

NÍVEIS TRANSCRICIONAIS DE GENES *FaCDPKs* DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS DE MORANGO (*Fragaria x ananassa* Duch.)

JULIANA NOALES RODRIGUES¹; AUDREY CHRISTINA NASCIMENTO²;
ROSANE LOPES CRIZEL²; VANESSA GALLI³

¹Universidade Federal de Pelotas – juliananoales@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – audreydadycn@hotmail.com

Universidade Federal de Pelotas – rosanecrizel1@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – vane.galli@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria x ananassa*) é um fruto rico em compostos bioativos, com destaque para o ácido ascórbico e compostos fenólicos, dentre esses os ácidos fenólicos e as antocianinas (GIAMPIERI et al., 2012).

As características sensoriais e funcionais dos frutos de morango são influenciadas pelo processo de amadurecimento. Embora as reações envolvidas na maturação de morangos ainda não estejam completamente caracterizadas, há evidências que o hormônio ácido abscísico (ABA) pode apresentar um papel significativo na regulação do amadurecimento desses frutos (AYUB et al., 2016a). O ABA também está envolvido em resposta ao estresse osmótico, atuando no fechamento estomático, bem como na indução da via metabólica de fenilpropanóides e no acúmulo de compostos antioxidantes (CHEN et al., 2016).

O cálcio (Ca^{2+}) é um mensageiro secundário de suma importância nas plantas, desempenhando diversas funções, conforme o estímulo e fase de desenvolvimento. Algumas proteínas atuam como sensores de Ca^{2+} , conferindo especificidade, atuando em resposta a estímulos de sinalização. Dentre essas proteínas, estão as proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs), que são codificadas por famílias multigênicas e atuam fosforilando compostos alvo (ASANO et al., 2012).

Estudos apontam que algumas cópias de CDPKs estão envolvidas na tolerância a estresses abióticos regulando positivamente ou negativamente a sinalização de ABA e reduzindo o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ASANO et al., 2012a). Além disso, dentre os vários alvos fosforilados pelas CDPKs, destaca-se a fenilalanina amônia liase (PAL), enzima de entrada na rota de fenilpropanóides, sugerindo que CDPKs desempenham importantes papéis no processo de maturação (Cheng et al., 2001).

Vários estudos têm sido feitos a fim de elucidar a composição de antocianinas em morango; no entanto, ainda não são completamente caracterizados em relação aos pigmentos de menor tamanho (SILVA et al., 2007). Antocianinas presentes em morango derivam da pelargonidina (Pg) e agliconas cianidina (Cy) (MAZZA & MINIATI, 1993). Sendo que a principal antocianina nos frutos é a Pg 3-glucosídeo (Pg 3-gluc), como inicialmente identificado por Robinson & Robinson (1931).

Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis transcricionais de *FaCDPKs* e a quantificação de antocianinas durante o desenvolvimento de frutos de morango.

2. METODOLOGIA

2.1. Obtenção das amostras

A fim de avaliar a expressão dos genes *FaCDPKs* e a quantificação de antocianinas durante o desenvolvimento destes frutos, foram coletadas de um cultivo a campo seis amostras de frutos de morango em diferentes estádios de desenvolvimento (7, 14, 18, 21, 24 e 28 dias pós-antese). Após a coleta, os frutos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C até o momento das análises.

2.2. Avaliação da expressão de *FaCDPKs* putativas por PCR em tempo real

O isolamento do RNA total, a síntese de cDNA e a amplificação por RT-qPCR foram realizados conforme descrito por Galli et al. (2015). Oligonucleotídeos sintéticos foram projetados com auxílio do programa Vector NTI11 (Invitrogen) de modo a produzir amplicons com tamanhos entre 100 e 250 pares de bases e visando uma temperatura de hibridização em torno de 60 °C. A expressão dos genes foi avaliada através da técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR), utilizando os genes de referência *PIRUV_DESCARB* (piruvato descarboxilase), *DBP* (proteína de ligação ao DNA), *HISTH4* (histona H4), conforme proposto por Galli et al. (2015). Os dados da expressão relativa foram calculados de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta C_q}$ e são apresentados como expressão relativa. A análise foi realizada para quatro repetições biológicas e três replicatas analíticas.

2.3. Quantificação de antocianinas

Para quantificar as antocianinas individuais, pesou-se 1 g de amostra seca e suspendeu-se em 10 mL de HCL a 0,1% em metanol. A mistura foi agitada durante 3 h e centrifugada a 7000 rpm durante 10 min, e uma alíquota de 10 µL foi então injetada em um sistema cromatográfico, que consistia de um sistema HPLC-Shimadzu com injetor automático, detector UV-520 nm, coluna de fase reversa RP-18 CLC-ODS (5 mm, 46 mm x 150 mm). A fase móvel consistiu de uma eluição gradiente com solução aquosa de ácido acético (98:2 % v/v) (A), 100% de metanol (B) e 100% de acetonitrila (C), com um fluxo de 0,8 mL min⁻¹. O total tempo de corrida foi de 40 min. Para identificação e quantificação foram utilizados padrões comerciais (Sigma Aldrich e Extrasynthese) de pelargonidina 3-O glicosídeo, cianidina 3-O-glicosídeo e pelargonidina 3-O-rutinosídeo. Os resultados foram expressos em µg kg⁻¹ de frutos em base seca.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da RT-qPCR em diferentes estádios de desenvolvimento dos frutos mostram que o maior acúmulo de transcritos *FaCDPK3* e *FaCDPK4* ocorreu no estágio final de maturação (E6), enquanto que *FaCDPK10* apresentou maiores picos de expressão nos estádios E2 e E6, e os demais genes mostraram maiores níveis transcricionais nos estádios iniciais (E1 ou E2) (Figura 1).

Esses resultados estão de acordo com os descritos por Llop-tous (2002), que observou que a *FaCDPK1* (cópia previamente descrita e depositada no banco de dados Genbank) não foi detectada em frutos jovens. No entanto, os níveis de transcritos se acumularam quando os frutos se tornaram brancos. Além disso, a expressão desse gene demonstrou níveis crescentes durante a maturação dos

frutos, coincidindo com o aumento nos níveis de fenilpropanóides. No presente estudo, este aumento transcricional durante a maturação é observado para *FaCDPK3*, tendo sido a única cópia a demonstrar este comportamento (Figura 1), o qual coincidiu com o aumento no conteúdo de antocianinas (Figura 2), sugerindo que esta cópia desempenha importante papel no processo de maturação de frutos de morango.

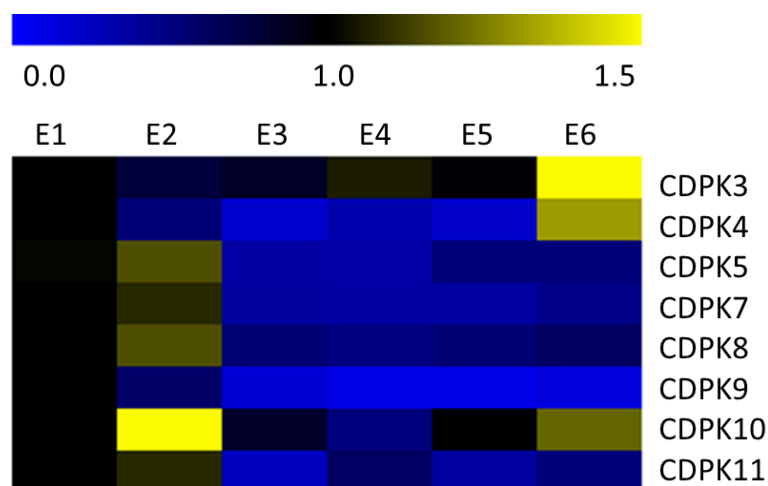


Figura 1: Mapa de cor (*Heat map*) mostrando a expressão das proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPK) durante os estádios de desenvolvimento dos frutos de morango. E1- 7 dias, E2- 14 dias, E3- 18 dias, E4- 21 dias, E5- 24 dias, E6- 28 dias pós-antese.

O conteúdo de pelargonidina 3-O glicosídeo, cianidina 3-O glicosídeo e pelargonidina 3-O rutinosídeo aumenta ao longo do desenvolvimento do fruto, sendo a pelargonidina 3-O glicosídeo a antocianidina predominante (Figura 2). Estes resultados se assemelham aos obtidos por Silva et al. (2007), os quais detectaram as antocianinas pelargonidina -3,5-diglicosídeo, Cianidina 3-rutinosídeo, Cianidina 3-malonoilglicosil-5-glicosídeo, pelargonidina 3-malarglicosídeo e pelargonidina biosídeos acilados, utilizando ácido acético, em morangos da cultivar *Camarosa*; sendo as porcentagens de pelargonidina 3-glicosídeo (77-78%), as mais altas, e pelargonidina 3-rutinosídeo (11-13%), as mais baixas.

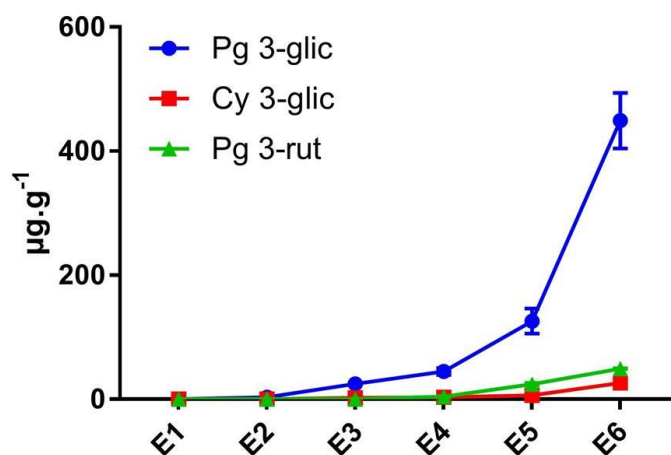


Figura 2. Conteúdo de antocianinas em frutos de morango.

4. CONCLUSÕES

O presente estudo possibilitou verificar um aumento da expressão da cópia *FaCDPK3* ao longo do desenvolvimento de frutos de morango da cultivar *Camarosa*, o qual coincidiu com o aumento crescente na quantidade de antocianinas nestes frutos. Desta forma, é possível sugerir que este gene pode estar envolvido no processo de maturação deste fruto.

5. REFERÊNCIAS

ASANO, T. et al. CDPK-mediated abiotic stress signaling. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 7, p. 817–821, 2012a.

AYUB, R. A. et al. Absciscic acid involvement on expression of related gene and phytochemicals during ripening in strawberry fruit *Fragaria* ?? ananassa cv. Camino Real. **Scientia Horticulturae**, v. 203, p. 178–184, 2016a.

CHEN, J. et al. Transcriptome profiling of postharvest strawberry fruit in response to exogenous auxin and absciscic acid. **Planta**, v. 243, n. 1, p. 183–197, 2016.

CHENG, S. H. et al. Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active Arabidopsis CDPK expressed in maize protoplasts. **FEBS Letters**, v. 503, n. 2-3, p. 185–188, 2001b.

GALLI, V. et al. 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.

GIAMPIERI, F. et al. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. **Nutrition**, v. 28, n. 1, p. 9–19, 2012.

LLOP-TOUS, I. Characterization of a strawberry cDNA clone homologous to calcium-dependent protein kinases that is expressed during fruit ripening and affected by low temperature. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 378, p. 2283–2285, 2002

MAZZA, G. & Miniati, E. Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. **Boca Raton, FL: CRC Press In**, 1993.

ROBINSON, G. M. & Robinson, M. A. Survey of anthocyanins I. **Biochemical Journal**, 25, 1687-1705, 1931.

SILVA, Fátima Lopes da et al. Anthocyanin pigments in strawberry. **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l.], v. 40, n. 2, p.374-382, mar. 2007. Elsevier BV.