

## INFLUÊNCIA DE GENES CYP707A NO CONTEÚDO DE ÁCIDO ABCSÍCICO EM FRUTOS DE MORANGO

ULI TRINDADE DE ALMEIDA<sup>1</sup>; HUGO CARLOS BOLZON GONZALES<sup>2</sup>;  
VANESSA GALLI<sup>3</sup>; CESAR VALOMOR ROMBALDI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – UFPel – ulialmeida94@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – UFPel – hugocarlos.bg@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – UFPel – vane.galli@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – UFPel – cesarvrf@ufpel.edu.br

### 1. INTRODUÇÃO

O morangueiro é uma planta herbácea pertencente ao gênero *Fragaria* da família Rosacea. Seu pseudofruto, popularmente conhecido como fruto, possui grande apelo frente ao consumidor devido suas características como, aroma, cor sabor e textura, sendo considerado fonte de vitaminas, minerais e compostos antioxidantes, devido seus elevados teores de antocianinas e compostos fenólicos (Erkan et al., 2008).

O incremento nos teores de compostos que possam proporcionar propriedades funcionais nos frutos tem sido alvo de diversos estudos em virtude de seus efeitos benéficos, sequestrando radicais livres no nosso organismo e auxiliando no combate ao envelhecimento precoce das células, suscetibilidade a infecções, aumento da atividade antiinflamatória, dentre outros. Os principais compostos presentes no morango com este potencial são os ácidos fenólicos, os flavonóides e as antocianinas.

Além do crescente interesse na possibilidade de aumentar o conteúdo de compostos funcionais, o sistema de produção de morango, em especial as etapas de transporte e comercialização sofrem ainda graves perdas devido às características sazonais de produção, ao curto período de maturação e a baixa resistência mecânica dos frutos. Neste contexto, estudos que visam uma melhor compreensão sobre o processo de maturação em frutos tem sido foco de inúmeros projetos de pesquisa (MAINARDI et al., 2006; JIA et al., 2011; JIA et al., 2013).

A classificação dos frutos ocorre conforme seus padrões de respiração e produção de etileno, considerados climatéricos ou não climatéricos. Os frutos climatéricos, como banana e tomate, mostram um elevado aumento na produção de etileno em associação com o acréscimo das taxas de respiração durante o processo de amadurecimento, sendo estabelecidas as vias de regulação e sinalização (Mainardi et al., 2006). Em contraponto os frutos não climatéricos como morango e uva, não oferecem esse aumento na taxa respiratória, tampouco responsiva ao etileno durante a maturação (Jia et al., 2011), sendo que seus mecanismos moleculares e que regulam o amadurecimento ainda não estão consolidados. Entretanto, é demonstrado que tanto frutos climatéricos quanto não climatéricos, durante sua maturação, apresentam um aumento no conteúdo de Ácido Abscísico (ABA) (Li et al., 2011), mostrando-se assim, uma possível alternativa para o desenvolvimento de um processo de controle da maturação de frutos não climatéricos.

Em morangos, até o momento foram identificados três genes da família *NCED* (codifica para uma enzima chave na biossíntese de ABA), tendo a relação da maturação do gene *FaNCED1* estudado quanto à influência no acúmulo de ABA (Jia et al., 2011). A relevância desse hormônio acontece devido à

possibilidade de apresentar função significativa na regulação e amadurecimento, uma vez que sua aplicação exógena pode influenciar o amadurecimento dos frutos, enquanto o silenciamento da transcrição de *FaNCED1* ocasiona retardo no amadurecimento devido a diminuição do conteúdo de ABA (Chen et al., 2011; Jia et al., 2011).

De modo geral, o ABA ativo é rapidamente catabolizado através das duas rotas principais: a degradação oxidativa, catalisada pela enzima ABA-8-hidroxilase (CYP707A), formando ácido faseico (PA), o qual é convertido a ácido dehidrofaseico (DPA); ou por meio da inativação por glicosilação, catalisada pela enzima ABA-glucosiltransferase (ABA-GTase) formando ABA-glucosileter (ABA-GE) ou ABA-glucosilester (ABA-GS), sendo essa reação suscetível de reversão sendo a desconjugação catalizada pela enzima  $\beta$ -glucosidase (BG). Apesar do conhecimento da existência desta via, o envolvimento de *FaBGs* e de *FaCYP707A* no amadurecimento de frutos de morango ainda necessita ser esclarecido.

Este estudo teve como objetivo caracterizar a expressão de membros da família gênica *CYP707A* por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) e avaliar a produção de ABA, PA e DPA durante o desenvolvimento de frutos de morango.

## 2. METODOLOGIA

A coleta das amostras ocorreu com aproximadamente 15 frutos de morango de seis estágios de maturação, coletados de cultivo em campo. Estes frutos foram separados em três pools, sendo imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises.

A quantificação de ABA, DPA e PA foi realizada em HPLC-MS/MS (cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massas) conforme Perin (2016) (Perin et al., 2018).

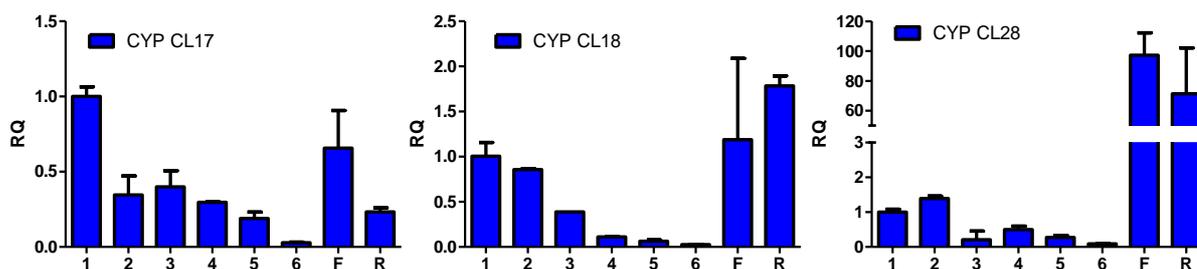
Para a avaliação da expressão gênica, os frutos morangos coletados foram macerados com auxílio de nitrogênio líquido, e o RNA total extraído com o método CTAB modificado (Messias et al., 2013). A quantificação do RNA foi realizada pelo protocolo Qubit Quantitation Platform que inclui o aparelho Qubit fluorômetro (Invitrogen™) e os reagentes do kit Quant-it (Invitrogen™). Os produtos de extração de RNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) em tampão TBE com o corante GelRed™, com intuito de avaliar a qualidade do RNA extraído. A síntese de cDNA foi realizada utilizando a enzima transcriptase reversa M-MLV e oligo(dt), conforme fabricante (Invitrogen™).

Oligonucleotídeos sintéticos foram projetados com auxílio do programa Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3\\_code.html](http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_code.html)) de modo a produzir amplicons com tamanho entre 100 e 250 pares de bases e visando uma temperatura de hibridização em torno de  $60^{\circ}\text{C}$ . A expressão dos genes foi avaliada através da técnica de RT-qPCR, padrão ouro para análise de expressão genes (Bustin et al., 2009). Reações de RT-qPCR foram feitas em um volume final de 20  $\mu\text{L}$ , compostas de 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra de cDNA diluída 100 vezes e mais 10  $\mu\text{L}$  de mix contendo 2  $\mu\text{L}$  de 1x PCR buffer, 1,5  $\mu\text{L}$  de 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2  $\mu\text{L}$  dNTPs 5 mM, 0,2  $\mu\text{L}$  do par de oligonucleotídeos 10  $\mu\text{M}$ , 2,0  $\mu\text{L}$  de SYBR green (1:100,000 - Molecular Probe, OR, USA) e 0,25 U de Platinum Taq DNA polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ ) (Invitrogen, CA, USA). As reações foram realizadas em termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems) utilizando as seguintes condições: 5' a  $95^{\circ}\text{C}$  seguidos por 40 ciclos de 1' a  $95^{\circ}\text{C}$ , 1' a  $50^{\circ}\text{C}$ , 1' a  $72^{\circ}\text{C}$  e extensão final de 7' a  $72^{\circ}\text{C}$ . Após, as amostras foram aquecidas de 55 até  $99^{\circ}\text{C}$  com um aumento de 0,1  $^{\circ}\text{C}/\text{s}$  para adquirir a curva de desnaturação dos produtos

amplificados, utilizada para verificar a especificidade dos oligos. Para os cálculos de expressão relativa dos genes, foi utilizado o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  através da comparação da expressão com genes previamente caracterizados no nosso laboratório (Galli et al., 2015) como normalizadores (*housekeeping genes*) para essas condições em morango.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ABA desempenha um papel vital no desenvolvimento e amadurecimento de frutos, bem como na adaptação ao estresse ambiental, e é modulado por um equilíbrio dinâmico entre a biossíntese e o catabolismo em plantas superiores (Jia et al., 2013). A via de biossíntese do ABA em morango é bem compreendida (Jia et al., 2011; 2013); no entanto, são limitadas as pesquisas acerca das vias de reativação e catabolismo. As enzimas CYP707A são consideradas chave na oxidação e catabolismo do ABA. No presente estudo, três cópias de CYP707A previamente identificadas pelo nosso grupo de pesquisa (GONZALEZ, 2018) foram avaliadas quanto ao nível de expressão. As três cópias do gene CYP707A mostraram expressão decrescente ao longo do desenvolvimento dos frutos, sendo que CYP CL17 apresentou valores de expressão superiores em frutos imaturos, enquanto que CYP CL18 e CYP CL28 apresentam um papel mais significativo em folhas e raízes (Figura 1).



**Figura 1.** Expressão de genes da família gênica CYP707A que codifica para enzima ABA-8-hidroxilase da rota biossintética do ácido abscísico em morango. 1-6, estágios de desenvolvimento de frutos de morango, conforme Figura 1; F, folha; R, raiz; RQ, expressão relativa. Os dados representam a média±desvio padrão com base em três réplicas biológicas.

De acordo com a Figura 2, DPA é o metabólito mais abundante, seguindo de ABA e PA. O conteúdo de PA diminui ao longo do desenvolvimento dos frutos; enquanto que o conteúdo de DPA aumentou no segundo estágio, decaiu no terceiro estágio e novamente aumentou até o último estágio avaliado. Já o conteúdo de ABA aumenta ao longo do desenvolvimento do fruto, sendo que este aumento apresentou correlação negativa com a expressão dos genes CYP707A, indicando que estes genes desempenham papel importante na regulação do conteúdo de ABA nestes frutos. Isso pode sugerir que as duas vias do metabolismo de ABA, biossíntese e catabolismo, são importantes na determinação do nível endógeno de ABA.

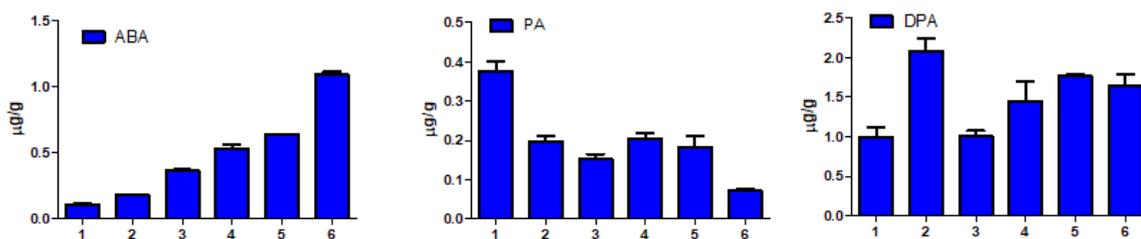


Figura 2: Conteúdo de ABA e DPA durante o desenvolvimento de frutos de morango

#### 4. CONCLUSÕES

Através da comparação do perfil transcricional de genes FaCYP707A com o conteúdo de ABA, PA e DPA em morango, foi possível concluir que estes genes apresentam função relevante na regulação nos níveis destes metabólitos durante o desenvolvimento de frutos de morango, sendo o DPA o mais abundante destes metabólitos. Futuros estudos serão direcionados no sentido de validar o papel destes genes no processo de amadurecimento de frutos de morango através do silenciamento individual de cada um destes genes.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ERKAN, M.; WANG, M. Y.; WANG, C. Y. Effect of UV treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activity and decay in strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.48, p.163-171, 2008.
- GALLI, V. Validation of reference genes for accurate normalization of gene expression for real time-quantitative PCR in strawberry fruits using different cultivars and osmotic stresses. **Gene**, v. 554, n. 2, p. 205-214, 2015.
- GONZALEZ, H. **Genes CYP707A em *Fragaria x ananassa* Duch: identificação e caracterização funcional sob condições de estresse salino e aplicação de ácido abscísico**. 2018. Tese de Conclusão de Curso – Bacharelado em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.
- JIA, H.F.; CHAI, Y.M.; LI, C.L.; LU, D.; LUO, J.J.; QIN, L.; SHEN, Y.Y. Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. **Plant Physiology**, v.157, p.188–199, 2011.
- JIA, H.; WANG, W.; SUN, M.; LI, B.; HAN, Y.; ZHAO, Y.; LI, X.; DING, N.; LI, C.; JI W.; JIA, W. Sucrose functions as a signal involved in the regulation of strawberry fruit development and ripening. **New Phytologist**, v.198, p.453–465, 2013.
- LI, C.; JIA, H.; CHAI, Y.; SHEN, Y. Abscisic acid perception and signaling transduction in strawberry - A model for non-climacteric fruit ripening. **Plant Signaling & Behavior**, v.6, p.1950-1953, 2011.
- MAINARDI, J. A.; PURGATTO, E.; VIEIRA JUNIOR, A.; BASTOS, W. A.; CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J. R. O.; LAJOLO, F. M. The effects of ethylene and 1-MCP on gene expression and activity profile of alpha-1,4-glucan-phosphorylase during banana ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.7294-7299, 2006.
- MESSIAS, R. S; GALLI, V.; SILVA, S. D. A.; SCHIRMER, M. A.; ROMBALDI, C. V. Micronutrient and functional compounds biofortification of maize grains. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2013.
- PERIN et al., Extraction and Quantification of Abscisic Acid and Derivatives in Strawberry by LC-MS. **Food Analytical Methods**, v.11, p.2547-2552, 2018.