

EXPRESSÃO GÊNICA DE TRÊS UDP-GLICOLILTRANSFERASES EM *Stevia rebaudiana* Bertoni SUBMETIDAS À AÇÃO DE AGENTES ELICITORES

MARIANA MÜHLENBERG SOARES¹; SIMONE RIBEIRO LUCHO²; MARCELO NOGUEIRA DO AMARAL²; CRISTINI MILECH²; ALÍTCIA MORAES KLEINOWSKI²; EUGENIA JACIRA BOLACEL BRAGA³

¹Graduanda de Ciências Biológicas, bolsista PIBIC-UFPEL – mary.msoares@gmail.com

²PPG Fisiologia Vegetal–Instituto de Biologia-UFPEL

³Professor Associado III do Departamento de Botânica, Instituto de Biologia - UFPEL
– jacirabraga@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Stevia rebaudiana* (Bert.), conhecida como estevia, é uma erva perene da família Asteraceae, e possui uma grande demanda na indústria farmacêutica, alimentícia e de bebidas, principalmente, pelo poder adoçante de um composto oriundo de suas folhas, chamado de glicosídeos de esteviol (GSs) (MADAN et al., 2010).

A biossíntese dos GSs compreende três estágios principais: (1) a via plastídica MEP; (2) os passos de condensação produzindo ácido kaurenico; (3) hidroxilação do ácido kaurenico e finalmente a glicosilação do esteviol por UDP-glicosiltransferases (UGTs): UGT85C2, UGT74G1 e UGT76G1, produzindo diferentes GSs (HUMPHREY et al., 2006; MOHAMED et al., 2011).

Várias estratégias biotecnológicas têm sido formuladas e aplicadas para induzir ou melhorar a biossíntese de metabólitos secundários, sendo o cultivo de plantas com elicitores uma delas (ZHAO et al., 2005). Alguns hormônios vegetais têm sido utilizados em estudos de elicitação, sendo que os mais estudados são o Metil jasmonato (MEJA) e o Ácido salicílico (AS) (RAMIREZ-ESTRADA et al., 2016).

Outra classe de reguladores de crescimento bastante explorada são as poliaminas (Pas), principalmente espermidina (SPD), devido ao seu papel na tolerância ao estresse em plantas. Alguns estudos mostram a SPD como um bom candidato para o uso como elicitador (KHALIL et al., 2016; HUANG et al., 2017). Ao contrário das Pas, o Paclobutrazol (PBZ) é um inibidor de crescimento, pois atua inibindo a biossíntese das giberelinas (HAJIHASHEMI; GEUNS, 2016), adicionalmente o PBZ pode aliviar os danos causados pelo estresse e com isso possivelmente poderia ocasionar alterações no conteúdo de GSs em plantas de estevia (WANG; LIN, 2016).

Segundo PRASADA et al. (2012) uma das formas de facilitar a aplicação de compostos elicitores no cultivo de plantas, além do cultivo in vitro, é através da técnica de hidroponia. Essa técnica, melhora a qualidade da matéria-prima, já que a planta fica livre de contaminantes do solo e, na presença de elicitores bióticos ou abióticos possibilita o estudo da expressão de genes de enzimas envolvidas em uma rota metabólica (HAJIHASHEMI; GEUNS, 2016).

O objetivo deste estudo foi analisar a expressão dos genes de três UDP-glicosiltransferases em *Stevia rebaudiana* quando submetidas à ação dos agentes elicitores Metil jasmonato, Ácido Salicílico, Espermidina e Paclobutrazol durante quatro tempos de exposição (24h, 48h, 72h e 96h) através da técnica de RT-qPCR.

2. METODOLOGIA

Plantas de estevia cultivadas *in vitro* foram aclimatizadas e posteriormente transferidas para um sistema hidropônico de fluxo contínuo com raízes flutuantes e cultivadas com solução nutritiva de Hoagland, meia força, por dois dias (HOAGLAND; ARNON, 1950). Como tratamento controle utilizou-se a solução de Hoagland, meia força (T1) e para os demais tratamentos a mesma solução adicionada de 100 μ M de Metil jasmonato (T2); 100 μ M de Espermidina (T3); 100 μ M de Ácido Salicílico (T4) e 100 μ M de Paclobutrazol. Folhas destas plantas foram coletadas em um período de quatro dias com intervalos de 24 horas.

O experimento foi inteiramente casualizado (5 x 4), sendo quatro agentes elicitores e o controle (sem elicitação) e quatro tempos de exposição. Cada tratamento continha três repetições, representadas cada uma por um vaso contendo cinco plantas de *S. rebaudiana*.

O RNA total foi extraído a partir de 100 mg de folhas de acordo com o protocolo do fabricante (Plant RNA Reagent Purilink®, EUA). Para remoção completa de resíduos de DNA, as amostras foram tratadas com DNase I (Invitrogen®, EUA). A quantidade e a pureza do RNA foram determinadas utilizando um NanoDrop ND-1000 e a qualidade e a integridade foram verificadas através de eletroforese em gel de agarose a 1,0%. Os cDNAs de cadeia simples foram sintetizados por transcrição reversa de 2 μ g de RNA total utilizando o kit oligo-dT SuperScript First-Strand Synthesis System para RT-qPCR (Invitrogen®-18080093, EUA).

As reações de RT-qPCR foram realizadas utilizando o kit FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Hoffmann–La Roche®) e os seguintes parâmetros de amplificação: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto com inserção da curva de melting de 65 a 95°C, com incremento de 5°C a cada medida de fluorescência. Para cada repetição biológica foram feitas três repetições técnicas (triplicatas).

Foram utilizados *primers* mencionados em estudos prévios da rota de biossíntese de glicosídeos de esteviol (MODlet al., 2014). Os genes *UBQ* e *ACT* foram utilizados como normalizadores internos das reações de RT-qPCR (testados previamente nas mesmas condições experimentais).

Os resultados correspondem a valores médios \pm erro padrão. Utilizou-se o software SPSS (versión 22; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) para fazer a análise de variância (ANOVA) de um fator, seguido de um teste Tukey HSD, para comparar as diferenças entre as médias, usando nível de significância de $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados foram analisados estatisticamente comparando os diferentes tempos de exposição (24, 48, 72 e 96h) dentro de cada agente elicitor. Entre os elicitores avaliados, o AS e o MEJA foram os que tiveram menor influência sob a expressão do gene *UGT85C2* (Fig. 1a), entretanto, PBZ foi capaz de aumentar a sua expressão nos últimos tempos de exposição, atingindo o valor de 2,44 vezes mais que as plantas controle com 96h de exposição. Para a SPD os níveis de expressão só foram alterados nos tempos de 24h e 96h, com valores de 2,49 e 1,66, respectivamente.

Para o gene *UGT74G1* (Fig. 1b), PBZ foi o elicitor que propiciou maior alteração na expressão, com um aumento de 2,96 vezes quando comparado ao controle às 96h. Diferentemente, HAJIHASHEMI et al. (2013) relataram que a transcrição de *UGT74G1* foi bastante estável quando as plantas de estevia foram

tratadas com PBZ. Os elicitores SPD e MEJA somente alteraram a expressão de *UGT74G1* nos tempos de 48h e 96h, respectivamente. E assim como ocorreu anteriormente, AS não alterou a expressão desse gene.

O gene *UGT76G1*, que modula a síntese de esteviosídeo e rebaudiosídeo A (MODI et al., 2014), mostrou-se estável em todas as plantas que foram tratadas com AS e SPD (Fig. 1c), entretanto quando tratadas com MEJA observa-se altos níveis de transcritos, com exceção apenas para o último tempo de exposição. Somente o PBZ afetou negativamente a transcrição do gene *UGT76G1*, com valores abaixo do tratamento controle (0,19), após 24 horas de elicitação.

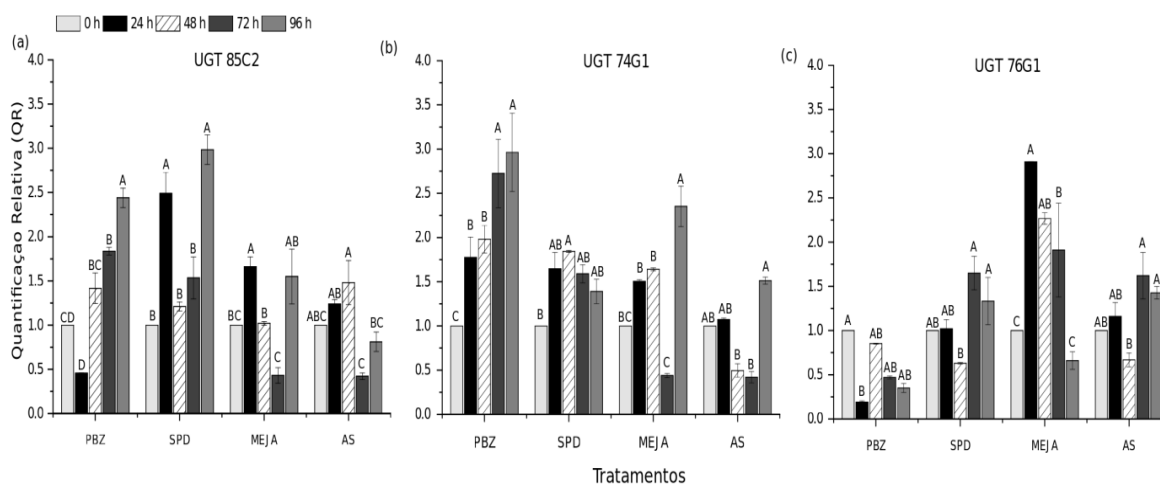


Figura 1. Quantificação relativa (QR) de três genes (*UGT85C2*, *UGT74G1* e *UGT76G1*) da via de biossíntese de glicosídeos de esteviol em *Stevia rebaudiana* sob o efeito de Paclobutrazol (PBZ), Espermidina (SPD), Metil jasmonato (MEJA) e Ácido salicílico (AS) após quatro tempos de exposição (24, 48, 72 e 96 h) em comparação com o controle. Letras diferentes comparam o fator tempo dentro de cada elicitor com base na ANOVA seguido pelo teste Tukey $P \leq 0,05$.

4. CONCLUSÕES

Entre os elicitores avaliados, PBZ, SPD e MEJA resultam em um efeito positivo na expressão dos genes *UGT85C2* e *UGT74G1*, adicionalmente, MEJA também propicia um aumento na expressão do gene *UGT76G1*. As análises dos transcritos das três UDP-glicosiltransferases mostram-se estáveis em todos os tempos de exposição quando tratadas com AS. Este estudo mostra os mecanismos de respostas das plantas de estevia, a nível molecular, quando submetidas à ação dos agentes elicitores PBZ, SPD, MEJA e AS.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HAJIHASHEMI, S.; GEUNS, J.M.C. Gene transcription and steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana* under polyethylene glycol-induced drought stress in greenhouse cultivation. **FEBS Open Bio**, v. 6, p. 937–944, 2016.

HAJIHASHEMI, S., GEUNS, J.M.C., EHSANPOUR, A.A., 2013. Gene transcription of steviol glycoside biosynthesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni under polyethyleneglycol, paclobutrazol and gibberellic acid treatments in vitro. **Acta Physiologia Plantarum**, v. 35, p. 2009–2014, 2013.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment**, v. 347, p.1–32, 1950.

HUANG, Y.; LIN, C.; HE, F.; LI, Z.; GUAN, Y.; HU, Q.; HU, J. Exogenous spermidine improves seed germination of sweet corn via involvement in phytohormone interactions, H₂O₂ and relevant gene expression. **BMC Plant Biology**, p.1–16, 2017.

HUMPHREY, T.V.; RICHMAN, A.S.; MENASSA, R.; BRANDLE, J.E. Spatial organisation of four enzymes from *Stevia rebaudiana* that are involved in steviol glycoside synthesis. **Plant Molecular Biology**, v. 61, p. 47–62, 2006.

KHALIL, S.A.; KAMAL, N.; SAJID, M.; AHMAD, N.; ZAMIR, R.; AHMAD, N.; ALI, S. Synergism of polyamines and plant growth regulators enhanced morphogenesis, stevioside content, and production of commercially important natural antioxidants in *Stevia rebaudiana* Bert. **InVitro Cellular e Developmental Biology– Plant**, v. 52, p. 174–184, 2016.

MADAN, S.; AHMAD S.; SINGH, G.N. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni - A Review. **Indian Journal Natural of Products and Resources**, v. 1, p. 267–286, 2010.

MODI, A.; LITORIYA, N.; PRAJAPATI, V.; RAFALIA, R.; NARAYANAN, S. Transcriptional profiling of genes involved in steviol glycoside biosynthesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni during plant hardening. **Developmental Dynamics**, v. 243, p. 1067–1073, 2014.

MOHAMED, A. A. A.; CEUNEN, S.; GEUNS, J. M. C.; VAN DEN ENDE, W.; DE LEY, M. UDP-dependent glycosyltransferases involved in the biosynthesis of steviol glycosides. **Journal Plant Physiology**, v. 168, p.1136–1141, 2011.

RAMIREZ-ESTRADA, K., VIDAL-LIMON, H., HIDALGO, D., MOYANO, E., GOLENIOSWIKI, M., CUSIDÓ, R.M., PALAZON, J. Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. **Molecules**, v.21 (2), 182, 2016.

WANG, A.L., LIN, C. The Effect of Paclobutrazol on Physiological and Biochemical Changes in the Primary Roots of Pea. **Journal of Experimental Botany**, v. 43, p. 1367–1372, 2016.

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