



Congrega
Urcamp 2016

13ª Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa

REVISTA DA JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA ISSN:1982-2960

Expressão de gene da síntese de betacianina em *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. sob elicitación por NaCl e tirosina

Expression of betacyanin synthesis gene in *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. under NaCl and tyrosine elicitation

Marcia Vaz Ribeiro¹, Alitcia Kleinowski², Isabel Rodrigues Brandão³, Simone Ribeiro Lucho⁴, Cristini Milech⁵, Eugenia Jacira Bolacel Braga⁶, Mariana Soares⁷

RESUMO

As betalaínas são uma classe de compostos nitrogenados em plantas que apresentam propriedades antioxidantes e de detoxificação e que podem funcionar como osmólitos na defesa de processos fisiológicos, contra estresses abióticos. Esta classe de pigmentos é restrita a 13 famílias da ordem Caryophyllales, sendo a família Amaranthaceae, através da espécie *Alternanthera philoxeroides*, um excelente modelo biológico para o uso de técnicas que permitam a quantificação da expressão dos genes, da rota de biossíntese das betalaínas. Aliado a isso o uso de 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 elicitación 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. 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 RT-qPCR, além de três biológicas, três repetições técnicas. 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 WinStat. 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 (RT-qPCR), utilizando como controle endógeno o gene de Actina. Em relação à concentração de betacianinas, houve um aumento de 22,8% no teor até às 36 horas de exposição ao sal. Já nas plantas crescidas na presença de tirosina esse aumento foi de 6%. Na análise de expressão relativa foi possível observar que a partir das 12h de estresse por sal, houve aumento da expressão do gene da 5GT até às 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.

Palavras chaves: betalaínas; elicitores; erva-de-jacaré; expressão diferencial.

ABSTRACT

The betalaines are a class of nitrogenous compounds in plants that have antioxidant and detoxification properties that can function as osmolytes in protection of physiological processes against abiotic stress. This class of pigments is restricted to 13 families of Caryophyllales order, family Amaranthaceae being, across species *Alternanthera philoxeroides*, an excellent biological model for the use of techniques which allow quantification of the expression of genes of the biosynthesis betalaines route. The use of elicitors when added to the culture medium can cause alterations in secondary metabolism by stimulating the expression of genes of betacyanin synthesis. The aim of this study was to evaluate the betacyanin content and the differential expression of genes involved in the biosynthetic pathway of this compound in plants of *A. philoxeroides*, submitted to elicitation by NaCl and tyrosine. For the experiment salinity, *A. philoxeroides* plants were grown in vitro on MS liquid medium on vermiculite for 35 days. After this period, medium was added to a NaCl solution (400 mM) and collected aerial parts of the plants, after 0, 12, 24, 36 and 48 hours of exposure. The experimental design was completely randomized. Data from betacyanin content were subjected to ANOVA, and the means were compared by a Tukey's post-test with a 5% error probability using WinStat statistical software. For tyrosine experiment, nodal segments were inoculated in MS medium in the presence and absence of tyrosine (0 and 75 μ M) with collected shoots, after 35 days of cultivation. As well, extraction of betacyanins the quantification of differential expression by the polymerase chain reaction in real time (RT- qPCR) using Actin as endogenous gene control. Regarding the concentration of betacyanin, there was a 22.8% increase in content of up to 36 hours of exposure to salt. Already in plants grown in the presence of tyrosine, the increase was 6%. In the analysis of relative expression was observed that from the 12 hours of salt stress, an increase in expression of 5GT gene to ace 24h followed by decrease and increase again at 36 and 48 hours, respectively. The 5GT gene also increased their expression in response to tyrosine. These results suggested that in *A. philoxeroides* plants, bethanidine 5-O-glucosyltransferase enzyme, belonging to the biosynthetic betacyanins route has higher expression in 48 hours.

Key-words: betalains; elicitors, in vitro propagation, alligator weed; differential expression.

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 (KHAN; GIRIDHAR, 2015). Esses ainda podem ser divididos em dois grupos cromo/estruturais: betaxantinas (amarelo) e betacianinas (vermelho-violeta) sendo que estas

últimas ainda podem ser classificadas quimicamente em quatro tipos: betanina, amarantina, gonferina e bougainvilina (GANDÍA-HERRERO; ESCRIBANO; GARCÍA-CARMONA, 2016).

Nos últimos anos, a rota biossintética das betalaínas vem sendo cada vez mais estudada e algumas enzimas envolvidas nesta rota foram caracterizadas (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) (KANNER; HAREL; GRANIT, 2001)

As DOPA dioxigenases foram isoladas e identificadas do fungo *Amanita muscaria* 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 (TANAKA; SASAKI; OHMIYA, 2008). 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 que foi primeiramente identificada em plantas de *Mirabilis jalapa* enquanto que o segundo grupo, das betanidinas glucosiltransferases, purificadas e caracterizadas a partir de suspensão celular de culturas de *Dorotheanthus belliformes* 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 (XIAO-HONG; ZHAO-JIAN; XING-GUO, 2009).

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, além disso, o uso de precursores como aminoácidos, estimula a via biossintética de seu composto final (GEORGIEV et al., 2008).

A quantificação da expressão dos genes da rota de biossíntese das betalaínas poderá ser um indicativo do quanto a célula está sinalizando para suas rotas bioquímicas produzir esta enzima (XIAO-HONG; ZHAO-JIAN; XING-GUO, 2009). Diversas metodologias foram desenvolvidas visando quantificar a concentração relativa dos transcritos dos genes em células e tecidos (HAN et al., 2010).

No presente trabalho o modelo proposto para o estudo da rota de biossíntese das betalaínas foi à espécie *Alternanthera philoxeroides* (Amaranthaceae), por ser uma planta que apresenta alto conteúdo de betacianinas. 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).

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 elicitación por NaCl e pelo aminoácido tirosina.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e tratamento com sal

Plantas de *A. philoxeroides* foram cultivadas *in vitro* no substrato 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

Os explantes foram submetidos a dois tratamentos 0 e $75 \mu\text{M}$ de tirosina, a qual foi solubilizada em DMSO, filtrada e adicionada ao meio MS, após autoclavagem. 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 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 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. A parte aérea (folha e caule) das plantas elicidadas 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 primers

Inicialmente foi identificada a rota metabólica da produção de betalaínas, 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).

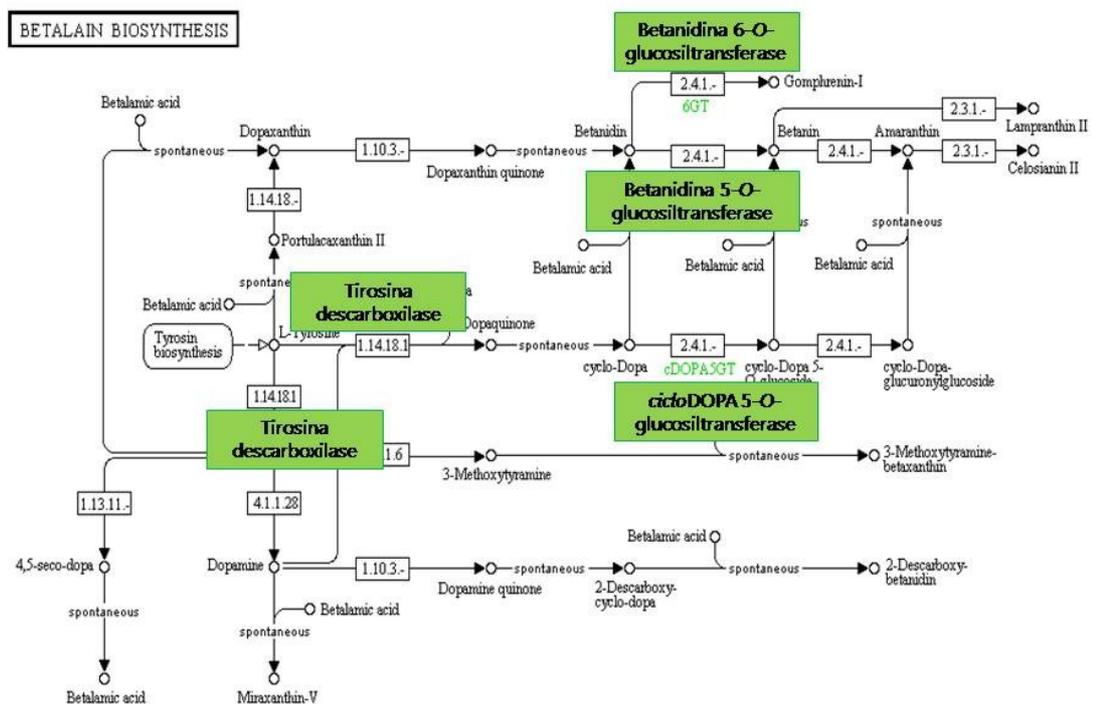


Figura 1. Rota de biossíntese das betalaínas. Caixas em verde indicam as enzimas utilizadas na construção dos primers para análise de expressão gênica por RT-qPCR, em plantas de *Alternanthera philoxeroides* submetidas a diferentes tempos de exposição ao sal e a presença de tirosina. Fonte: http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?map00965.

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

Enzima	E.C	Nº de acesso (NCBI)	Sequência dos <i>primers</i> 5'-3'	Espécie
Betanidina 6-Oglucosiltransferase	2.4.1	gi 219566993	PF(1): TGGTCCCTACGTCGCCAG PR(1): CATCGCTTGGCATTCCGAA PF(11): GCCAACGGCCTAGATCGAGC PR(11): GCGACGTAGGGACCACAGGA	<i>Phytolacca americana</i> L.
Tirosina descarboxilase	4.1.1.28	gi 18491208	PF(2): CGCAATAGGAGCGCCATTG PR(2): TTCCACGCCTCCTTAACGTG PF(22): TTGCGCAATAGGAGCGCC PR(22): CACGCCTCCTTAACGTGCTTC	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.
Betanidina 5-O glucosiltransferase	2.1.4	gi 5918022	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	gi 62086402	PF(4): GCCGATCATAGGGTGGCCG PR(4): ATCTTCGAATTATACGCTTGCTCCG PF(44): GCGGTGGAGTTGACAAGGG PR(44): TCACCCCATCTTTCTTCACTTCTC	<i>Celosia cristata</i> L..
Tirosina descarboxilase	1.14.18.1	gi 145334160	PF(5): TGACGGCGATGAAGACCAATGTA PR(5): GCCGCAAGCAGTTCACGG PF(55): AGCAGCGGTTGATCCTTTGG PR(55): CCATATTTCTTTGCGATGTTCCC	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.
CrActina		gi 1044865	PF(1): CTGTTTTGCTGACTGAGGCC PR(1): TCTTCTCCCTGTTAGCCTTGGG PF(2): CAATGAACTTCGTGTTGCTCCAG PR(2): GCCTCAGTCAGCAAAACAGGA	<i>Chenopodium rubrum</i> L.

*E.C: Enzyme Commission Numbers

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

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>cycloDOPA</i> 5-O-glucosiltransferase	0.0	<i>Celosia cristata</i>	486/486 (100%)

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 primers

O procedimento de validação dos *primers* foi realizado utilizando amostras de cDNA em diluições seriadas de 1:1; 1:5, 1:25 e 1:125. As reações de *RT-qPCR* 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 *primer* desenhado (*Forward* 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: $E = (10^{(-1/slope)})$ descrita por Pfaffl (2001).

RT-qPCR 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 foram realizadas no mesmo equipamento e sistema de fluorescência. Para estas reações foram utilizados 12,5 µL de SYBR® Green, 3 µL de *primers* (*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 *RT-qPCR*, 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 E DISCUSSÃO

Teor de betacianinas em plantas elicidadas com NaCl e tirosina

Em relação às betacianinas, houve um aumento de 22,8% no teor até 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). Resultado semelhante foi encontrado por Kleinowski et al. (2014), que observaram um acréscimo na produção deste pigmento na mesma concentração utilizada no presente trabalho.

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 das betalainas em doses maiores poderá ser um bom elicitador para as plantas de *A. philoxeroides*.

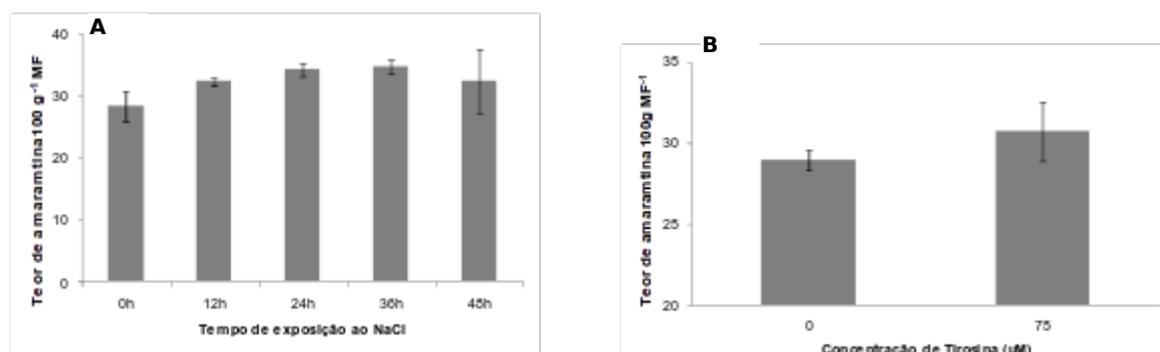


Figura 2. Teor de betacianina em plantas de *Alternanthera philoxeroides*. A) Plantas submetidas a diferentes tempos de exposição ao NaCl. B) Plantas cultivadas na presença e ausência de tirosina por 35 dias. As barras representam o erro padrão da média de três repetições.

Validação dos *primers*

O experimento de validação, aferido 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, 2002), dos *primers*, mostrou que das 10 sequências desenhadas, apenas o *primer* 33 (5-GT) apresentou valores que permitiram sua validação (Tabela 3). Os demais apresentaram valores de Ct indeterminados, indicando não serem apropriados e específicos neste estudo.

Tabela 3. Resultados da validação do conjunto de *primers* 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	<i>Slope</i>	Eficiência	R^2
5-GT	-1,586	4,27	0,98
<i>Actina</i>	-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 com estresse por sal (Figura 3).

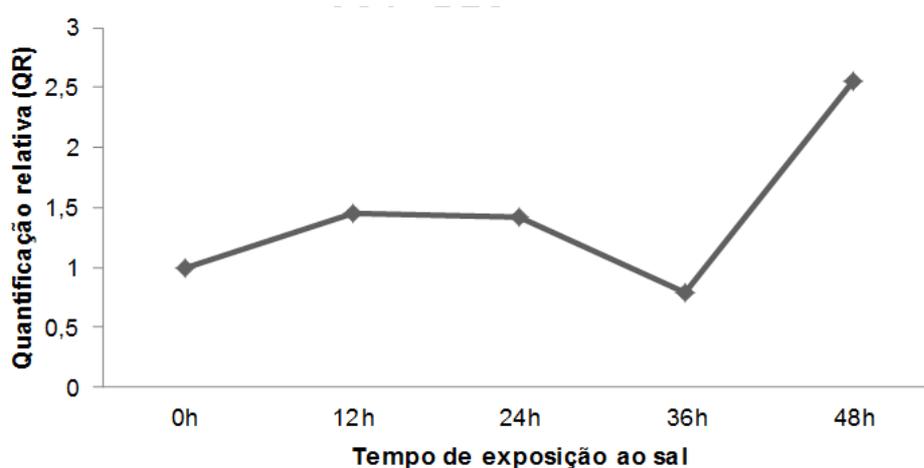


Figura 3. Expressão diferencial relativa do gene *5-GT* em *A. philoxeroides* em resposta ao NaCl.

Esse aumento na expressão do gene pode ser uma tentativa desta espécie de ativar genes que minimizem os efeitos danosos do sal, pois as betalaínas são uma classe de compostos que apresentam propriedades antioxidantes e de detoxificação das EROs (GANDÍA-HERRERO; ESCRIBANO; GARCÍA-CARMONA, 2016) e que podem funcionar como osmólitos na defesa de processos fisiológicos contra estresses abióticos através da modulação do acúmulo de aminoácidos (RIBEIRO et al., 2014).

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 (FIGURA 2A). 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 elicitação 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.

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

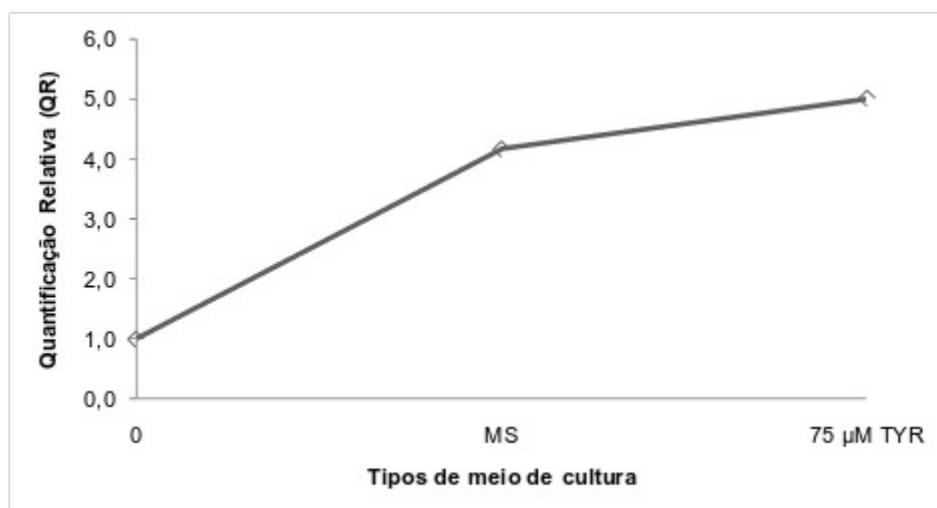


Figura 4. Expressão diferencial relativa do gene 5-GT em *A. philoxeroides* em resposta ao tratamento com tirosina (75 μM) no meio MS.

A via biossintética das betalaínas tem como precursor o aminoácido tirosina, utilizado como elicitor 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 que capacidade celular de acúmulo do composto (MARASCHIN; VERPOORTE, 2001) não é bem conhecida, até o presente momento, porém, é esperado haver um limite no acúmulo de metabólitos, 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 *primers* que permitam quantificar a expressão dos genes destas enzimas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAI, Y.; SUN, M.; WU, H.; HUANG, R.; CORKE, H. Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.2063-2070, 1998.

CHRISTINET, L.; BURDET, F.X.; ZAIKO, M.; HINZ, U.; ZRYD, J.P. Characterization 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 depend on cda synthesis conditions. **Analytical Biochemistry**, v.307, p.63-69, 2002.

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.

GANDÍA-HERRERO, F.; ESCRIBANO, J.; GARCÍA-CARMONA, F. Biological Activities of Plant Pigments Betalains. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 56, p. 937-945, 2016.

GAO, J.; QUANG, X.; YIN, L.; HE, G. Isolation of cda 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**, 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.

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 *Sisyrhus jujube* Mill. **Frontiers of Agriculture in China**, v.4, n.4, p.449-445, 2010.

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.

KHAN, M. I.; GIRIDHAR, P. Plant betalains: Chemistry and biochemistry. **Phytochemistry**, v. 117, p. 267-295, 2015.

KLEINOWSKI, A.M.; RODRIGUES, I.C.S.; RIBEIRO, M.V.; EINHARDT, A.M.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B. Pigment production and growth of *Alternanthera* plants cultured *in vitro* in the presence of tyrosine. **Brazilian Archives of Biology and technology**, v. 57, p. 253-260, 2014.

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 10/07/2015.

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. 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.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

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

RIBEIRO, M.V.; DEUNER, S.; BENÍTEZ, L.C. EINHARDT, A.M. PETERS J.A.; BRAGA E.J.B. Betacyanin and antioxidant system in tolerance to salt stress in *Alternanthera philoxeroides*. **Agrociencia**, v. 48, p.199-210, 2014.

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.

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

XIAO-HONG; 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.

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.

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