofotômetro. As leituras foram realizadas a 560 nm, onde uma unidade da SOD foi considerada a quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições de ensaio. A atividade da CAT foi determinada conforme descrito por Azevedo et al. (1998) com algumas modificações, onde a atividade foi monitorada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm, durante 2 minutos em meio de reação contendo 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0) e 12,5 mM de H₂O₂ e 50 μL de extrato, totalizando 4 mL de volume final, incubado a 28°C. A atividade da APX foi realizada segundo Nakano e Asada (1981), monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm. O tampão de incubação foi composto por fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 0,5 mM e H₂O₂ 0,1 mM (volume do extrato 50 μL, totalizando 4 mL de volume final).

Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x2, sendo três concentrações de NaCl e dois órgãos em estudo. Para betacianinas foram utilizados caule e folha e para as enzimas, raiz e folha. As análises dos pigmentos foram realizadas em folhas retiradas de cada tratamento (concentração de NaCl). Foram realizadas três repetições, sendo

considerada a unidade experimental quatro plantas por vaso. Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Pigmentos fotossintetizantes

Houve diferença significativa para as variáveis chl a , chl b e chl total entre o tratamento controle e as concentrações de NaCl (Tabela 1). A submissão das plantas ao estresse salino reduziu significativamente os teores de clorofilas, porém, entre os tratamentos salinos (200 e 400 mM de NaCl), não houve diferença. Esta resposta indica que o incremento na concentração de NaCl, parece estar fortemente relacionada à menor capacidade de síntese ou maior degradação de clorofilas a , clorofila b e clorofila total.

Embora os teores de chl a e chl b tenham apresentado a mesma tendência, com redução na presença de NaCl, numericamente para a chl a , a redução entre o tratamento controle e 400 mM de sal, foi inferior a observada em chl b , aproximadamente 24% e 42%, respectivamente. Este comportamento refletiu em maior razão de chl a/b no tratamento com 400 mM de NaCl que diferiu significativamente do controle. O estresse salino também afetou negativamente o teor de carotenoides que apresentaram redução significativa para o tratamento com 400 mM de NaCl em relação ao controle.

Tabela 1 Teores de clorofila a , b , total, razão de clorofila a/b e carotenoides totais em plantas de *Alternanthera philoxeroides*, submetidas a diferentes concentrações de NaCl, por 30 dias

NaCl (mM)	Chl a -----	Chl b ($\mu\text{g mg}^{-1}$ MF)	Chl total -----	Chl a/b	Carotenoides ($\mu\text{g mg}^{-1}$ MF)
0	0,921a *	0,341a	1,262a	2,700 b	0,251a
200	0,754 b	0,239 b	0,977 b	3,155 ab	0,201 ab
400	0,700 b	0,199 b	0,836 b	3,517a	0,180 b

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Betacianinas

Em relação às betacianinas houve interação significativa entre órgão e concentração de NaCl (Fig. 1). Isto significa que seu teor foi significativamente superior no caule em relação à folha, em todas as concentrações de NaCl observadas, sendo que na concentração de 400 mM de NaCl houve um aumento, no caule, de 80% no seu teor em relação ao controle. Desta forma, estes resultados indicam que o caule é o órgão preferencial de síntese deste pigmento, uma vez que nas folhas seus teores foram baixos e não diferiram entre os tratamentos.

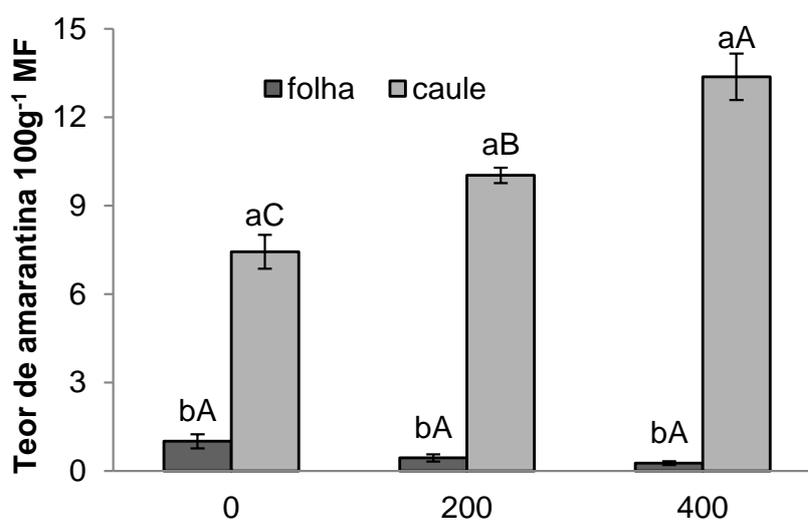


Fig. 1 Teor de betacianina em plantas de *Alternanthera philoxeroides*, submetidas a diferentes concentrações de NaCl, por 30 dias. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, sendo que, letras minúsculas comparam os diferentes órgãos dentro de cada concentração e letras maiúsculas comparam órgãos iguais nas diferentes concentrações.

Peroxidação Lipídica

Os danos causados pela salinidade às membranas celulares, devido à peroxidação lipídica, ficaram bastante evidentes neste experimento. Para esta variável-resposta houve interação significativa entre os fatores órgão e concentração de NaCl. Os resultados mostraram que o nível de MDA, em relação ao controle, teve um aumento de 51,17% nas folhas na concentração de 400 mM de NaCl e nas raízes os valores de peroxidação não apresentaram diferença significativa, indicando seu maior efeito que a peroxidação foi bastante evidente nas folhas (Fig. 2).

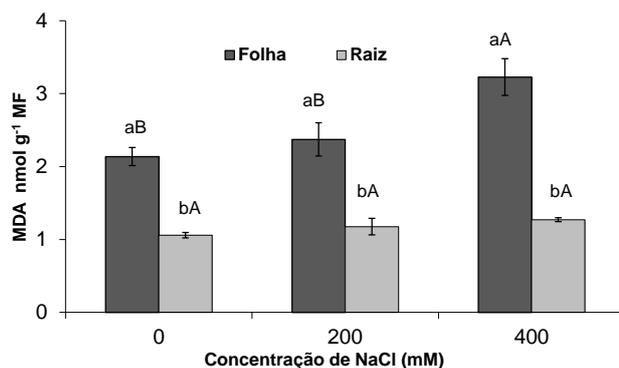


Fig. 2 Peroxidação lipídica em plantas de *Alternanthera philoxeroides*, submetidas a diferentes concentrações de NaCl, por 30 dias. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, sendo que, letras minúsculas comparam os diferentes órgãos dentro de cada concentração e letras maiúsculas comparam órgãos iguais nas diferentes concentrações.

Enzimas antioxidantes

A SOD, primeira enzima a atuar no sistema de defesa antioxidante, realizando a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), apresentou interação significativa entre órgãos e as concentrações salinas testadas, apresentando um aumento, em relação ao controle, de 89,41% da atividade nas folhas e 18,31% nas raízes na concentração de 400 mM de NaCl (Fig. 3A). Cabe ressaltar que nas raízes a atividade da enzima, de maneira geral, foi superior a observada nas folhas, porém na maior concentração de NaCl testada, suas atividades não apresentaram diferença significativa entre os tecidos, justificado pelo aumento na atividade da SOD nas folhas pelo efeito do estresse salino.

A CAT apresentou um aumento em sua atividade de 12,82% nas folhas para a concentração de 200 mM de NaCl, seguido de queda em 400 mM de NaCl, porém essa variação não apresentou diferença significativa entre as concentrações testadas. Já nas raízes houve um aumento de 28,57% na concentração de 200 mM e de 75% na de 400 mM de NaCl, sendo significativamente superior em relação ao controle (Fig. 3B).

Para a APX, foi observado ligeiro aumento em sua atividade nas folhas, embora não sendo significativo entre os tratamentos. Por outro lado, no sistema radicular, esta mesma enzima

apresentou aumento significativo, com 43,9 % superior na concentração de 400 mM de sal em relação ao tratamento controle (Fig. 3C).

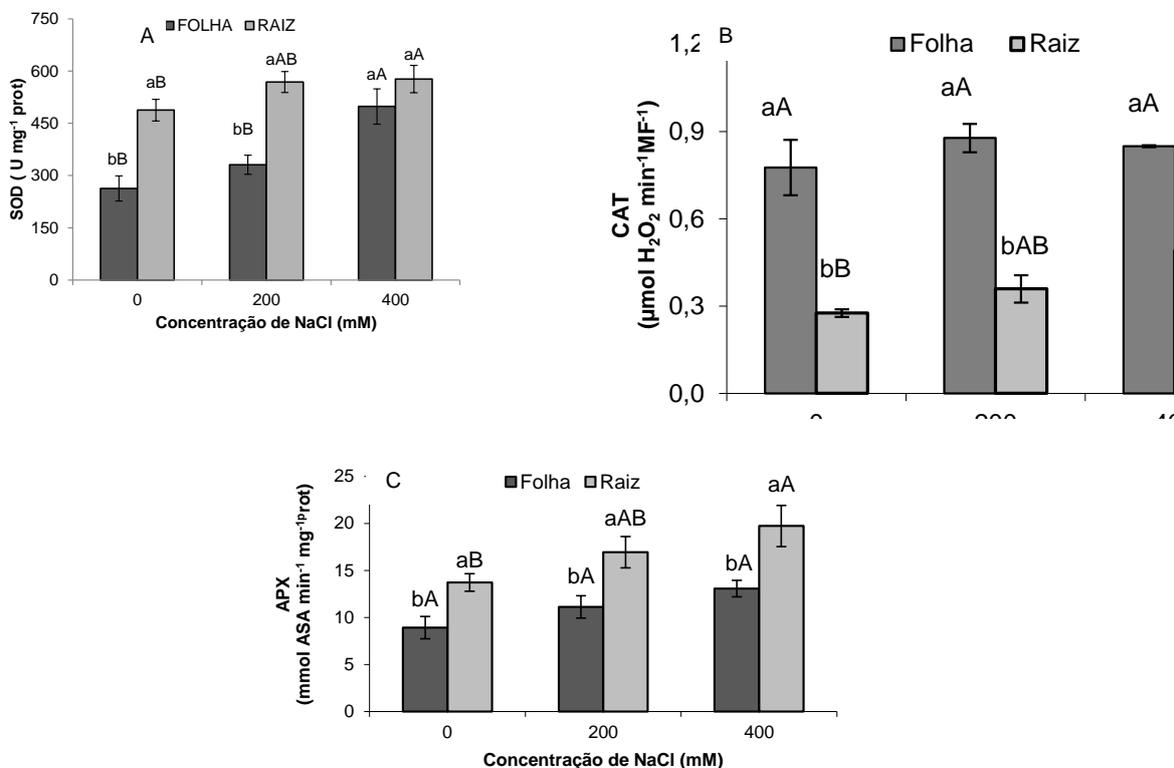


Fig. 3 Atividade das enzimas SOD (A), CAT (B) e APX (C) em plantas de *Alternanthera philoxeroides*, submetidas a diferentes concentrações de NaCl, por 30 dias. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, sendo que, letras minúsculas comparam os diferentes órgãos dentro de cada concentração e letras maiúsculas comparam órgãos iguais nas diferentes concentrações.

DISCUSSÃO

O crescimento e a adaptação da planta a diferentes ambientes relacionam-se à sua eficiência reprodutiva, que está associada, entre outros fatores, aos teores de clorofila foliar. Os teores de clorofila nas folhas são utilizados para estimar o potencial fotossintético das plantas, pela sua ligação direta com a absorção e transferência de energia luminosa e ao crescimento e à adaptação a diversos ambientes (Almeida et al. 2004). Em plantas, estresse oxidativo e sinais de senescência incluem perda de clorofilas, as quais conduzem a uma redução progressiva na capacidade fotossintética (Thompson et al. 1987).

Sob estresse salino a diminuição do conteúdo de Chla e Chlb pode ser explicado devido a uma diminuição de síntese ou maior degradação destas (Sinha et al. 2006), pois durante o

processo de degradação da clorofila, a Chl b é convertido em Chl a (Fang et al. 1998) e isso pode explicar o aumento da relação Chl a /Chl b , observada neste experimento. Santos (2004) observou que plantas de *Helianthus annuus* L. apresentaram inibição da síntese de ácido 5-aminolevulinato (ALA), molécula precursora da clorofila, quando expostas a estresse por sal. Além disso, mostrou também que a enzima clorofilase é estimulada a sintetizar clorofila nos primeiros dias de exposição ao estresse (estresse moderado), entretanto, tal atividade é fortemente inibida por alta concentração salina. Também, o estresse salino leva a um aumento dos radicais livres nos cloroplastos e conseqüentemente a destruição de moléculas de Chl, resultando na redução da fotossíntese e do crescimento. Átomos de Oxigênio singlete e radicais superóxidos apresentam a capacidade que romper as ligações duplas de ácidos graxos insaturados e de Chl, prejudicando, assim, o sistema de membranas do cloroplasto e centros de reação da fotossíntese (Zhang et al. 2003), podendo resultar na liberação de Chl a partir dos tilacoides. Nesta situação, as Chl devem ser degradadas o mais rapidamente possível para evitar o dano celular devido a sua ação fotodinâmica (Takamiya et al. 2000). Falhas na degradação dessas Chl podem aumentar a quantidade de EROs a ponto do sistema antioxidante não ser capaz de fazer essa detoxificação, necessitando assim a ativação de outros sistemas antioxidantes (Dolatabadian et al. 2008).

Os carotenoides são pigmentos relacionados à proteção celular contra danos fotooxidativos, em que se destaca o ciclo das xantofilas (violaxantina, anteraxantina e zeaxantina) (García-Plazaola e Becerril 1999, Mittler 2002). No presente trabalho o decréscimo no conteúdo de carotenoides totais, concorda com trabalho realizado com mamona *Ricinus communis* L., por Pinheiro et al. (2006), em que também observaram um decréscimo no teor de carotenoides totais quando estas foram submetidas ao estresse por NaCl.

Considerando que com o aumento da concentração de sal houve um decréscimo na síntese de clorofila a e b nas plantas e uma diminuição nos níveis de carotenoides totais, pode-se sugerir que essas plantas apresentam menor capacidade de absorção e transferência de energia luminosa bem como uma menor capacidade de dissipação térmica (sob a forma de calor) via ciclo das xantofilas. Essa perda da capacidade de dissipação térmica, associada a um acúmulo de ATP e NADPH no estroma, pode resultar na reação direta dos elétrons advindos da fase fotoquímica

da fotossíntese com o oxigênio molecular, resultando na reversão de um de seus *spins*, tornando-o altamente reativo (oxigênio singlete) (Pinheiro et al. 2006).

As betacianinas são pigmentos nitrogenados, de coloração vermelho-violeta e juntamente com as betaxantinas pertencem à classe das betalainas (Volp et al. 2009). O aumento da síntese deste pigmento, observado no presente trabalho, está de acordo com os resultados obtidos por Wang et al. (2008a) com *Suaeda salsa*, pertencente à família Chenopodiaceae, que observaram aumento no conteúdo de betacianina quando as plantas foram submetidas ao estresse salino. Este mesmo autor ainda sugere que as betacianinas podem funcionar como osmólitos na defesa de processos fisiológicos contra estresses abióticos através da modulação do pool de aminoácidos.

A peroxidação lipídica é mensurada como quantidade de MDA que é produzida quando os ácidos graxos polinsaturados da membrana sofrem peroxidação pelo acúmulo de EROs. Estresse salino produz perda de íons, provocando injúrias que comprometem a integridade da membrana a qual será afetada pelas EROs formadas durante a fotossíntese ou a respiração (Savoure et al. 1999). Como a peroxidação lipídica está diretamente ligada ao estresse oxidativo, esta pode ser considerada como indicativo de estresse aumentado (Hernandez et al. 2000).

Os resultados mostram que há um maior aumento no teor de MDA nas folhas do que nas raízes, indicando uma maior taxa de peroxidação lipídica devido ao estresse salino, nas folhas. Há trabalhos que relatam que o estresse salino aumenta o conteúdo de H₂O₂ e por consequência peroxidação lipídica por interromper a permeabilidade da membrana ou induzir estresse oxidativo em tecidos vegetais (Dolatabadian et al. 2008, Panda e Khan 2009). Outro fator que deve ser levado em consideração foi o aumento da atividade da SOD que produz H₂O₂, causando danos às células, uma vez que a CAT e a APX não acompanharam na mesma intensidade esse aumento em atividade.

O excesso de sal no solo aumenta consideravelmente a produção de EROs nas plantas, que para proteger suas membranas celulares e organelas dos efeitos danosos desses radicais ativam um sistema de defesa antioxidante (Deuner et al. 2011). Estresses abióticos, como estresse salino, causam danos moleculares para células vegetais, direta ou indiretamente através da formação das EROs. No presente estudo, as plantas expostas a solução

salina mostraram um aumento significativo na atividade da SOD nas folhas e CAT e a APX nas raízes.

O aumento da atividade da SOD nas folhas pode ser justificado pelo fato desta enzima ser a primeira a atuar no sistema antioxidante, realizando a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Sinha e Saxena 2006). Wang et al (2008b) também relataram um aumento da atividade da SOD em plantas de *Iris lactea* Pall. var. *chinensis* irrigadas com solução salina. Por outro lado, em canola (*Brassica napus* L.), Dolatabadian et al. (2008), observaram um aumento da atividade desta enzima no sistema radicular. O H_2O_2 também é tóxico para a célula e sua produção ocorre nos tecidos das plantas por uma variedade de fatores de estresse, devendo ser rapidamente detoxificado (Deuner et al. 2011). Este processo é feito pela catalase (CAT) e Ascorbato peroxidase (APX).

O aumento significativo da atividade da enzima CAT nas raízes com o aumento da salinidade é justificado, pois esta é a enzima chave envolvida na remoção de peróxidos tóxicos nas células. Já a APX, outra importante enzima do sistema de defesa antioxidante tem sua atividade aumentada no sistema radicular, justificando ser este órgão o primeiro a ser sensibilizado pelo estresse. A CAT e a APX pertencem a duas diferentes classes de enzimas de limpeza devido as suas diferentes afinidades pelo H_2O_2 , com a APX na ordem μM e a CAT em mM. Assim, enquanto a APX seria responsável pela modulação refinada das EROs para a sinalização, a CAT seria responsável pela remoção do excesso de EROs gerado durante o estresse (Mittler 2002). Estes resultados mostram que provavelmente não ocorreu aumento da fotorrespiração, pois a atividade da CAT não alterou nas folhas e como houve uma redução nos teores de clorofila, as plantas podem ter dissipado sua energia na forma de calor ou fluorescência ou ainda os elétrons podem ter sido incorporados no O_2 , transformando-o em radical superóxido, justificando o aumento da SOD e conseqüentemente da APX.

CONCLUSÕES

O estresse salino promove reduções nos teores de clorofilas totais, clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides totais e incremento na síntese das betacianinas no caule, indicando que sob estresse as plantas parecem necessitar de rotas alternativas de dissipação de energia a fim de evitar problemas de fotoinibição e fotoxidação. A salinidade promove aumento da peroxidação

lipídica, da atividade da SOD nas folhas e da CAT e APX no sistema radicular de plantas de *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb., indicando que esta espécie possui mecanismos que permitem o seu crescimento e desenvolvimento em ambientes que apresentem salinidade no solo.

REFERÊNCIAS

Almeida, L. P. de, A. A. de Alvarenga, E. M. de Castro, S. M. Zanela, and C. V. Vieira, 2004: Crescimento inicial de plantas de *Cryptocaria aschersoniana* Mez. submetidas a níveis de radiação solar. Ciên. Rural 34, 83- 88.

Azeredo, H. M. C, 2009: Betalains: properties, sources, applications and stability – a review. International J. Food Sci. Tec. 44, 2365-2376.

Azevedo, R.A., R.M. Alas, R.J. Smith, and P.J. Lea, 1998: Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. Physiol. Plant, 104, 280–292.

Blum, C. T. Lista Preliminar de Espécies Vegetais da Formação Pioneira de Influência Marinha (Restinga) no Paraná - versão 2008: FLORAPARANÁ, Sociedade Chauá. Disponível em www.chaua.org.br/restinga, acessado em 26/07/2010.

Buckner, B., G. S. Johal, and D. Janick-Buckner, 2000: Cell death in maize. Physiol. Plant 108, 231-239.

Buege, J. A., and S. D. AUST, 1978: Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzym. 52, 302-310.

Cai, Y., M. Sun, H. Wu, R. Huang, and H. Corke, 1998: Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. J. Agric. Food Chem. 46, 2063-2070.

Deuner, S., J. D., Alves, I. Zanandrea, P. F. P. Goulart, N. M., Silveira, P. C. Henrique and A. C. Mesquita, 2011: Stomatal behavior and components of the antioxidative system in coffee plants under water stress. Sci. Agric. 68, 77-85.

Dolatabadian A., S. A. M. M. Sanavy, and N. A. Chashmi, 2008: The Effects of Foliar Application of Ascorbic Acid (Vitamin C) on Antioxidant Enzymes Activities, Lipid Peroxidation and Proline Accumulation of Canola (*Brassica napus* L.) under Conditions of Salt Stress J. Agron. Crop Sci. 194, 206–213.

Engel, V.L. and F. Poggiani, 1991: Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. Rev. Bras. Fisiol. Veg. 3, 39-45.

Fang, Z., J. Bouwkamp, and T. Solomos, 1998: Chlorophyllase activities and chlorophyll degradation during leaf senescence in non-yellowing mutant and wild type of *Phaseolus vulgaris* L. J. Exp. Bot. 49, 503–510.

Flowers, T. J., 2004: Improving crop salt tolerance. J. Exp. Bot. 55, 307–319.

Giannopolitis, C. N., and S. K. Ries, 1977: Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. Plant Physiol. 59, 309–314.

Gao, J., X. Quang, L. Yin, and G. HE, 2007: Isolation of cDNA clones for genes up-regulated in drought-treated *Alternanthera philoxeroides* root. Mol. Biol. Rep. 35, 485-488.

- García-Plazaola, J. I., and J. M. Becerril, 1999: A rapid HPLC method to measure lipophilic antioxidants in stressed plants: simultaneous determination of carotenoids and tocopherols. *Phytochem. Anal.* 10, 307-313.
- Hernandez, J. A., J. Jimenez, P. Mullineaux, and F. Sevilla, 2000: Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long term stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Environ.* 23, 853–862.
- Hoagland, D. R., and D. I. Arnon, 1938: *The water-culture method for growing plants without soil.* California Agricult. Experimen. Station Circ. n.347.
- Khan, M. H., and S. K. Panda, 2008: Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. *Acta Physiol. Plant* 30, 81–89.
- Lichtenthaler, H.K., 1987: Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Packer, L.; Douce, R. Eds. *Methods in Enzymology* 148, 350-381.
- Mandhania, S., S. Madan, and V. Sawhney, 2006: Antioxidant defense mechanism under salt stress in wheat seedlings. *Biol. Plant* 227, 227–231.
- Mittler, R., 2002: Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant. Sci.* 9, 405-410.
- Nakano, Y., and K. Asada, 1981: Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22, 867-880.
- Panda, S. K., and M. H. Khan, 2009: Growth, Oxidative Damage and Antioxidant Responses in Greengram (*Vigna radiate* L.) under Short-term Salinity Stress and its Recovery. *J. Agron. Crop Sci.* 195, 442-454.
- Pinheiro, H. A., J. V. Silva, L. Endres, V. M. Ferreira, C. A. Câmara, F. F. Cabral, J. F. Oliveira, L. W. T. Carvalho, F. K. P. Fonseca, and J. M. Santos, 2006: Alterações na fotossíntese e nos teores de pigmentos cloroplásticos em plântulas de mamona cultivadas sob condições de salinidade. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congressso2006/agricultura/AlteracoesFotossintese.pdf>>, acessado em 01/06/2010.
- Racagni, H., H. Pedranzani, S. Alemano, E. Taleisnik, G. Abdala, and E. Machado-Domenech, 2003: Effect of short-term salinity on lipid metabolism and ion accumulation in tomato roots. *Biol. Plant* 47, 373–377.
- Santos, C.V., 2004: Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Sci. Hort.* 103, 93–99.
- Savoure, A., D. Thorin, M. Davey, X. J. Hua, S. Mauro, M. Van Motagu, D. Inze, and N. Verbruggen, 1999: NaCl and CuZnSO₄ treatments trigger distinct oxidative defence mechanism in *Nicotiana plumbaginifolia* L. *Plant Cell Physiol.* 22, 387–396.
- Sepúlveda-Jiménez G., P. Rueda-Benítez, H. Porta, M. Rocha-Sosa, 2004: Betacyanin synthesis in red beet (*Beta vulgaris*) leaves induced by wounding and bacterial infiltration is preceded by an oxidative burst. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 64: 125-133.
- Sreenivasulu, N., B. Grimm, U. Wobus, and W. Weschke, 2000: Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). *Physiol. Plant* 109, 435–442.

- Sinha, S. and Saxena, R., 2006: Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and nonenzymatic antioxidants and bacoside-A content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 62, 1340-1350.
- Sumithra, K., P. P. Jutur, B. D. Carmel, and A. R. Reddy, 2006: Salinity-induced changes in two cultivars of *Vigna radiata*: responses of antioxidative and proline metabolism. *Plant Growth Regul.* 50, 11–22.
- Takamiya, K., I. T. Tsuchiya, and H. Ohta, 2000: Degradation pathway(s) of chlorophyll: what has gene cloning revealed? *Trends Plant. Sci.* 5, 426-431.
- Thompson, J.E., R.L. Ledge, and R.F. Barber, 1987: The role of free radicals in senescence and wounding, *New Phytologist*, 105, 317–344.
- Vogt T., M. Ibdah, J. Schmidt, V. Wray, M. Nimtz, and D. Strak, 1999: Light-induced betacyanin and flavonol accumulation in bladder cells of *Mesembryanthemum crystallinum*. *Phytochem.* 52: 583-592.
- Volp, A. C., I. R. T. Renhe, and P. C. Stringueta, 2009: Pigmentos naturais Bioativos. *Alim. Nutr.* 20, 157-166.
- Wang, C. Q., C. Xu, J. Wei, H. Wang, and S. Wang, 2008a: Enhanced Tonoplast H⁺-ATPase Activity and Superoxide Dismutase Activity in the Halophyte *Suaeda salsa* Containing High Level of Betacyanin. *J Plant Growth Regul.* 27, 58-67.
- Wang, Y., J. X. Guo, Q. L. Meng and X. Y. Cui, 2008b: Physiological Responses of Krishum (*Iris lactea* Pall. var. *chinensis* Koidz) to Neutral and Alkaline Salts. *J. Agron. Crop Sci.* 194, 429-437.
- Zang, S., J. Pan, T. Tu, S. Yao, and C. Xu, 2003: Study on the photogeneration of superoxide radicals in Photosystem II with EPR spin trapping techniques. *Photosyn. Res.* 75, 41-48.

ARTIGO 3: REVISTA BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS

EXPRESSÃO DE GENE DA SÍNTESE DE BETACIANINA EM *Alternanthera philoxeroides* (MART.) GRISEB. SOB ELICITAÇÃO POR NaCl E TIROSINA

Resumo: Neste trabalho, o modelo proposto, para o estudo da rota de síntese das betacianinas em plantas foi a espécie medicinal *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb (Amaranthaceae), pois seus extratos apresentam estes compostos, que são amplamente utilizados como corantes naturais de alimentos e cosméticos, devido à sua alta capacidade antioxidativa. Os elicitores, quando adicionados ao meio de cultivo podem promover alterações no metabolismo secundário, estimulando a expressão de genes de síntese das betacianinas. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o teor de betacianina, bem como, o perfil de expressão dos genes envolvidos na rota biossintética deste composto, em plantas de *A. philoxeroides*, submetidas à elicitação por NaCl e pelo aminoácido tirosina. Para o experimento da salinidade, plantas de *A. philoxeroides* foram cultivadas *in vitro*, em meio MS líquido, no substrato vermiculita, durante 35 dias. Após esse período, foi adicionado ao meio uma solução de NaCl (400 mM) e coletada a parte aérea das plantas, após 0, 12, 24, 36 e 48 horas de exposição. Para o experimento da tirosina, segmentos nodais foram inoculados em meio MS, na presença e ausência de tirosina (0 e 75 μ M) tendo sua parte aérea coletada, após 35 dias de cultivo. Foi realizada, além da extração das betacianinas, a quantificação da expressão diferencial através da reação em cadeia de polimerase em tempo real (qRT-PCR), utilizando como controle endógeno o gene de *Actina*. Na análise qRT-PCR foi possível observar que a partir das 12h de estresse por sal, houve aumento da expressão do gene da *5GT* até as 24h seguido por decréscimo e novo aumento em 36 e 48 horas, respectivamente. O gene *5GT* também aumentou sua expressão em resposta à tirosina. Dessa forma, sugere-se que em plantas de *A. philoxeroides*, a enzima *Betanidina 5-O-glucosiltransferase*, pertencente à rota de biossíntese das betacianinas tem sua maior expressão em 48 horas de exposição à elicitação por sal e também quando crescidas em meio contendo tirosina.

Palavras-chave: Betalaínas, salinidade, Betanidina 5-O-glucosiltransferase, tirosina qRT-PCR.

Abstract: Expression of betacyanin synthesis gene in *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. under NaCl and tyrosine elicitation. In this work, the model proposed for studying the synthesis route of betacyanins in plants was the medicinal species *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb (Amaranthaceae), since its extracts present these compounds, which are widely used as natural colorants for food and cosmetics, due to its high antioxidant capacity. The elicitors, when added to the cultivation medium, can promote alterations in the secondary metabolism, stimulating the production of betacyanin synthesis genes. The aim of this study was to assess the betacyanin level as well as the expression profile of the genes involved in the biosynthetic route of this compound in *A. philoxeroides* plants submitted to NaCl and aminoacid tyrosine elicitation. For the salinity trial, *A. philoxeroides* were grown *in vitro* in a liquid MS medium in vermiculite substrate, for 35 days. After this period, a NaCl solution (40 mM) was added to the medium and the

aerial part of the plants was collected after 0, 12, 24, 36 and 48 hours of exposure. For the tyrosine trial, nodal segments were inoculated in MS medium with and without tyrosine (0 e 75 μ M), having their aerial parts collected after 35 days. Besides the extraction of betacyanins, there was a quantification of the differential expression through the real time chain reaction of polymerase (*qRT-PCR*), using as endogenous control the *actina* gene. In the *qRT-PCR* analysis it was possible to observe, from 12 to 24 hours of salt stress, an increase of the *5GT* gene, followed by a decrease at 36 hours and another increase at 48 hours. The *5GT* gene also increased its expression as a response to tyrosine. It is suggested that in *A. philoxeroides* plants, enzyme *bethanidine 5-O-glucosyltransferase* has its highest expression in 48 hours of exposure to salt elicitation and also when grown in a medium containing tyrosine.

Key-words: betalains, salintiy, *bethanidine 5-O-glucosyltransferase*, *qRT-PCR*, tyrosine.

INTRODUÇÃO

Os pigmentos das plantas podem ser classificados em quatro grandes grupos: antocianinas, betalaínas, carotenoides e clorofilas, sendo as betalaínas compostos nitrogenados N-heterocíclicos, solúveis em água, localizados nos vacúolos das plantas (Hanet al., 2009). Podem ser divididos em dois grupos estruturais: betaxantinas (amarelo) e betacianinas (vermelho-violeta) sendo que estas últimas ainda podem ser classificadas quimicamente em quatro tipos: betanina, amarantina, gonferina e bougainvilina (Volp et al., 2009).

Nos últimos anos, a rota biossintética das betalaínas vem sendo cada vez mais estudada e algumas enzimas envolvidas nesta rota foram caracterizadas (Strack et al., 2003; Grotewold, 2006; Moreno et al., 2008). As tirosinases são uma classe de enzimas que apresentam cobre em sua estrutura e pertencem ao grupo das polifenol oxidases (PPO). A presença de transcritos de *PPO* correlacionando com acúmulo de betacianinas foi descrita pela primeira vez por Joy et al. (1995) em frutos de *Phytolaca americana*, fornecendo assim, um dos primeiros indícios de envolvimento da enzima tirosinase na biossíntese das betalaínas. Já Gandia-Herrero et al. (2004) extraíram e purificaram a enzima tirosinase em beterraba (*Beta vulgaris* L), comprovando sua atividade. Essa enzima é responsável por catalisar a reação da tirosina para a formação de um

intermediário, a 4,5 dihidroxifenilalanina (DOPA) que por sua vez, sofre oxidação transformando-se em *ciclodihidroxifenilalanina* (cDOPA).

As DOPA dioxigenases foram isoladas e identificadas do fungo *Amanita muscaria* (Girod & Zryd, 1991) e posteriormente identificadas em plantas superiores, *Portulaca grandiflora* (Christinet et al., 2004). Esta enzima, 4,5-DOPA, catalisa a ruptura das ligações 4 e 5 do anel aromático da DOPA produzindo um composto instável (4,5-seco-DOPA) que por reações ainda não muito bem identificadas é convertido a ácido betalâmico (Strack et al., 2003).

As glucosiltransferases envolvidas na biossíntese das betalaínas podem ser classificadas em dois grupos de acordo com seu substrato. O primeiro grupo é composto somente pela enzima *cycloDOPA 5-glucosiltransferase* (Han et al., 2009), que foi primeiramente identificada em plantas de *Mirabilis jalapa* por Sasaki et al. (2004), enquanto que o segundo grupo, das betanidinas glucosiltransferases, purificadas e caracterizadas a partir de suspensão celular de culturas de *Dorotheanthus belliformes* por Vogt et al. (1997), é composto por duas enzimas: a *betanidina 5-O-glucosiltransferase* (5GT-DBs) e a *betanidina 6-O-glucosiltransferase* (6GT-DBs), responsáveis pela glicosilação da betanidina com glicose ou ácido glicorônico, para que possa ser transportado e armazenado nos vacúolos. Ambas as enzimas são bastante diferentes, apesar de terem sido isoladas da mesma planta e utilizarem substratos similares. Elas apresentam apenas 19% da sequência de aminoácidos idênticos, o que sugere mecanismos distintos de transferência de glicosilados para a betanidina (Hans et al., 2004).

Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para aumentar a biossíntese dos produtos naturais oriundos do metabolismo secundário, sendo uma delas o uso de elicitores, que são compostos ou tratamentos que podem induzir, nas plantas, mudanças fisiológicas, que resultam em aumento significativo na produção destes compostos (Georgiev et al.,

2008). Segundo estes autores o uso de precursores como aminoácidos, estimulam a via biossintética de seu composto final.

A quantificação da expressão dos genes da rota de biossíntese das betalaínas poderá ser um indicativo do quanto à célula está sinalizando para suas rotas bioquímicas produzir estas enzimas (Han et al., 2009). Diversas metodologias foram desenvolvidas visando quantificar a concentração relativa dos transcritos dos genes em células e tecidos (Hanet al., 2010). No presente trabalho o modelo proposto para o estudo da rota de biossíntese das betalaínas foi a espécie *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. (Amaranthaceae), por ser uma planta que apresenta alto conteúdo de betacianinas.

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o teor de betacianina, bem como, o perfil de expressão dos genes envolvidos na rota biossintética deste composto, em plantas de *A. philoxeroides*, submetidas à elicitação por NaCl e pelo aminoácido tirosina.

Material e Métodos

Material Vegetal

Plantas de *A. philoxeroides* (erva-de-jacaré), provenientes do município de Rio Grande, no Rio Grande do Sul, tiveram sua identificação taxonômica confirmada por meio da chave de identificação para Amaranthaceae e catalogada no Herbário Pel sob o número 24.535.

Tratamento com sal

Plantas de *A. philoxeroides* foram cultivadas *in vitro* na vermiculita, em meio MS líquido (Murashige & Skoog, 1962), onde permaneceram em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de $48 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, por 35 dias. Decorrido este período, foram adicionados ao meio, 25 mL de uma solução de NaCl (400mM). Para a extração de RNA total e síntese de

cDNA foram coletados tecidos da parte aérea (caule e folha) nos tempos de 0, 12, 24, 36 e 48 horas de exposição ao sal.

Tratamento com tirosina

Plantas de *A. philoxeroides*, estabelecidas *in vitro*, em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), foram utilizadas como doadoras de explantes, sendo cada explante um segmento nodal de aproximadamente 1 cm de comprimento, com duas gemas. Os explantes foram submetidos a dois tratamentos 0 e 75 μM de tirosina, a qual foi solubilizada em DMSO, filtrada e adicionada ao meio MS básico, após autoclavagem, por 20 minutos a uma temperatura de 121° C a pressão de 1,05 kg cm⁻². Após inoculação dos explantes nos meios de cultura, os frascos foram colocados em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 48 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com temperatura de 25±2°C por 35 dias. Após este período foi coletada a parte aérea das plantas, nos dois tratamentos (presença e ausência de tirosina), para a extração de RNA total e síntese de cDNA.

Extração e quantificação dos teores de betacianinas

A extração das betacianinas foi realizada conforme metodologia descrita por Cai et al. (1998), com algumas modificações, onde a parte aérea foi macerada em 5 mL de água destilada e após, centrifugada a 15.790 rpm, a 4°C por 25 minutos. A quantificação de betacianinas foi realizada através da leitura da absorbância, nos comprimentos de onda de 536 e 650 nm, em espectrofotômetro Ultrospec 2100 Pro da Amersham Biosciences®, sendo os resultados expressos em mg amarantina 100g⁻¹ MF.

Construção dos iniciadores

Inicialmente foi identificada a rota metabólica da produção de betalainas, com o auxílio do banco de dados *KEGG PATHWAY Database* (http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?map00965) (Figura 1) e a partir deste mapa metabólico foram selecionadas cinco enzimas: Betanidina 6-O-glucosiltransferase (6-GT), Tirosina

descarboxilase (*TYRDC*), Betanidina 5-O-glucosiltransferase (*5-GT*), *cycloDOPA* 5-O-glucosiltransferase (*cDOPA5GT*), Tirosina descarboxilase (*TYRDC*).

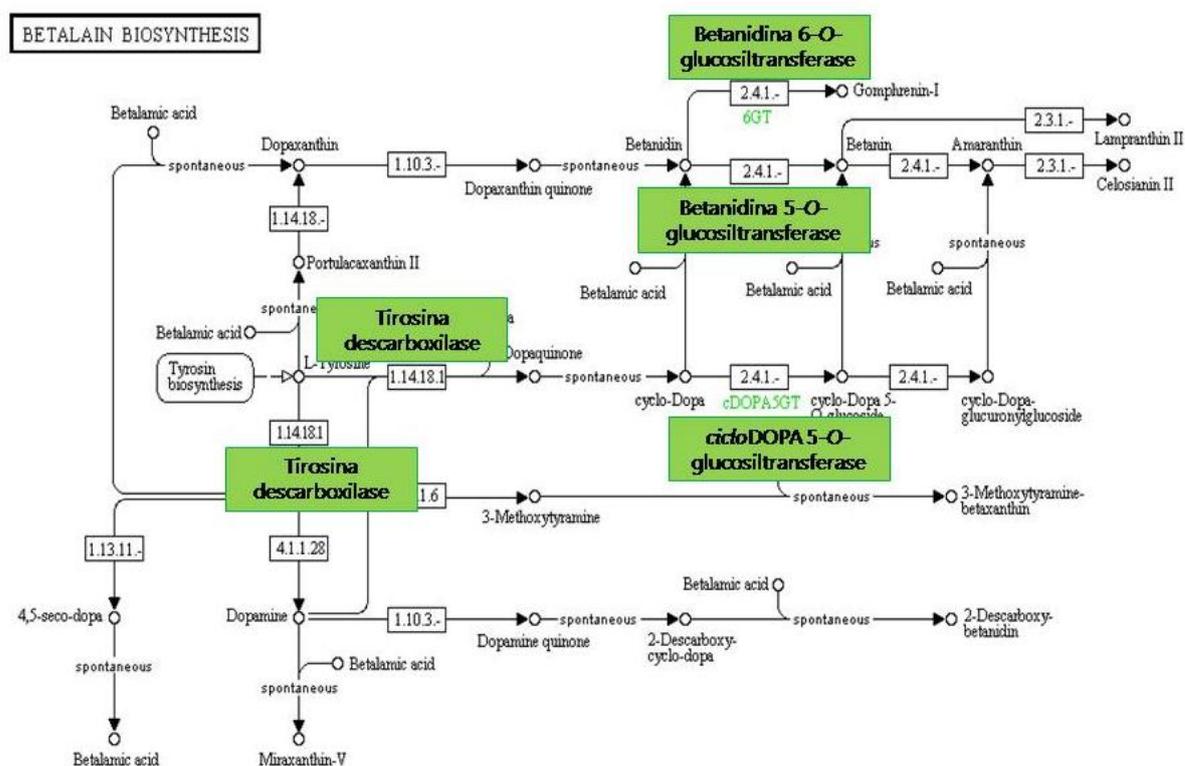


Figura 1. Rota de biossíntese das betalaínas. Caixas em verde indicam as enzimas utilizadas na construção dos iniciadores para análise de expressão gênica por *qRT-PCR*, em plantas de *Alternanthera philoxeroides* submetidas a diferentes tempos de exposição ao sal e a presença de tirosina. Fonte: http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?map00965.

Tabela 1. Sequência dos *iniciadores* utilizados para análise de expressão gênica por qRT-PCR, em plantas de *Alternanthera philoxeroides* submetidas a diferentes tempos de exposição ao sal e a presença de tirosina

Enzima	E.C (Enzyme Commission Numbers)	Número de acesso (NCBI)	Sequência dos iniciadores 5'-3'	Espécie
Betanidina 6-O-glucosiltransferase	2.4.1	gij219566993	PF(1): TGGTCCCTACGTGCCCCAG PR(1): CATCGCTTGGCATTCCGAA PF(11): GCCAACGGCCTAGATCGAGC PR(11): GCGACGTAGGGACCACAGGA	<i>Phytolacca americana</i> L.
Tirosina descarboxilase	4.1.1.28	gij18491208	PF(2): CGCAATAGGAGCGCCATTG PR(2): TTCCACGCCCTCCTTAACGTG PF(22): TTGCGCAATAGGAGCGCC PR(22): CACGCCCTCCTTAACGTGCTTC	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.
Betanidina 5-O-glucosiltransferase	2.1.4	gij5918022	PF(3): ACTGTGGGTGGAACCTCGGC PR(3): CCATTGGCACACCAGCAGAG PF(33): CTCTGCTGGTGTGCCAATGG PR(33): GGAATTGCTCGGCAAAAGTAG	<i>Dorotheanthus bellidiformis</i> (Burm.f) N.E.Br.
<i>cyclo</i> DOPA 5-O-glucosiltransferase	2.1.4	gij62086402	PF(4): GCCGATCATAGGGTGGCCG PR(4): ATCTTCAATTATACGCTTGCTCCG PF(44): GCGGTGGAGTTGACAAGGG PR(44): TCACCCCATCTTTCTTCACTTCTC	<i>Celosia cristata</i> L.
Tirosina descarboxilase	1.14.18.1	gij145334160	PF(5): TGACGGCGATGAAGACCAATGTA PR(5): GCCGCAAGCAGTTCACGG PF(55): AGCAGCGGTTGATCCTTTGG PR(55): CCATATTTCTTTGCGATGTTCCC	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.
CrActina		gij1044865	PF(1): CTGTTTTGCTGACTGAGGCC PR(1): TCTTCTCCCTGTTAGCCTTGGG PF(2): CAATGAACTTCGTGTTGCTCCAG PR(2): GCCTCAGTCAGCAAAACAGGA	<i>Chenopodium rubrum</i> L.

Tabela 2. Resultado do alinhamento local (*tblastn*) das sequências de aminoácidos das proteínas obtidas nos mapas metabólicos do KEGG e o banco de nucleotídeos do NCBI

Proteína	E-value	Espécie	Similaridade
Betanidina 6-O-glucosiltransferase	0.0	<i>Phytolacca americana</i>	396/487 (81%)
Betanidina 5-O-glucosiltransferase	0.0	<i>Dorotheanthus bellidiformis</i>	489/489 (100%)
<i>cyclo</i> DOPA 5-O-glucosiltransferase	0.0	<i>Celosia cristata</i>	486/486 (100%)

Sequências de nucleotídeos dos genes *5-GT*, *6-GT* e *cDOPA5GT*, para o desenho de iniciadores, foram obtidas pelo alinhamento local (Tabela 2) e para os genes *Actina* (*ACT1*) e Tirosina descarboxilase (*TYRDC*) foram buscadas pela descrição no NCBI.

Extração de RNA total

A extração de ácido ribonucleico (RNA) total foi feita através do uso de *PureLink™ Plant RNA Reagent (Invitrogen®)* seguida de tratamento com *DNAseI™ (Invitrogen®)* de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade e qualidade do RNA total foram avaliadas por espectrofotometria (260/280nm) e, posteriormente testadas, também em gel de agarose (2%p/v). O DNA complementar (cDNA) foi obtido a partir de 2 µg RNA total através do uso do iniciador *poly-T* para ligar cauda poli-A, amplificando somente mRNA, conforme o protocolo do *SuperScript First-Strand System for RT-PCR kit (Invitrogen®)*.

Validação dos iniciadores

O procedimento de validação dos iniciadores foi realizado utilizando amostras de cDNA em diluições seriadas de 1:1; 1:5, 1:25 e 1:125. As reações de *qRT-PCR* foram realizadas em um equipamento modelo *ABI RT-PCR 7500 Fast (Applied Biosystems®)* utilizando o sistema de detecção *SYBR® Green (Applied Biosystems®, California, USA)*. Para estas reações foram utilizados 12,5 µL de *SYBR® Green*, 3 µL de cada iniciador desenhado (*Foward e Reverse - 10mM*), 1 µL da primeira fita de cDNA e água para completar o volume final de 25 µL. As condições de ciclagem utilizadas para amplificação foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 62°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, ocorrendo à leitura da fluorescência neste último passo. Um ciclo de 72°C por 5 minutos precede o ciclo da curva de dissociação - 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e aumento de 0,06°C a cada ciclo até a temperatura de 95°C e 95°C por 30 segundos, 60°C por 15 segundos. Esta amplificação gerou uma curva padrão representada através de um gráfico de regressão linear semi-log do valor *Ct* em comparação ao log da quantidade inicial de ácido nucléico. O *slope* (inclinação) da curva padrão foi gerada pelos dados: log da concentração das amostras vs. *Ct (Threshold Cycle)*. O desempenho da *qRT-PCR* em tempo real foi determinado através do cálculo da eficiência utilizando a fórmula: $E = (10^{(-1/\text{slope})})$ descrita por Pfaffl (2001).

qRT-PCR em Tempo Real

Foi feita a quantificação relativa somente do gene da enzima 5-GT. A expressão do gene “alvo” foi normalizada em relação ao nível de expressão do gene da *Actina* (Gao et al., 2008). As reações de qRT-PCR foram realizadas no mesmo equipamento e sistema de fluorescência. Para estas reações foram utilizados 12,5 µL de SYBR[®] Green, 3 µL de iniciadores (*Foward e Reverse*), 1 µL da primeira fita de cDNA (diluição 1:5) e água para completar o volume final de 25 µL. As condições da reação utilizadas para amplificação foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 62°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, ocorrendo a leitura da fluorescência neste último passo. Os resultados foram analisados através do método $\Delta\Delta CT$ e QR (quantificação relativa), conforme descrita por Pfaffl (2001).

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, onde para as análises dos teores de betacianinas foram utilizadas três repetições biológicas e para as de qRT-PCR, além de três biológicas, três repetições técnicas (triplicatas na placa). Os dados do teor de betacianina foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com o auxílio do programa WinStat (Machado & Conceição, 2002).

Resultados

Teor de betacianinas em plantas elicidadas com NaCl e tirosina

Em relação às betacianinas, houve um aumento de 22,8% no teor até as 36 horas de exposição ao sal, havendo um pequeno decréscimo de 7% nas 48 horas em comparação com as 36 horas, porém sem diferença significativa (Figura 2A). Já nas plantas crescidas na presença de tirosina esse aumento foi de 6% (Figura 2B). Esses valores indicam que o tempo de exposição ao sal, não foi suficiente para aumentar os

teores de betacianinas e que a utilização de um aminoácido precursor da rota de biossíntese, poderá não ser um bom elicitador para as plantas de *A. philoxeroides*.

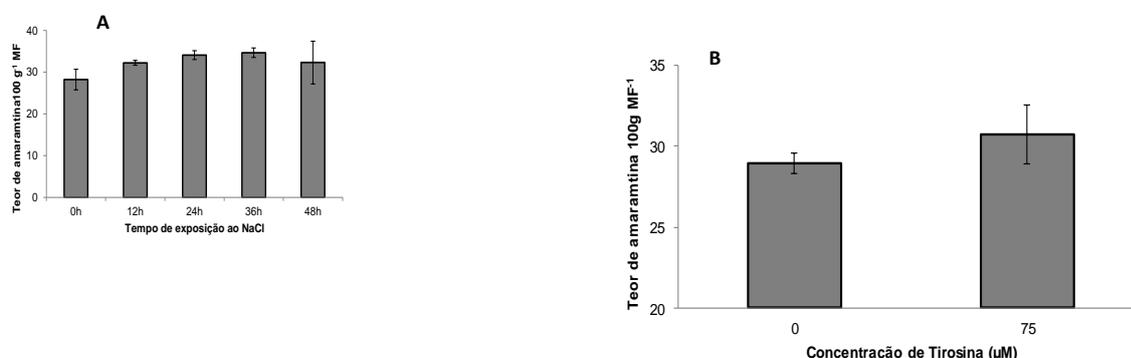


Figura 2. Teor de betacianina em plantas de *A. philoxeroides*. A) Plantas submetidas a diferentes tempos de exposição ao NaCl. B) Plantas cultivadas na presença e ausência de tirosina por 35 dias. As barras representam o erro padrão da média de três repetições.

Validação dos iniciadores

O experimento de validação dos iniciadores mostrou que, com exceção do iniciador 33 (5-GT), os valores de Ct apresentaram-se indeterminados, indicando não serem apropriados e específicos neste estudo. Entretanto, os resultados do experimento de validação do iniciador 33, mostraram-se satisfatórios e são apresentados na Tabela 3, aferida a partir do *slope* da equação de regressão linear, utilizado para o cálculo da eficiência de amplificação, assim como do coeficiente de regressão (R^2) (Deprez et al., 2002).

Tabela 3. Resultados da validação do conjunto de iniciadores para o gene 5-GT e Actina, realizada a partir de diluições seriadas de cDNA de plantas de *Alternanthera philoxeroides* no tempo 0h de exposição ao sal

Gene	Slope	Eficiência	R ²
5-GT	-1,586	4,27	0,98
Actina	-3,771	1,84	0,96

Expressão gênica

O gene *5-GT* apresentou um aumento de expressão de 1,4 vezes na análise de 12h sob estresse por sal, decaindo em torno de 1,4 vezes nas 24h, reduzindo a valores inferiores ao controle nas 36 horas e aumentando para 2,6 vezes a expressão em 48h. Esta espécie, portanto, apresentou uma elevação no nível de expressão do gene da enzima *5-GT* nas primeiras 12h e pico de expressão às 48h sob estresse por sal (Figura 3).

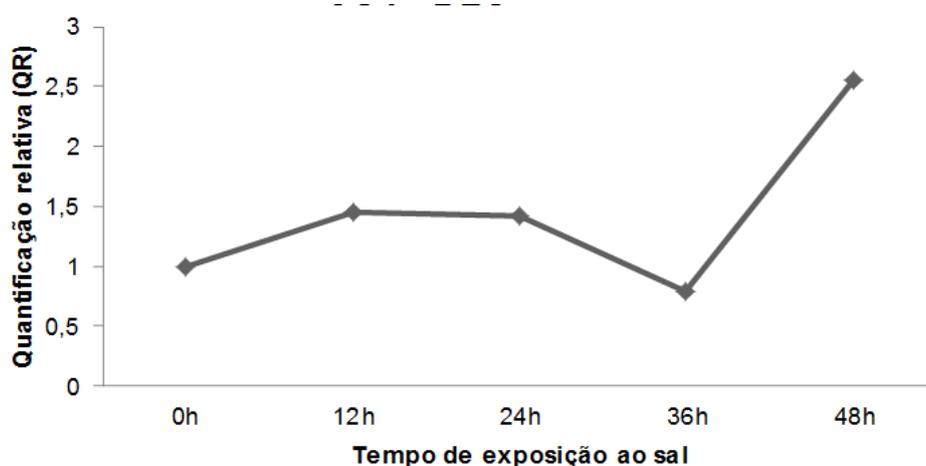


Figura 3. Expressão diferencial relativa do gene *5-GT* em *A. philoxeroides* em resposta ao NaCl. Coletas feitas após 0, 12, 24, 36 e 48 horas após o tratamento.

Plantas que cresceram em meio MS com 75 μ M de tirosina tiveram um aumento na expressão da enzima *5-GT* de 5 vezes, indicando um aumento da expressão deste gene nas plantas elicitadas com tirosina (Figura 4).

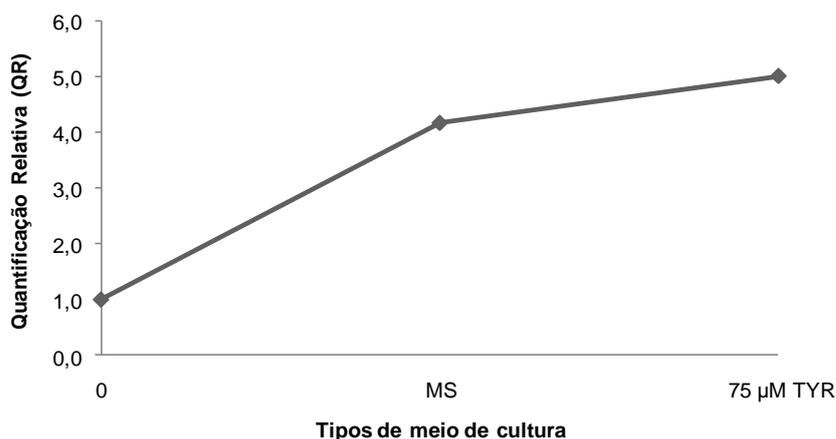


Figura 4. Expressão diferencial relativa do gene *5-GT* em *A. philoxeroides* em resposta ao tratamento com tirosina (75 µM) no meio MS.

Discussão

Vários estudos relacionados às enzimas envolvidas na biossíntese das betalaínas estão proporcionando grandes progressos no entendimento e uso desta classe de pigmentos nitrogenados solúveis em água. A maioria das enzimas envolvidas na rota de biossíntese foi identificada e purificada em algumas espécies, mas em *A. philoxeroides* não há relatos da identificação e nem da quantificação da expressão de nenhuma delas, até o presente trabalho.

A quantidade de informação disponível para cada espécie depende basicamente da complexidade do genoma e da importância econômica ou científica que determinada espécie possui. Levando-se em consideração o modelo biológico proposto neste trabalho pode-se observar que pelo fato da espécie ainda não ter tido seu genoma sequenciado, informações sobre *A. philoxeroides* são ausentes no que se refere às sequências gênicas depositadas em bancos de dados. Desta forma, o uso da bioinformática tornou-se uma ferramenta imprescindível na busca de informações sobre os genes e proteínas nos bancos de dados públicos, proporcionando a obtenção de informações sobre estrutura e função das enzimas envolvidas na biossíntese das betalaínas, que permitam o estudo destas enzimas em resposta à elicitação por sal e tirosina em plantas de *A. philoxeroides*. Através do uso de informações de espécies próximas, essa busca se deu por homologia

entre os genes dentro da ordem Caryophyllales o que parece não ser o mais adequado diante dos resultados obtidos.

Das 10 sequências de iniciadores desenhados, apenas um apresentou valores que permitiram sua validação e posterior análise da expressão em qRT-PCR. O perfil de expressão do gene *5-GT* apresentado sob a elicitación por sal possibilitou inferir que, a partir de 48 horas de exposição ao sal, esse gene que codifica para essa enzima realmente aumentou sua expressão. As betalaínas são uma classe de compostos que apresentam propriedades antioxidantes e de detoxificação das EROs (Escribano et al., 1998; Pedreño & Escribano, 2000; Kanner et al., 2001) e que podem funcionar como osmólitos na defesa de processos fisiológicos contra estresses abióticos através da modulação do acúmulo de aminoácidos (Wang et al., 2006). Portanto esse aumento na expressão da enzima pode ser uma tentativa desta espécie de ativar genes que minimizem os efeitos danosos do sal.

O aumento da expressão nas horas sob elicitación com sal, não está diretamente relacionado com o aumento do produto final, como pode ser observado na quantificação do teor de betacianinas. O efeito de um elicitador sobre as células ou tecidos vegetais não é totalmente conhecido. A ligação destes com os receptores localizados na membrana plasmática sucede a ativação da proteína-G, que por sua vez, media a estimulação da Adenilil Ciclase e Fosfolipase-C. Ocorre o aumento do nível de mensageiros secundários acoplados à ativação de suas quinases para o núcleo e finalmente, a ativação da transcrição de genes que codificam para as enzimas que participam das rotas de síntese de metabólitos secundários (Vasconsuelo & Boland, 2007). Esta rota de transdução de sinais, bem como, a complexidade tanto nos substratos das enzimas quanto nas próprias enzimas que catalisam as reações de biossíntese das betalaínas, pode explicar o não aumento deste pigmento durante os períodos de elicitación por sal. Na espécie *Suaeda salsa*, pertencente à família Chenopodiaceae, foi observado aumento no conteúdo de

betacianina quando as plantas foram submetidas ao estresse salino em intervalos de tempos de dois dias durante 15 dias (Wang et al., 2006), ou seja, muito superiores aos analisados no presente trabalho.

A via biossintética das betalaínas tem como precursor o aminoácido tirosina, utilizado como elicitador neste trabalho. Houve um aumento na expressão do gene *5GT* nas plantas de *A. philoxeroides* crescidas na presença de tirosina, porém, na análise do teor de betacianinas entre os tratamentos com presença e ausência deste aminoácido, não houve diferença significativa. Diante disso, deve ser levada em consideração a capacidade celular de acúmulo do composto (Maraschin & Verpoorte, 2001) que não é bem conhecida, até o presente momento, porém, é esperado haver um limite no acúmulo, influenciando a produtividade e o aumento no teor de betacianinas.

Conclusões

Os teores de betacianinas não são influenciados pelas eliciações de sal e tirosina em plantas de *A. philoxeroides*. A enzima *Betanidina 5-O-glucosiltransferase*, pertencente à rota de biossíntese das betacianinas tem sua maior expressão nas 48 horas de exposição a estresse salino, e quando crescidas *in vitro* no meio suplementado com tirosina. Estudos mais detalhados na rota de biossíntese das betalaínas devem ser realizados para possibilitar a construção de mais iniciadores que permitam quantificar a expressão dos genes destas enzimas.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W. et al. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, v.98, p.12473-12478, 1990.
- CAI, Y. et al. Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.6, p. 2063-2070, 1998.
- CHRISTINET, L.; BURDET, F.X.; ZAIKO, M.; HINZ, U.; ZRYD, J.P. Characterization and functional identification and functional identification of a novel plant 4,5-extradiol

dioxygenase involved in betalain pigment biosynthesis in *Portulaca grandiflora*. **Plant Physiology**, v.134, p.265-274, 2004.

DEPREZ, R.H.L. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on coda synthesis conditions. **Analytical Biochemistry**, v.307, p.63-69, 2002.

ESCRIBANO, J.; PEDREÑO, M.A.; GARCÍA-CARMONA F.; MUÑOZ, R. (Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots. **Phytochemical analysis**, v.9, p.124-127, 1998.

FANG, J.B. et al. Antitumor constituents from *Alternanthera philoxeroides*. *Journal of Asian Natural Products Resecar*, v.9, n.6, p.511-515, 2007.

GANDÍA-HERRERO, F.; GARCÍA-CARMONA, F.; ESCRIBANO, J. Purification and characterization of a latent polyphene oxidize from beet root (*Beta vulgarism* L.). **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.52, p.609-615, 2004.

GAO, J.; QUANG, X.; YIN, L.; HE, G. Isolation of coda clones for genes up-regulated in drought-treated *Alternanthera philoxeroides* root. **Journal Molecular Biology Reports**, v.35, n.3, p.485-488, 2008.

GEORGIEV, V.; ILIEVA, M.; BLEY, T.; PAVLOV, A. Betalain production in plant *in vitro* systems. *Act Physiologies Plant arum*, v.30, p.581–593, 2008.

GIROD, P.A.; ZRYD, J.P. Biogenesis of betalains: purification and partial characterization of DOPA 4, 5-dioxygenase from *Amanita muscaria*. **Photochemistry**, v.30, p.169-174, 1991.

GROTEWOLD, E. The genetics and biochemistry of floral pigments. **Annual Review Plant Biology**, v.57, p.761-780, 2006.

HAN, X.H.; GAO, Z.J.; XIAO, X.G. Enzymes and genes involved in the betalain biosynthesis in higher plants. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.24, p. 6735-6744, 2009.

HAN, B.; BAI, R.; LI, L. ZHANG, L.; MA, C.; ZHAO, J.; WANG, J.; PENG, J. Establishment of coda-AFLP technology system and stone less gene difference expression in *Sisypus jujube* Mill. **Frontiers of Agriculture in China**, v.4, n.4, p.449-445, 2010.

HANS, J.; BRANDT, W.; VOGT, T. Site- directed mutagenesis and protein 3D-homology modelling suggest a catalytic mechanism for UDP-glucose-dependent betanidin 5-O-glucosyltransferase from *Dorotheanthus bellidiformis*. **The Plant Journal**, v.39, p.319-333, 2004.

HOSACK, D.A.; DENNIS, G.J.R.; SHERMAN, B.T.; LANE, H.C.; LEMPICKI, R.A. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. **Genome Biology**, v.4, R70, 2003.

HURKMAN, W.J. Effect of salt stress on plant gene expression: a review. **Plant and Soil**, v.146, n.12, p.145-151, 1992.

JAIN, S.; NAINAWATEE, H.S.; JAIN, R.K.; CHOWDHURY, J.B. Salt tolerance in *Brassica juncea* L> II: salt-stress induced changes in polypeptide pattern of *in vitro* selected NaCl tolerance plants. **Euphytica**, v.65, n.2, p.107-112, 1993.

JOY, R.W.; SUGIYAMA, A.; FUKUDA, H.; KOMAMINE, A. Cloning and characterization of *polyphenol oxidase cDNAs* of *Phytolacca americana*. **Plant Physiology**, v.107, p.1083-1089, 1995.

KANNER, J.; HAREL, S.; GRANIT, R. Betalains a new class of dietary cationized antioxidants. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.49, p.5178-5185, 2001.

MACHADO, A.; CONCEIÇÃO, A. R. Programa estatístico WinStat Sistema de Análise Estatístico para Windows. Versão 2.0. Pelotas: UFPel, 2002.

MARASCHIN, M.; VERPOORTE, R. **ENGENHARIA DO METABOLISMO SECUNDÁRIO**, disponível em <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio10/metabol.pdf>, acessado em 02/03/2009.

MORENO, D.A.; GARCÍA-VIGUERA, C.; GIL, J.I.; GIL-IZQUIERDO, A.; Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health. **Phytochemistry Reviews**, v.7, p.261-280, 2008).

MUNNS, R.; HUSAIN, S.; RIVELLI, A.R. et al. Avenues for increasing salt tolerance of crops, and role of physiologically based selection traits. **Plant and Soil**, v.47, p.93-105, 2002.

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

PEDREÑO, M.A ; ESCRIBANO, J. Studying the oxidation and the antiradical activity of betalain from beetroot. **Journal of Biological Education**, v.35, p.49-51, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning. A laboratory manual** Ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001. v.2, p.888-894.

SASAKI, N.; ADACHI, T.; KODA, T.; OZEKI, Y. Detection of UDP-glucose: *cyclo*-DOPA-5-O-glucosyltransferase activity in four o'clocks (*Mirabilis jalapa* L.). **FEBS Letters**, v.568, p.159-162, 2004.

STEINER, U. et al. Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. **Planta**, v.208, p.114-124, 1999.

STRACK, D. VOGT, T. SCHLIEMANN, W. Recent advances in betalain research. **Phytochemistry**, v.62, p.247-269, 2003.

THELLIN, O; ZORZI, W.; LAKAYE, B.; DE BORMAN, B.; COUMANS, B.; HENNEN, G.; GRISAR, T.; IGOUT, A.; HEINEN, E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal of Biotechnology**, v.75, p.291-295, 1999.

VASCONSUELO, A.; BOLAND, R. Molecular aspects of early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. **Plant Science**, v.172, p.861-875, 2007.

VOGT, T.; ZIMMERMANN, E.; GRIMM, R.; MEYER, M. STRACK, D. Are the characteristics of betanidin glucosyltransferases from cell-suspension cultures of *Dorotheanthus bellidiformis* indicative of their phylogenetic relationship with flavonoid glucosyltransferases. **Planta**, v.203, p.349-361, 1997.

VOLP, A.C.P.; RENHE, I.R.T.; STRINGUETA, P.C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, p. 157-166, 2009.

WANG, C.Q.; ZHAO, J.Q.; CHEN, M.; WANG, B.S. Identification of Betacyanin and Effects of Environmental Factors on Its Accumulation in Halophyte *Suaeda salsa*. **Journal of Plant Physiology and Molecular Biology**, v.32, n.2, p.195-201, 2006.

ZHU, J.K. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.124, n.3, p.941-957, 2000.