

Ascorbato peroxidases em morangos (*Fragaria x ananassa* Duch.): caracterização de regiões codificadoras e do padrão de expressão relativa no desenvolvimento dos frutos

Pedro Lopes Reisser¹; Audrey Christina do Nascimento²; Hugo Carlos Bolzon³;
Isabel Lopes Vighi⁴; Vanessa Galli⁵; Cesar Valmor Rombaldi⁶

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

²Universidade Federal de Pelotas – audreydadyen@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – hugocarlos.bg@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – isavighi@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – vane.galli@yahoo.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – cesarvrf@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) é um pseudofruto de clima temperado com grande apelo frente ao consumidor devido à sua 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 pró-vitamina C (ERKAN et al., 2008).

O ácido ascórbico (pró-vitamina C) possui importante atividade biológica sob reações de estresse oxidativo, tendo seu acúmulo alterado em função do genótipo e das condições de cultivo, especialmente em função de agentes estressantes abióticos (CORDENUNSI et al., 2005). Nas plantas, o ácido ascórbico participa em várias vias metabólicas, incluindo fotossíntese, fotoproteção, crescimento da parede celular, expansão celular, resposta a estresses ambientais e síntese de etileno, giberelina, antocianinas e hidroxiprolina (CONKLIN; BARTH, 2004). No metabolismo desse fitoquímico, a enzima ascorbato peroxidase (APx) é importante, possuindo uma correlação negativa com a produção do composto antioxidante, uma vez que usa duas moléculas de ácido ascórbico para reduzir H₂O₂ em água, transformando assim em monodehidroascorbato (MDHA) (CRUZ-RUS et al., 2011).

Embora existam sequências gênicas que codificam para APx em morango, disponíveis em bancos de dados públicos, por se tratar de uma família multigênica, acredita-se que ainda existam cópias a serem identificadas. Nesse contexto, o presente trabalho traz como proposta identificar as sequências que codificam para APx em frutos de morango da cultivar Camarosa e investigar o padrão de expressão realtiva destes genes em diferentes estádios de amadurecimento de frutos de morango, buscando novos conhecimentos sobre o acúmulo do ácido ascórbico e sua relação com diferentes APxs.

2. METODOLOGIA

2.1 Identificações de sequências codificadoras de APXs em morango

Cinco sequências APx de *Fragaria x ananassa* (mRNAs ou genes) foram obtidas do banco de sequências GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), conforme segue: AF159633.1, AF158654.1, AF158653.1, KC433895.1, AF158652.2. Estas sequências foram utilizadas como 'iscas' para a busca de sequências homólogas em um

transcriptoma 'in house' obtido a partir de amostras de frutos da cultivar Camarosa. Esta estratégia foi utilizada a fim de identificar com precisão quais sequências e qual a composição nucleotídica dos genes *APx* presentes nos frutos desta cultivar. Para tanto, foi utilizada a ferramenta *MultiBlast*, do programa *CLC Genomics Workbench 10* (Quiagen), utilizando os parâmetros padrões do programa. Posteriormente, os contigs do transcriptoma que apresentaram homologia com sequências *APx*, 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 *APxs* durante o amadurecimento de frutos de morango

Foram escolhidas quatro sequências *APx* para avaliar seus níveis de expressão ao longo do desenvolvimento do fruto. Para tanto, frutos de morango de seis estádios de amadurecimento, conforme Figura 1A, foram coletados de um cultivo a campo. Estes frutos foram separados em três grupos, sendo imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o momento das análises. Estes frutos 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 extraído 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 (Tris-ácido bórico-EDTA) 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 Vector NTI11 (Invitrogen) de modo a produzir amplicons com tamanho 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 quantitativo em tempo real (RT-qPCR), padrão ouro para análise de expressão gênica, utilizando a metodologia descrita em Galli et al. (2016). Para os cálculos de expressão relativa dos genes, foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando os genes *UBI* (ubiquitina), *DBP* (proteína ligadora de DNA) e *H4* (histona H4), de acordo com Galli et al. (2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação de sequências *APx* em morango

Para o desenho dos primers, foi analisado os contigs do transcriptoma em relação aos mRNAs do GenBank, usando um limiar de 80% de aceite, onde mais de um contig foi escolhido para a mesma sequência a fim de aumentar a especificidade dos primers. De acordo com a metodologia adotada, foi possível identificar quatro possíveis *APxs* em morango (*APx1*, *APx2*, *APx3* e *APx4*), utilizando como base os contigs citados no Quadro 1. A maior ORF foi obtida a partir do contig Locus_3552_Transcript_1/4, correspondendo à sequência *APx2*, com 448 pb (pares de base), enquanto que a menor foi proveniente do contig CL4595Contig2, com 258 pb, denominada *APx3*, sendo essa sugerida como

incompleta. No entanto, a utilização de um segundo contig, CL4595Contig3, permitiu obtermos a sequência completa da *APx3*. Além disso, é possível observar que todas as sequências apresentaram fase de leitura anti-senso.

Quadro 1. Sequências de ascorbato peroxidases (*APxs*) identificadas em morango

Gene	Abreviação	Contig	Comprimento da ORF (aa) ¹	Posição da ORF (nt) ²	Fase de leitura	Situação
L-ascorbate peroxidase 1	<i>APx1</i>	CL2712Contig2	321	985 -1950	-3	Completa
		CL2712Contig1	321	1048 -2013	-3	Completa
L-ascorbate peroxidase 2	<i>APx2</i>	Locus_3532_Transcript_1/4	448	189 -1535	-3	Completa
L-ascorbate peroxidase 3	<i>APx3</i>	CL4595Contig2	258	366 -1142	-3	Incompleta
		CL4595Contig3	285	459 -1316	-2	Completa
L-ascorbate peroxidase 3	<i>APx4</i>	CL9946Contig1	288	240 -1106	-2	Completa

3.2 Expressão gênica das sequências *APx* identificadas em morango

A análise da expressão relativa dos transcritos *APxs*, durante o crescimento e desenvolvimento dos frutos de morangos (Figura 1 B), revelou um distinto comportamento entre as cópias: *APx1*, *APx2* e *APx3* apresentaram aumento na suas expressões ao final do processo de amadurecimento dos frutos, enquanto que *APx4* reduz seus níveis de transcritos até o quinto estágio (IR), e subsequentemente aumenta a expressão nos estádios finais de desenvolvimento do fruto.

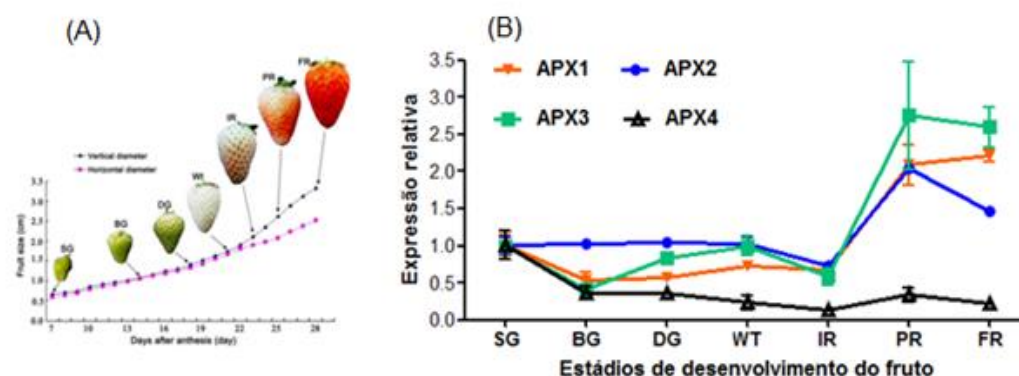


Figura 1. Crescimento e desenvolvimento de morangos em sete estádios: SG, BG, DG, Wt, IR, PR e FR (A). Expressão relativa de quatro cópias de *APx* ao longo do crescimento e desenvolvimento de morangos cv. Camarosa, nos sete estádios estudados.

Ao realizar uma RT-PCR semi-quantitativa, Yan-Xia, et al. (2011) observaram que a expressão de *FaAPX-c* (AF159630), em 28, morangos da cultivar Toyonaka, foi menor no estágio verde, aumentando gradualmente até o vermelho completo (a quantidade de expressão foi três vezes superior em comparação com o estágio verde), dados que corroboram com os apresentados nesse trabalho para *APx1*, *APx2* e *APx3*. Em pimentão (*Capsicum annuum*) também foi observado que os níveis de transcritos *APx* aumentam gradualmente conforme a maturação do fruto. Akhtar, Rab (2015) observaram uma redução no teor de ácido L-ascórbico durante o processo de maturação do morango, variando de 50.43 mg/100g no estágio rosa até 31.87 mg/100g no estágio vermelho. De acordo com estes dados, todas as *APx* de morango identificadas no presente estudo, em maior ou menor grau, mostraram uma relação inversa com o acúmulo de ácido L-ascórbico.

As razões explicativas desses resultados não estão evidenciadas neste trabalho, mas a hipótese é de que com o início e evolução da maturação dos morangos, conhecido como estádios em que o processo respiratório é acelerado (Jia et al., 2011), os morangos possam ter incrementado a demanda pelo sistema antioxidante químico, via o ácido L-ascórbico, incluindo as APXs. A mensuração da atividade enzimática e/ou a utilização de mutantes nessa característica podem ser usados para responder a essa questão.

4. CONCLUSÕES

Este estudo permitiu a identificação de quatro prováveis sequências de APxs em morango, bem como a caracterização de suas expressões relativas ao longo do crescimento e desenvolvimento do fruto, indicando uma correlação negativa dos níveis de transcritos com o conteúdo de L-ácido ascórbico descrito na literatura. Futuros estudos de genômica funcional permitirão compreender o papel destas sequências no acúmulo de ácido ascórbico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

CORDENUNSI, B. R.; GENOVESE, M. I.; NASCIMENTO, J. R. O.; HASSIMOTTO, N. M. A.; SANTOS, R. J.; LAJOLO, F. M. Effect of temperature on the chemical composition and antioxidant activity on three strawberry cultivars. **Food chemistry**, v. 91, p. 113 - 121, 2005.

CRUZ-RUS, E. Regulation of L-ascorbic acid content in strawberry fruits. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 12, p. 4191–4201, 2011.

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.

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.

PERKINS-VEAZIE, P. Growth and ripening of strawberry fruit. **Horticultural Reviews**, v. 17, p. 267-297, 1995.