TRANSCRIPTÔMICA DO MELÃO (*Cucumis melo*) vr. MELÃO AMARELO EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE AMADURECIMENTO VISANDO A COMPREENSÃO DA FORMAÇÃO DE CAROTENOIDES NO FRUTO

Juliana Andrade Hay (PIBIC/CNPq/FA/UEPG), Marília Aparecida Stroka, Ricardo Antônio Ayub (Orientador), e-mail: rayub@uepg.br
Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade.

5.01.00.00-9 Agronomia e 5.01.02.00-1 Fitossanidade.
Palavras-chave: RNA-seq, fisiologia da maturação, coloração de casca.

Resumo

A coloração da casca do melão amarelo é o primeiro indicativo visual de consumo, seguido da consistência do fruto, indicando estádios corretos de maturação. Os carotenoides são os principais componentes que agem nessa mudança de cor. Como compostos bioativos, os carotenoides, além de serem corantes naturais dos alimentos, possuem também atividade biológica como provitamina A e ação antioxidante. Por possuir variedades climatéricas e não climatéricas, o melão se torna de grande importância para a melhor compreensão do processo de amadurecimento. O objetivo deste trabalho foi estudar o metabolismo de formação dos carotenoides em frutos não-climatéricos de melão (*Cucumis melo* L.) vr. Amarelo, com a verificação dos mecanismos moleculares que coordenam esses processos e suas vias metabólicas.

Introdução

A maturação é um dos estádios do desenvolvimento das frutas que envolve mudanças bioquímico-moleculares e resulta em alterações fisiológicas e fenotípicas facilmente perceptíveis, como é o caso de coloração de casca. (CHITARRA; CHITARRA, 2005). O melão (*Cucumis melo* L.), pertencente à família Cucurbitaceae, é apreciado no mundo todo e, embora a planta seja botanicamente uma hortaliça, é comercializado como fruta (CELIN et al., 2014). A cultura se mostra altamente rentável tendo reações positivas no mercado e um retorno favorável ao produtor (PAULINO et al.,1994). Para que haja a produção de cor, um carotenoide precisa ter pelo menos sete duplas ligações conjugadas. Em estudos realizados por Silva et al. (2004) visando o prolongamento de vida de prateleira, foi verificado que a síntese e o acúmulo de carotenoides é um evento etileno-independente, tendo então outro fator inicial de maturação. As informações desse trabalho foram adquiridas através da visualização de um mapeamento de transcritos e com base na literatura utilizada, para seguinte compreensão da maturação dos frutos não-climatéricos. Tais resultados podem, no futuro, levar a uma melhoria de manejo pós-colheita que melhor se adeque às condições fisiológicas destes frutos, como tempo de prateleira.

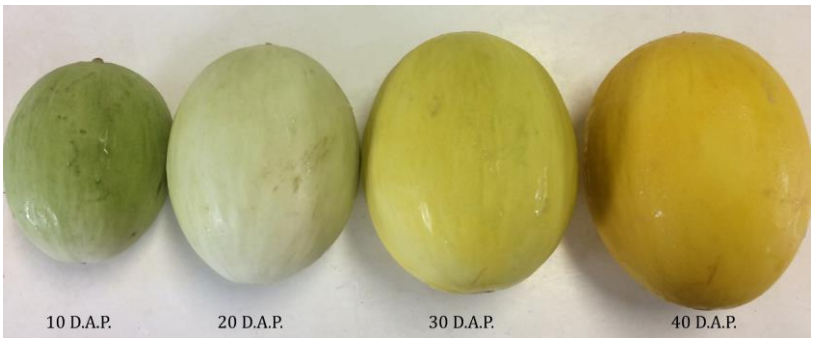
Material e Métodos

I. OBTENÇÃO DOS FRUTOS

Frutos de *Cucumis melo* de uma cultivar comercial de melão amarelo, grupo Inodorus, provenientes de polinização manual foram colhidos em diferentes estágios de maturação de acordo com o período de dias após a polinização (D.A.P.), sendo eles frutos verdes (10 D.A.P.), verdes grandes (20 D.A.P.), fruto em início de maturação (30 D.A.P.) e em maturação plena (40 D.A.P.). Para a análise de RNA-seq, que foram sequenciadas na plataforma Ion Torrent, apenas os estágios 10 D.A.P. e 40 D.A.P. foram utilizados (Figura 1). Para as análises moleculares, se

utilizou o mesocarpo de cada fruto. Estes foram cortados em pequenos pedaços e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e acondicionados à -80ºC.

Figura 1 – Diferentes estágios de maturação do melão amarelo, cultivar comercial, utilizado para análise de RNA-seq apenas os frutos com 10 D.A.P. e 40 D.A.P.



II. ANÁLISE BIOINFORMÁTICA

Através do programa CLC Genomics Workbench 7.0 foram alinhados e determinados os genes diferencialmente expressos, realizando previamente o trimming de qualidade nas amostras. Para alinhamento dos reads foi utilizado o genoma de referência do melão sequenciado por Garcia-Mas et al. (2012), disponível em MELONOMICS (https://melonomics.net).

II.II NOTAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES

Dados os genes diferencialmente expressos (Tabela 1), foi realizada uma busca de cada um destes na plataforma MELONOMICS.

Tabela 1 – Referente aos genes de interesse da via metabólica de carotenoides no melão amarelo

Feature ID	Fold change	P-value	Média Maduro	Média Verde	Nome das enzimas
MELO3C016185	2,387451	0,001349	2,864803	6,839578	Fitoeno sintase
MELO3C009571	2,161767	0,013952	4,782203	10,33801	Caroteno isomerase
MELO3C004633	12,08957	0,013114	0,010845	0,131112	Licopeno ε-ciclase
MELO3C005704	3,730465	0,01985	8,788473	32,78509	Caroteno β-anel hidrolase
MELO3C020965	2,308373	0,005427	0,24226	0,559228	violaxantina de-epoxidase

*RPKM: Reads per kilo base per million, estabelece um valor de expressão de genes que codificam enzimas pela tecnologia de transcriptômica.
* Média maduro\ verde: Média de RPKM de 3 repetições biológicas de fruto maduro e fruto verde.

III. ESTUDO DAS VIAS METABÓLICAS

Com base nessas informações, foi possível o estudo das vias metabólicas relacionadas à formação de carotenoides em frutos, observando-se os genes participantes e as distinções entre os dois estádios de amadurecimento.

Resultados e Discussão

A análise de RNA-seq apresentada na Tabela1 fornece os padrões de expressão gênica relativos a diferentes estágios de maturação dos frutos de Melão amarelo, sendo possível o entendimento da via metabólica. Os valores de RPKM (*Reads per kilo base per million*) apresentados demonstram seu valor de expressão. A expressão dos genes que codificam enzimas que compõem a biossíntese dos carotenoides é mais acentuada em frutos verdes pelo valor positivo de seu fold change, indicando um maior acúmulo nesse estágio de desenvolvimento para seguinte degradação da clorofila e visualização da cor em frutos maduros, pela maior presença de pigmentação. Com base nos dados obtidos foi possível obter essas informações sobre os principais genes que atendem a rota de carotenoides, também chamada de rota do não-mevalonato ou via Rohmer. O passo inicial da síntese de carotenoides envolve uma unidade de isopreno o isopentenil difosfato (IPP) molécula essa com cinco carbonos (C5). Quatro IPP's são condensados para formar a próxima molécula de importância, o geranilgeranilpirofosfato (GGPP), composto de vinte carbonos (C20), reação catalisada pela enzima geranil sintase (GGPS). O primeiro carotenoide possui quarenta carbonos e sua formação é dada conversão de duas moléculas de GGPP através de uma reação catalisada pela sintase do fitoeno (PSY). O Fitoeno então é convertido em Licopeno no decorrer das etapas de formação, pela ação de duas desnaturases e duas isomerases denominadas de caroteno e carotenoide isomerase. (Cazzonelli and Pogson, 2010; Nisar et al., 2015; Tanaka et al., 2008). As enzimas fitoeno dessaturase (PDS), ζ-caroteno isomerase (Z-ISO) e ζ-caroteno dessaturase (ZDS) realizam ação catalítica sobre o Fitoeno gerando o Pró-licopeno. O caminho da vida metabólica consiste em 5 etapas como estágios iniciais, formação do fitoeno, desaturação para formar o licopeno, a ciclização e finalmente a formação das xantofilas, pigmentos esses amarelados que pertencem as divisões dos carotenoides. Estudos demonstraram que o percurso metabólico começa com a síntese de IPP via ácido mevalônico (Rohmer et al.,1993). A descrição da via começa com a formação do Fitoeno, o primeiro composto com quarenta carbonos (C40), para formar, o Licopeno, derivado de uma condensação de duas moléculas de GGPP formados por três moléculas de isopentenil pirofosfato (IPP) e uma molécula isômera de dimetillalil pirofosfato (DMAPP). Os carotenoides no aparato fotossintético das plantas são comumente compostos bicíclicos com dois anéis β.

Conclusões

No Melão amarelo, observou-se que diversos genes se expressam na importante via de formação dos carotenoides. O gene de Caroteno β- anel hidrolase (MELO3C005704) foi o mais intenso em expressão se relacionado com os demais genes referenciadas, motivo pelo qual é uma fonte inicial de obtenção de mudança de coloração tanto de casca como de polpa. A síntese de carotenoides como

produto secundário proveniente de um isoprenoide, não afeta somente a cor mas contribui para outras funções como formação de aromas e aumento e diminuição da concentração de açúcares, tendo a violaxantina como uma subdivisão do grupo de carotenoides e etapa final da biossíntese, de importância para a coloração mais amarelada do fruto.

Agradecimentos
Em agradecimento ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico (**CNPq**) pela bolsa concedida, ao meu orientador Ricardo Antonio Ayub pela oportunidade e confiança, Letícia Reis e Marília Aparecida Stroka, minhas coorientadoras, agradeço pelo conhecimento transmitido, paciência e amizade e toda equipe LabFruti. Em especial um enorme agradecimento ao Labmom que se fez de extrema importância no desenvolvimento do projeto, com pessoas incríveis como Kamila Karoline.

Referências
CAMPOS, Gabrielle Silveira; AYUB, Ricardo Antônio. **High- quality total RNA isolation from melon (Cucumis melo L.) fruits rich in polysacharides:** Isolamento de RNA total de alta qualidade a partir de frutos de melão (Cucumis melo L.) contendo altos níveis de polissacarídeos. 2017. 8 f. Tese (Doutorado) – Curso de Agronomia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2017.
CAZZONELLI, C. and B. J. Pogson. 2010. **Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants**. Trends Plant Sci. 15: 266–274
CELIN, E. F.; PASTORI, P. L; NUNES; G. H. S.; ARAGÃO, F. A. S. **Agronegócio brasileiro do melão na última década.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA,53. 2014; Palmas: ABH, 2014.
CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005.
PAULINO, H.B. et al. **Viabilidade econômica da cultura do melão (Cucumis melo L.) na região de Ilha Solteira - SP**. Scientia Agricola. São Paulo - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, v. 51, n. 3, p. 519-523, 1994. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/10361>.
ROHMER, M; KNANI. M; SIMONIN, P; SUTTER, B; SAHM, H.**Biochem**. J. 295: 517-524, 1993.