TRANSCRIPTÔMICA DO MELÃO (CUCUMIS MELO) VR. ELDORADO EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE AMADURECIMENTO VISANDO A COMPREENSÃO DA FORMAÇÃO DE AÇÚCARES NO FRUTO

Marília Aparecida Stroka (PROVIC), Letícia Reis, Ricardo Antonio Ayub (Orientador), e-mail: rayub@uepg.br.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade.

Ciências Agrárias (5.00.00.00-4), Agronomia (5.01.00.00-9).

Palavras-chave: sacarose, maturação, fisiologia.

Resumo

A qualidade dos frutos de melão é determinada pelo teor de açúcares e a compreensão deste processo pode contribuir para o desenvolvimento de novas ferramentas de manejo de campo e de pós-colheita e assim entregar aos consumidores um produto de maior qualidade. Este trabalho objetivou elucidar aspectos do metabolismo de açúcares em frutos não-climatéricos de melão amarelo, Grupo Inodorus, tipo largamente produzido no Brasil. Para isto, realizou-se análise transcriptômica por RNA-seq de frutos verdes (10 D.A.P.) e frutos maduros (40 D.A.P.). Foram encontradas 12 DEGs relacionadas ao metabolismo de açúcares, Observou-se para melão amarelo uma possível especificidade de genes em frutos não-climatéricos nesta via metabólica, além da essencialidade dos inibidores de invertase para o metabolismo de açúcares.

Introdução

O principal componente determinante da qualidade dos frutos de melão é o teor de açúcares. Em geral, as Cucurbitáceas exportam rafinose e estaquiose, além de sacarose para os tecidos dreno com rápido metabolismo destes oligossacarídeos para compostos mais simples (CHROST & SCHMITZ, 1997; ZHANG et al., 2012). Na maioria dos frutos, glicose e frutose constituem a maior parte dos açúcares, porém para melão a sacarose é a principal responsável pelo sabor adocicado, variando seu teor dependendo do genótipo e de sua interação com o ambiente (BALDWIN et al., 1991; BURGER & SCHAFFER, 2007).

Segundo Dai et al. (2011), trabalhos com apenas enzimas principais podem simplificar exageradamente a elucidação do metabolismo de açúcar. Estudos biomoleculares com maiores detalhes sobre a via metabólica são essenciais no estudo do metabolismo de sacarose e para possíveis modificações de manejo que melhorem a qualidade do fruto. Assim, técnicas de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) são fundamentais.

Este trabalho objetivou elucidar aspectos do metabolismo de açúcares nos frutos de melão amarelo (*Cucumis melo* L.), através de transcriptômica de dois estádios de maturação do fruto por técnica de RNA-seq com sequenciamento em plataforma Ion Torrent (NGS).

Materiais e Métodos

Material vegetal e Extração do RNA Total
Frutos de melão amarelo (grupo Inodorus) foram colhidos nos estádios verde (10 D.A.P) e maduro (40 D.A.P.) O mesocarpo dos frutos foi cortado em pequenos pedaços, congelado em nitrogênio líquido e acondicionado a -80°C. O RNA Total foi extraído em triplicata biológica, utilizando o método descrito por Campos et al. (2017) e a integridade do mesmo foi avaliada por eletroforese em gel de agarose e através do aparelho Nanovue™, onde foram obtidas as razões de absorbância A260/A280 e A260/A230.

Isolamento do mRNA, síntese do cDNA
Para purificação do mRNA, as amostras foram submetidas ao Micro Kit Dynabeads mRNA Direct, seguido do kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific) para produção do cDNA.

RNA-seq
O cDNA foi sequenciado na plataforma Ion Torrent, com 5 replicatas técnicas. O software CLC Genomics Workbench 7.0 foi utilizado para análise bioinformática das sequência. Realizou-se o trimming de qualidade das amostras (máximo de 2 nucleotídeos ambíguos e tamanho mínimo de 20 bp) e para alinhamento utilizou-se o genoma de referência MELONOMICS sequenciado por Garcia-Mas et al. (2012).
Realizou-se o teste T de Gaussian, comparando-se os resultados do melão verde (10 D.A.P.) com os do melão maduro (40 D.A.P.), sendo o fruto verde utilizado como testemunha. Foram retiradas as ESTs com p-value maior que 0,05 e com fold change entre +2 e -2, resultando em 2340 DEGs. A notação funcional dos genes foi dada pelo software Blast2GO e pela ferramenta KEGG PATHWAY Database.

Resultados e Discussão

12 DEGs relacionadas ao metabolismo de oligossacarídeos foram encontradas e estão descritas abaixo:

α-galactosidase
Os genes predominantemente expressos em frutos climatérios e não climatéricos parecem diferir para α-galactosidase. Saladié et al. (2015) relatam predomínio de CmAAG2, em melão Pele de sapo (não-climatérico) e CmAA1 em frutos climatéricos. O melão amarelo é do grupo de maturação não-climatérico e observou-se expressão diferencial apenas de CmAAG2, com maior expressão em verde do que em maduro, corroborando com Saladié et al. (2015) e Zhang et al. (2016).
CmNAG2 foi a segunda sequência mais expressa em fruto verde e sofre pequeno declínio em fruto maduro. Mesmo com o declínio, CmNAG2 é a EST mais expressa em fruto maduro entre as envolvidas no metabolismo da sacarose.

Invertases
CmAIN2 apresentou alta expressão em verde e posterior declínio acentuado para valores baixos. Burger e Schaffer (2007), Dai et al. (2011) e Zhang et al. (2016) descrevem padrão semelhante para este gene durante o desenvolvimento.

Duas DEGs correspondentes à invertases de parede celular, CmCIN2 e CmCIN4, apresentaram, ambas, valores baixos de expressão em fruto verde com declínio para o quase silenciamento em fruto maduro. Saladié et al. (2015) sugere que estas não têm acesso a sacarose estocada no vacúolo, contribuindo para a manutenção do açúcar no fruto, porém como o carregamento do floema em melão é do tipo simplástico, o papel das invertases de parede celular é colocado em dúvida.

Inibidores de Invertase

Saladié et al. (2015) encontrou a expressão de dois genes que codificam para enzimas inibidoras de invertase (entre eles CmINH1) cerca de 30 vezes superior em melão Pele de sapo (não climatérico) do que em frutos climatéricos. Neste trabalho, a expressão de CmINH1 foi a terceira maior durante o estádio verde entre as DEGs aqui citadas, sofreu declínio com o desenvolvimento, mas manteve o padrão de alta expressão em fruto maduro, concordando com Saladié et al. (2015) sobre a importância destes codificantes para o acúmulo da sacarose em frutos não-climatéricos.

Sacarose-sintase

Duas DEGs foram encontradas: CmSUS1 e CmSUS2. CmSUS1 foi mais expressa em frutos maduros do que em frutos verdes, sendo a terceira sequência mais expressa no estádio maduro entre as demais relacionadas ao metabolismo de sacarose. CmSUS2 é a sequência com maior expressão em verde entre as demais envolvidas no metabolismo de sacarose, com posterior declínio com a maturação. Ambas estão de acordo com os resultados de Saladié et al. (2015) e Zhang et al. (2016).

Sacarose-fosfato-sintase

CmSPS2 obteve baixa expressão durante todo o desenvolvimento, com declínio no estágio maduro. Zhang et al. (2016), por outro lado, encontrou aumento da expressão com o amadurecimento. Dai et al. (2011) sugere que a expressão de CmSPS2 não é clara e ocorre em baixos níveis. Huber & Huber (1996) relatam que as mudanças no nível da enzima SPS se devem à modificações pós-transcricionais de fosforilação e desfosforilação que influenciam a ativação ou não desta.

Sacarose-fosfato-fosfatase, Hexoquinase e UDP-glicose-epimerase

Para CmSPP1, o perfil foi inverso ao proposto por Dai et al. (2011), diminuindo a expressão com a maturação. CmHK3 apresentou fraca expressão em ambos estágios, chegando a quase ausência de transcritos em frutos maduros. Este perfil também foi observado por Dai et al. (2011). CmUGE3 apresentou alto nível de expressão em frutos verdes, decrescendo com a maturação, ao contrário do perfil apresentado por Dai et al. (2011).

Como demonstrado para a isoforma de α-galactosidase ácida CmAAG2 e para o padrão de expressão do inibidor de invertase CmINH1, possivelmente há uma especificidade entre frutos de melão não-climatéricos com relação as isoformas e genes expressos no metabolismo de açúcar.

Conclusões

Observou-se a especificidade de genes para frutos não-climatéricos e a ação fundamental dos inibidores de invertase no acúmulo de sacarose, além de apenas a baixa na atividade da invertase solúvel propriamente dita e do aumento da atividade de sacarose-sintase, contribuindo com uma visão mais ampla do metabolismo de açúcares.

Agradecimentos

À UEPG, laboratório de biotecnologia aplicada à fruticultura e laboratório de biologia molecular microbiana, CNPq e Capes.

Referências

BALDWIN, et al. Quantitative Analysis of Flavor and Other Volatiles and for Certain Constituents of Two Tomato Cultivars during Ripening. **Journal Of The American Society For Horticultural Science,** v. 116, n. 2, p.265-269, mar. 1991.

BURGER, Y.; SCHAFFER, A. A. The Contribution of Sucrose Metabolism Enzymes to Sucrose Accumulation in Cucumis melo. **Journal Of The American Society For Horticultural Science.** p. 704-712. 19 jun. 2007.

CAMPOS, G. S. de et al. High-quality total RNA isolation from melon (Cucumis melo L.) fruits rich in polysaccharides. **Semina Ciências Agrárias,** Londrina, v. 38, n. 4, p.10-15, ago. 2017.

CHROST, B.; SCHMITZ, K.. Changes in soluble sugar and activity of α-galactosidases and acid invertase during muskmelon (Cucumis melo L.) fruit development. **Journal Of Plant Physiology,** [s.l.], v. 151, n. 1, p.41-50, jan. 1997.

DAI, N. et al. Metabolism of soluble sugars in developing melon fruit: a global transcriptional view of the metabolic transition to sucrose accumulation. **Plant Molecular Biology,** [s.l.], v. 76, n. 1-2, p.1-18, 9 mar. 2011.

GARCIA-MAS, J. et al. The genome of melon (Cucumis melo L.). **Proceedings Of The National Academy Of Sciences,** [s.l.], v. 109, n. 29, p.11872-11877, 2 jul. 2012.

HUBER, S. C.; HUBER, J. L.. Role and Regulation of Sucrose-phosphate Synthase in Higher Plants. **Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology**, v. 47, n. 1, p.431-444, jun. 1996.51, 1997.

SALADIÉ, M. et al. Comparative transcriptional profiling analysis of developing melon (Cucumis melo L.) fruit from climacteric and non-climacteric varieties. **Bmc Genomics**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.1-20, 9 jun. 2015.

ZHANG, C. et al. The Origin and Composition of Cucurbit "Phoem" exudate. **Plant Physiology**, v. 158, n. 4, p.1873-1882, 13 fev. 2012.

ZHANG, H. et al. Transcriptome profiling of Cucumis melo fruit development and ripening. **Horticulture Research**, v. 3, p.1-10, 27 abr. 2016.