

CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE MORANGO (*Fragaria x ananassa* DUCH.) QUANTO À EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À SÍNTESE DE COMPOSTOS FENÓLICOS

LABONDE, Julia¹; BOROWSKI, Joyce²; GALLI, Vanessa³; MESSIAS, Rafael⁴

¹Universidade Federal de Pelotas/Ciências Biológicas; ²Universidade Federal de Pelotas/Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial; ³Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular; ⁴Embrapa Clima Temperado
julialabonde@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

O morango é conhecido, cultivado e consumido nas mais diversas regiões do mundo. Sua cultura tem elevada lucratividade devido ao amplo conhecimento e aceitação da fruta pelo consumidor (OLIVEIRA et al., 2005).

Do ponto de vista nutricional, o morango é rico em diversos compostos funcionais benéficos à saúde humana, tais como os flavonóides, antocianidinas e antocianinas. (MOREIRA E MANCINI-FILHO, 2004).

As antocianinas são responsáveis pelas cores atrativas de flores, frutos, folhas, sucos de frutas. Na natureza, encontram-se associadas a moléculas de açúcares, mas, quando livres destes açúcares, são denominadas antocianidinas (agliconas)(TIMBERLAKE E BRIDLE, 1975). As antocianidinas e antocianinas possuem propriedades antioxidantes. Isso têm atraído a atenção para a nutrição preventiva, pois combatem os radicais livres, atuam como antiinflamatório e imunoestimulante, previnem doenças cardiovasculares e também inibem a proliferação de células cancerígenas(YUNES E CALIXTO, 2001).

A estes compostos fenólicos são atribuídas diversas características, tais como a capacidade de quelar metais pesados e a de seqüestrar radicais livres. Contudo, alguns estudos *in vitro* mostram que estes compostos fenólicos podem também promover reação oxidativa, agindo como pró-oxidantes, ao atuarem sobre metais, reduzindo-os e aumentando a formação de radicais livres e peróxidos (MOREIRA E MANCINI-FILHO, 2004).

A variabilidade genética de cultivares pode ser utilizada como informação para o melhoramento vegetal. Neste contexto, o estudo da expressão gênica destes compostos em diferentes cultivares, como fontes de variabilidade genética, pode contribuir no processo de melhoramento das variedades comerciais através do incremento na qualidade funcional desses frutos – uma exigência cada vez maior dos mercados consumidores (ALTIERI, 2002).

Desta forma, objetivou-se avaliar 10 variedades de morango em relação à expressão diferencial de genes relacionados à rota metabólica de fenilpropanóides, *phal* e *ans*, (Fig. 1) os quais codificam para as enzimas fenilalanina amônia liase (enzima chave de entrada na rota metabólica de fenilpropanóides), e antocianidina sintase (enzima relacionada à síntese de antocianidinas).

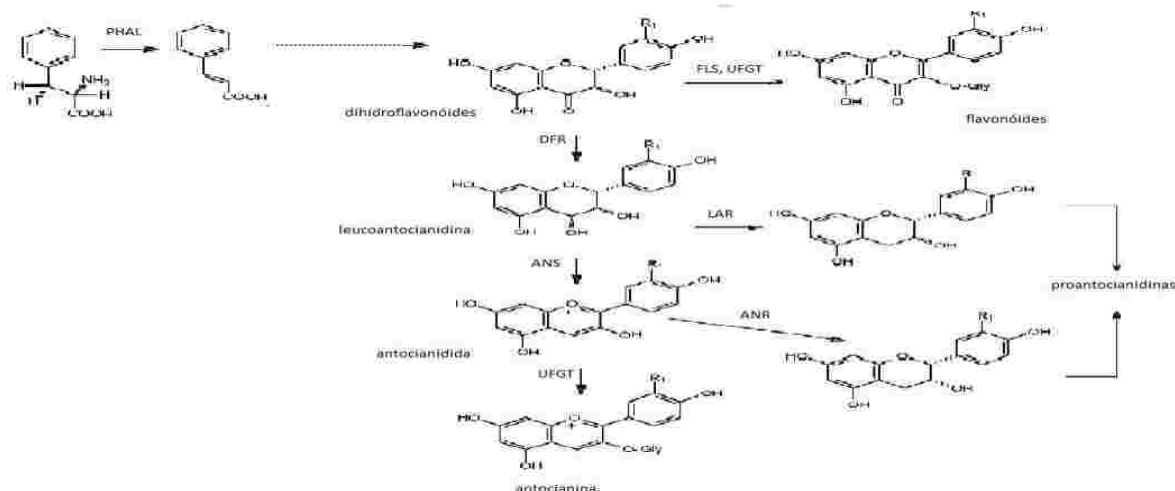


Figura 1 - Esquema simplificado mostrando a participação da enzima FENILALANINA AMÔNIO-LIASE (*PHAL*), enzima chave de início da rota metabólica dos compostos fenólicos, e da enzima ANTOCIANIDINA SINTASE (*ANS*), relacionada à síntese de antocianidinas, em frutos de morango. Figura adaptada de ALMEIDA, J. R.M. et al (2007).

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

2.1 Cultivares de morango

Dez cultivares de morango (Camarosa, Aromas, Festival, Albion, Ventana, Camino Real, Palomar, Diamante, Portola e San Andreas) foram cultivadas em triplicata em casa de vegetação na Sede da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, tendo recebido igual adubação de base e fertirrigação, durante seu desenvolvimento.

Frutos maduros foram coletados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido, sendo mantidos em *ultrafreezer* a temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises.

2.2 Métodos utilizados

Todos os materiais foram previamente tratados com inibidor de RNase (RNase Away – Invitrogen™). As amostras congeladas foram maceradas com auxílio de Nitrogênio líquido. A extração de RNA total foi realizada pelo método do CTAB com modificações (Messias *et al.*, 2010), sendo sua qualidade avaliada por espectrofotometria (relações A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}) e por eletroforese em gel de agarose 1 %. A concentração foi calculada utilizando a técnica de fluorimetria (QuBit-RNA BR, Invitrogen™). A partir de 75 ng de RNA total, foi realizada a digestão com 1 U DNase e 1 x DNase I Reaction Buffer, e posteriormente a síntese de cDNA com a enzima MMLV, conforme fabricante (Invitrogen™). Após serem sintetizados, os cDNAs foram amplificados por PCR em tempo real, utilizando *primers* específicos para os genes que codificam para as enzimas fenilalanina amônio liase (*PHAL*) e antocianidina sintase (*ANS*), além do gene endógeno que codifica para o RNA ribossômico 18S. Estes *primers* foram construídos com o auxílio do programa Vector NTI10 (Invitrogen™) a partir de sequências de *Fragaria x ananassa* obtidas no banco NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A eficiência destes *primers* foi previamente avaliada mostrando-se superior a 90%. As condições da reação de PCR foram: volume final de 20 μL contendo 1 μL cDNA, 10 μL de Platinum Sybr green UDG (Invitrogen™), e 2-5 pmol de cada *primer*. A amplificação foi padronizada em um termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems) utilizando as

seguintes condições: 50 °C por 20 s, 95 °C por 10 min, seguido por 45 ciclos de 15 s à 95 °C e 60 s à 60 °C. Condições da curva de dissociação: 15 s à 95 °C, 60 s à 60 °C, 30 s à 95 °C e 15 s à 60 °C. O gráfico de expressão relativa foi gerado segundo Pfaffl (2001). Neste trabalho, a cultivar Camarosa foi escolhida como referência devido ao seu grande cultivo na região sul do Brasil.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados (Fig. 2) mostram que a transcrição dos genes *phal* e *ans* é mais pronunciada na cultivar Camarosa. O bom desempenho da cultivar Camarosa é confirmado pelos resultados de (DUARTE FILHO et al., 2003), que relatam que a mesma vem sendo cultivada na maioria dos países produtores de morango, pois possui boa adaptação a diversos tipos de ambiente e clima.

A cultivar Palomar, comparada a Camarosa, apresentou expressão gênica inferior às demais em relação ao gene *phal*, o qual foi cerca de 5 vezes menos transcrito nesta cultivar. No caso da cultivar Festival, apesar de a expressão do gene *phal* ser similar a da Camarosa, o mesmo não ocorreu com o gene *ans*, o que denota possível direcionamento para outro braço da rota metabólica, que não para a de antocianidinas e antocianinas, já que estas são sintetizadas a partir do gene *ans*. Essas cultivares possivelmente apresentam maiores níveis de flavonóides ou outros compostos (ácidos) fenólicos, isto indica que a expressão da *phal* não está relacionada necessariamente a expressão da *ans*. Da mesma forma, a Albion e a San Andreas tem baixos níveis de *phal*, mas não tanto de *ans*, o que confirma esta hipótese de que não há uma correlação direta entre a expressão de ambas.

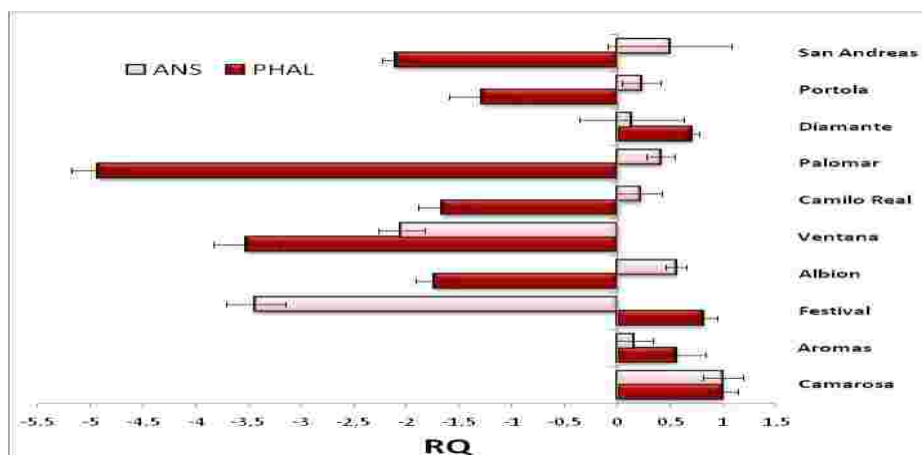


Figura 2. Expressão dos genes *phal* e *ans* por PCR em Tempo Real de 10 cultivares de morango cultivadas na Sede da Embrapa Clima Temperado.

Em suma, os resultados apontam para a presença de variabilidade genética nestas cultivares, as quais podem ser exploradas contribuindo para o melhoramento de variedades comerciais, e no incremento da qualidade nutricional e funcional desses frutos, uma exigência cada vez maior dos mercados consumidores (Altieri, 2002).

4 CONCLUSÃO

Dentre as cultivares estudadas, a Camarosa foi a que obteve melhor rendimento em relação aos genes *phal* e *ans*. Já a Palomar e Festival obtiveram

menor expressão para os genes *phal* e *ans* respectivamente. Este estudo contribuiu para a caracterização e seleção das cultivares com maior potencial de expressão gênica, visando esforços de melhoramento genético vegetal e engenharia metabólica voltados para o incremento de compostos funcionais.

Para avaliarmos o potencial antioxidante destas cultivares, faz-se necessário avaliar a expressão de outros genes desta rota, bem como a taxa de produção destas enzimas e compostos finais, já que existem as regulações pós-transcricionais e pós-traducionais.

5 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. R.M. et al. Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria x ananassa*). **Archives of Biochemistry and Biophysics** 465 (2007).

ALTIERI, M. Agroecologia: bases científicas para uma agricultura sustentável. Guaíba-RS; **Agropecuária**, 2002.

CHANG, C.J., M. GARNIER, L. ZREIK, V. ROSSETTI & J.M. Bové. Citrus variegated chlorosis: cultivation of the causal bacterium and experimental reproduction of the disease, **In 12th Conf. Int. Org. Citrus Virol.**, Riverside, 1993. p.294-300.

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

MESSIAS, R. S.; GALLI, V.; SILVA, S. D. A.; SCHIRMER, M. A.; PILLON, C. N. Metodologias de extração e avaliação semi-quantitativa da expressão de genes de metabolismo secundário do milho. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. ISSN 1981-5980, 2010.

MOREIRA, A. V. B. & MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 4, out./dez. 2004.

OLIVEIRA, R.P.; NINO, A.F.P.; SCIVITTARO, W.B. Mudanças certificadas de morangueiro: maior produção e melhor qualidade da fruta. **A Lavoura**, Rio de Janeiro, v.108, n.655, 2005.

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

TIMBERLAKE; C. F.; BRIDLE, P. Em *The Flavonoids – Part I*; HARBORNE, J.B.; MABRY, T. J.; MABRY, H., eds.; **Academic Press**: New York, 1975, p. 215.

VERPOORTE, R. & MEMELINK, J. Engineering secondary metabolite in plants. **Cur. Opinion in Biotech.**, v.13, p.181-187, 2002.

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

