

Regulação da biossíntese de ácido L-ascórbico durante o desenvolvimento de frutos de morangos (*Fragaria x ananassa* Duch.)

Pedro Reisser¹; Rosane Crizel²; Vanessa Galli³; Cesar Valmor Rombaldi⁴

¹ Universidade Federal de Pelotas – reisser.pedro@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – rosanecrizel@gmail.com

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

⁴ Universidade Federal de Pelotas – cesarvrf@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) é uma hortaliça de clima temperado com grande apelo frente ao consumidor devido seu pseudofruto possuir uma coloração vermelha brilhante, odor típico, textura macia e sabor levemente acidificado. O morango é considerado fonte de vitaminas, minerais e compostos antioxidantes, devido a seus elevados teores de antocianinas, compostos fenólicos e vitamina C (ERKAN et al., 2008).

O L- ácido ascórbico (AsA) composto de seis carbonos, derivado da glicólise, é um ácido fraco, solúvel em água e é fundamental para a saúde humana, sendo conhecido como vitamina C. Esta, atua como uma potente molécula antioxidante, participa da síntese do colágeno, e no funcionamento de neurotransmissores e hormônios (Mann, Jim; Truswell, Stewart, 2017). Nas plantas, o ácido ascórbico participa de uma variedade de processos, incluindo fotossíntese, fotoproteção, crescimento da parede celular, expansão celular, resposta a estresses ambientais, síntese de etileno, ácido giberélico, antocianinas e hidroxiprolina (CONKLIN; BARTH, 2004).

Quando plantas sofrem estresse bióticos ou abióticos há a formação de espécies reativas de oxigênio, as quais são danosas para células. Por isso, enzimas como APx (L-ascorbato peroxidase) e LAC (L-ascorbato oxidase) usam o AsA para neutralizar os radicais em formas inertes, e com isso acabam transformando-o em monodehidroascorbato e dehidroascorbato, respectivamente, que são formas oxidadas desta vitamina. O AsA oxidado então pode sofrer redução pela monodehidroascorbato redutase (MDHAR) e pela dehidroascorbato redutase (DHAR) em reações que utilizam NADPH, para se tornar AsA novamente, promovendo assim a sua reciclagem (Alscher et al., 1997). Além da reciclagem do ascorbato, o conteúdo de ASA nas células vegetais é determinado pela sua síntese *de novo*, a qual ocorre devido a ação da enzima L-galactono-1,4-lactone dehidrogenase (GLDH), que utiliza L-galactona-1,4-lactona para a geração de AsA.

Sabendo que os níveis transcricionais dos genes que codificam para as enzimas GLDH, MDHAR e DHAR pode influenciar no conteúdo de AsA em células vegetais, e levando em consideração que nosso grupo de pesquisa dispõe de um banco de dados de mRNAseq obtida de frutos de morango da cultivar Camarosa, o presente trabalho visou identificar sequências codificadoras destas três enzimas e determinar a expressão destes genes e o conteúdo de AsA durante o desenvolvimento de frutos de morango cv. Camarosa, com intuito de entender melhor o mecanismo de acúmulo de AsA nestes frutos.

2. METODOLOGIA

2.1 Identificação de sequências codificadoras de MDHAR, DHAR e GLDH em morango

As sequências codificadoras de MDHAR, DHAR e GLDH foram obtidas através da busca por sequências homólogas em um banco de mRNAseq *in house* com

sequências disponíveis nos bancos de dados proteicos online NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Swiss-Prot (<http://www.expasy.ch/sprot/>). Para tanto, foi utilizado o programa BLASTX, com valor $e\text{-value} < 1e^{-6}$. Posteriormente, os contigs do banco de mRNAse *in house* que apresentaram homologia com sequências previamente descritas, foram caracterizados quanto às possíveis fases de leitura aberta (do inglês, *open reading frame*, ORF), utilizando a ferramenta *ORFfinder* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). A maior ORF foi selecionada e confirmada quanto a sua identidade utilizando a ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.2 Expressão de genes *MDHAR*, *DHAR* e *GLDH* durante o desenvolvimento de frutos de morango

Para avaliar o acúmulo dos transcritos de *MDHAR*, *DHAR* e *GLDH* foram utilizados sete estádios de desenvolvimento do fruto, categorizado por Jia *et al.*, 2011 como 7, 14, 18, 21, 23, 25, e 28 dias após a antese. Para isso os frutos colhidos foram imediatamente congelados e posteriormente macerados com nitrogênio líquido. A extração de RNA total foi realizada utilizando método de CTAB modificado (Messias *et al.*, 2013) e sua avaliação de quantidade foi realizada conforme Qubit Quantitation Platform. Oligonucleotídeos sintéticos foram projetados com auxílio do programa Vector NTI11 (Invitrogen) de modo a produzir amplicons com tamanho entre 100 e 250 pares de bases e com 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 a metodologia descrita em Galli *et al.* (2016). Para os cálculos de expressão relativa dos genes, foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando os genes *UBI* (ubiquitina), *DBP* (proteína ligadora de DNA) e *H4* (histona H4), de acordo com Galli *et al.* (2015).

2.3 Quantificação do ácido L- ascórbico

O conteúdo de ácido L- ascórbico foi determinado pela metodologia descrita por Vinci *et al.* (1995), utilizando HPLC (cromatografia líquida de alta performance).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise por homologia detectou a presença de uma cópia de *GLDH* (582 aminoácidos), duas cópias de *MDHAR* (*MDHAR1* com 492, *MDHAR2* com 478 aminoácidos) e três cópias de *DHAR* (*DHAR1*- 266, *DHAR2*- 214, e *DHAR3*- 213 aminoácidos) no banco de mRNAseq analisado.

A análise da expressão relativa dos transcritos *GLDH*, gene que participa da síntese *de novo* de AsA, revelou que houve aumento na sua expressão ao longo do desenvolvimento. Para o gene *MDHAR*, que converte o MDHA novamente em AsA, a cópia *MDHAR2* mostrou um crescente aumento na sua expressão ao longo do desenvolvimento do fruto, enquanto que a cópia *MDHAR1* apresentou níveis transcricionais similares nos primeiros estádios de desenvolvimento, aumentando apenas nos últimos estádios. Com relação, às cópias de *DHAR* que participam da reciclagem de AsA a partir de DHA, as análises mostraram que *DHAR3* diminui progressivamente o acúmulo de transcritos ao longo do desenvolvimento dos frutos. Já as cópias *DHAR1* e a *DHAR2* sofreram uma redução de transcritos até o 5º estádio, 23 dias após antese, e subsequentemente aumentaram a expressão nos estádios finais de desenvolvimento do fruto (Figura 1).

Chen *et al.*, 2003 mostraram que a superexpressão do gene *DHAR* em tabaco incrementou o conteúdo de AsA em até quatro vezes. Sultana *et al.*, 2012 ao superexpressar *MDHAR* em arroz, obteve um aumento na tolerância a salinidade

e um incremento na produção. Em tomate, MDHAR também apresenta importante papel em condições de estresse, através da manutenção dos níveis de ascorbato. Além disso, uma maior atividade de MDHAR nos frutos está relacionado a diminuição da perda de firmeza causada por dano pelo frio (STEVENS, 2008).

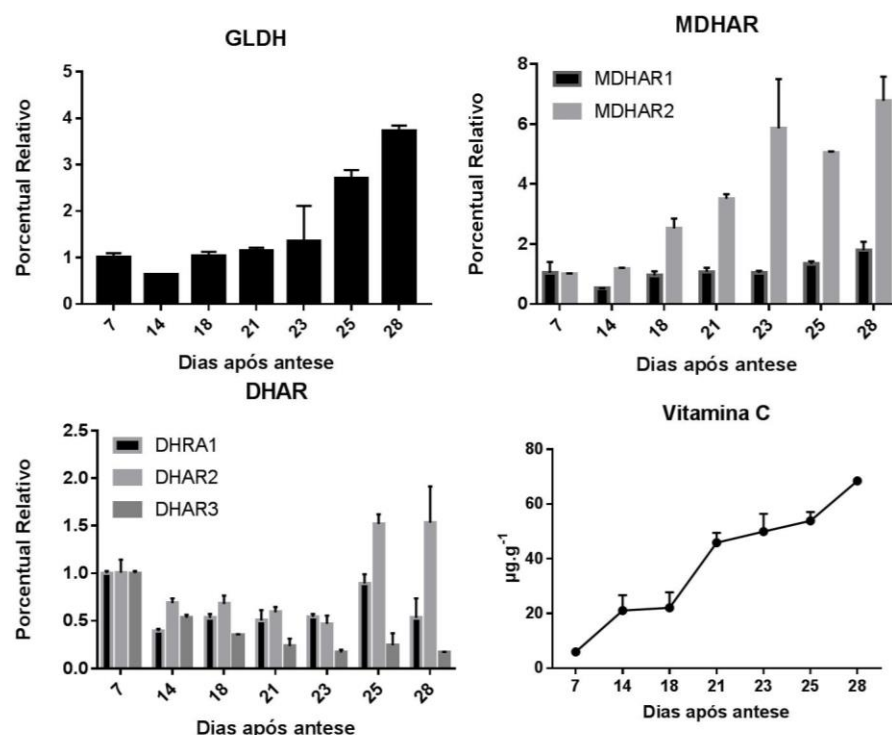


Figura 1. Expressão dos genes *MDHAR*, *DHAR* e *GLDH* e o conteúdo de ácido L-ascórbico durante o desenvolvimento dos frutos de morango

Liu *et al.*, 2011 realizou supressão e silenciamento de *GLDH* e os resultados demonstram que os mutantes silenciados apresentaram perda de clorofila, menor teor da proteína Rubisco 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase, fundamental para a respiração celular, acarretando em uma taxa mais lenta de crescimento das plantas. Já o aumento da expressão de *GLDH* manteve altos níveis de clorofila, proteína Rubisco e uma maior taxa de fotossíntese, resultando em maior produção de sementes.

O desenvolvimento e amadurecimento de frutos de morango é um processo complexo, uma vez que sofre muitas mudanças fisiológicas e químicas durante o amadurecimento. Neste trabalho, observou-se um aumento no acúmulo de AsA nos frutos ao longo do processo de maturação, conforme a Figura 1. De forma concomitante, os níveis de transcritos de *GLDH* e *MDHAR2* aumentam ao longo do desenvolvimento dos frutos, e o gene *DHAR3* também apresentou maior expressão ao final do desenvolvimento do fruto, confirmando o importante papel desses genes no acúmulo de AsA.

4. CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu entender melhor a importancia dos genes *MDHAR*, *DHAR* e *GLDH* nos estadios desenvolvimento, e sua influencia no acúmulo do ascorbato no morango (*Fragaria x ananasa* Duth.). Os genes *GLDH*, *MDHAR2* e *DHAR3* tiveram níveis elevados de transcritos ao final do desenvolvimento do fruto, sendo os genes *GLDH* e *MDHAR2* os que apresentaram correlação positiva com o acúmulo de AsA durante o desenvolvimento do fruto. Isso indica que esses genes desempenham uma

importante papel na regulação do AsA. Estudos futuros serão necessários a fim de elucidar a regulação de outros transcritos dessa complexa rota metabólica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSCHER, Ruth G.; DONAHUE, Janet L.; CRAMER, Carole L. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. **Physiologia Plantarum**, v. 100, n. 2, p. 224-233, 1997.

CHEN, Zhong et al. Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 6, p. 3525-3530, 2003.

CONKLIN, P. L.; BARTH, C. Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. **Plant Cell Environment**, v.27, p. 959–970, 2004.

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., MESSIAS, R. S., PERIN, E. C., BOROWSKI, J. M., BAMBERG, A. L., ROMBALDI, C.V. Mild salt stress improves strawberry fruit quality. **LWT - Food Science and Technology**, v.73, p. 693-699, 2016.

GALLI, V., BOROWSKI, J. M., PERIN, E. C., MESSIAS, R. S., LABONDE, J., PEREIRA, I. S., ROMBALDI, C.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, p.205-214, 2015.

LIU, Yonghai; YU, Le; WANG, Ruozhong. Level of ascorbic acid in transgenic rice for L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase overexpressing or suppressed is associated with plant growth and seed set. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 4, p. 1353-1363, 2011.

JIA, H., CHAI, Y., LI, C., LU, D., LUO, J., QIN, L., SHEN, Y. Absciscic Acid Plays an Important Role in the Regulation of Strawberry Fruit Ripening. **Plant Physiology**, v. 157, n. 1, p. 188-199, 2011.

MANN, Jim; TRUSWELL, Stewart (Ed.). **Essentials of human nutrition**. Oxford University Press, 2017.

STEVENS, R. et al. Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress. **Plant, cell & environment**, v. 31, n. 8, p. 1086-1096, 2008.

SULTANA, Shahanaz et al. Overexpression of monodehydroascorbate reductase from a mangrove plant (AeMDHAR) confers salt tolerance on rice. **Journal of plant physiology**, v. 169, n. 3, p. 311-318, 2012.

VINCI, Giuliana et al. Ascorbic acid in exotic fruits: a liquid chromatographic investigation. **Food Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 211-214, 1995.