EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO ACÚMULO E METABOLISMO DE AÇÚCARES EM MELÃO

Marília Aparecida Stroka (BIC/Fundação Araucária), 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: fisiologia, maturação, primer, Cucumis melo, sacarose.

Resumo

A qualidade dos frutos de melão é determinada pelo teor de açúcares e compreender este processo pode levar ao desenvolvimento de novas ferramentas de manejo, obtendo um produto de maior qualidade. O objetivo deste trabalho foi elucidar o metabolismo dos açúcares em frutos de melão amarelo, tipo não-climatérico, a fim de validar estudos realizados anteriormente acerca dos genes diferencialmente expressos durante a maturação. Para isto, extraiu-se o RNA mensageiro de frutos provenientes de polinização manual, nos estádios: verde (10 D.A.P.), verde grande (20 D.A.P.), início de maturação (30 D.A.P.) e fruto maduro (40 D.A.P.) a fim de analisar a expressão gênica pela técnica de RT-qPCR. Foram desenhados primers para os genes alvo CmAAG2, CmSUS2, CmNAG2, CmINH1, CmUGE3, CmSPS2, CmSUS1, CmAIN2, CmSPP1, CmINH-LIKE3 e para os genes de referência CmRPL e CmRPS15. Para construção da curva padrão, foram realizadas diluições seriadas da amostra em cinco vezes. O trabalho ainda está em andamento, contando até o momento, com a eficiência calculada de sete dos doze pares de primers.

Introdução

O melão (*Cucumis melo* L.) é cultivado mundialmente em regiões temperadas e tropicais, sendo o melão tipo amarelo, do grupo Inodorus (não-climatérico) o mais plantado no Brasil para consumo interno e exportação (JEFFREY, 2005; PARIS et al., 2017).

Entre as características avaliadas pelos consumidores de melão, o principal componente determinante da qualidade é o teor de açúcares (FREILICH et al., 2015; SALADIÉ et al., 2015). Ayub et al. (1996) apontaram a produção de açúcares em melão como independente de etileno, demonstrado pelo fato de frutos de melão Charentais (Grupo Cantaloupe - climatérico) transformados com o DNA antisense do gene que codifica a enzima ACC oxidase apresentarem gosto adocicado. Porém em estudos recentes, sugere-se que apesar do acúmulo de açúcares ocorrer, o metabolismo dos oligossacarídeos tem se mostrado distinto para os tipos de maturação, como por diferenças epigenéticas, polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs - *single nucleotide polymorphism*) e expressão diferencial de genes (LEIDA et al., 2015; SALADIÉ et al., 2015; ZHONG et al., 2013).

Frutos climatéricos já possuem amplo estudo em termos de fisiologia e bioquímica, porém para não-climatéricos muitas lacunas ainda estão abertas. Não existem trabalhos publicados até o presente momento que elucidem detalhes do metabolismo de açúcares em melão amarelo.

Com isto, este trabalho objetivou estudar o metabolismo de açúcares nos frutos de melão amarelo em quatro estágios de maturação, a fim de validar estudos realizados anteriormente. As informações obtidas contribuirão para o entendimento da fisiologia da maturação dos frutos não-climatéricos, bem como possibilitar estudos de manejo pós-colheita que melhor se adequem as condições fisiológicas destes frutos, alcançando maior qualidade comercial.

Materiais e Métodos

I. OBTENÇÃO DOS FRUTOS:

Foram coletados frutos de melão amarelo de uma cultivar comercial com 10 dias após a polinização (D.A.P.), 20 D.A.P., 30 D.A.P. e 40 D.A.P. em triplicata biológica. O mesocarpo dos frutos foi cortado em pequenos pedaços, resfriado imediatamente com nitrogênio líquido e armazenado em -80°C.

II. EXTRAÇÃO, TRATAMENTO COM DNase E ANÁLISE DO RNA-TOTAL:

A extração de RNA total foi realizada através do método descrito por Campos et al. (2017), e as amostras extraídas foram tratadas com o kit TURBO™ DNase (Invitrogen) para retirar quaisquer vestígios de DNA genômico. O produto da extração foi analisado em gel de agarose 1% (TAE 1x) e através de leitura em espectrofotômetro Nanovue das razões de absorbância A260/A280 e A260/A230.

III. PRODUÇÃO DE cDNA:

O RNA extraído foi convertido em cDNA através do kit RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific), a fim de concentrar 5ug.

IV. ANÁLISE POR RT-qPCR:

Através dos resultados obtidos por Stroka, Reis e Ayub (2017), selecionaram-se genes do metabolismo de açúcares em melão amarelo e desenhou-se os seus respectivos primers específicos através dos softwares PrimerBlast e Beacon Designer. Foram selecionados dois genes de referência, CmRPL e CmRPS15. Todos os primers estão listados na Tabela 1.
Para o cálculo das eficiências dos primers, diluições em cinco vezes foram promovidas de forma seriada para confecção da curva padrão, partindo-se da concentração inicial de 800 ng μL^{-1}. A análise da eficiência, bem como a especificidade dos primers através de curva de Melting, estão sendo feitas por RT-qPCR utilizando o termociclador LightCycler Nano System (Roche) e o fluoróforo intercalante SYBR Green. Os parâmetros utilizados foram de: 95°C por 600 segundos; 45 ciclos de 95°C por 15 segundos, temperatura de anelamento do primer (em média 62°C) por 20 segundos e 72°C por 20 segundos; e um ciclo de 95°C por 10 segundos. A etapa de melting foi procedida com 60°C por 60 segundos, seguida do aquecimento para 97°C por um segundo. O método de cálculo de expressão gênica será pelo método de Livak ou $2^{\Delta(\Delta Ct)}$.

Tabela 1 – Genes de referência e genes alvo relacionados ao acúmulo e metabolismo de sacarose em melão e respectivos primers foward e reverse para reações de PCR e RT-qPCT.

Gene	Short Form	ID	Primer 5' – 3'	Amplificado
α-galactosidase neutra 2	CmNAG2	MELO3C023110	F 5' TTCCTGTGGTATCGATGGCG 3' R 5' ATGAATGGTGTGGGAGGCAG 3'	258bp
Inibidor de Invertase 1	CmINH1	MELO3C022457	F 5' GAGGAGAAAGAAGGGGTGGTT 3' R 5' CCATGGTGTGGATTGTATTTTGA 3'	205bp
Sacarose sintase 1	CmSUS1	MELO3C015552	F 5' AACCGTGTTCATAGCCTCCG 3' R 5' TCAGGACTTCCCCAAATGCC 3'	195bp
UDP-glicose epimerase 3	CmUGE3	MELO3C005640	F 5' CTGTTGGGGAGAGTGTTGCT 3 R 5' GCTTCGTCCGACCATAAGGA 3'	203bp
Sacarose sintase 2	CmSUS2	MELO3C025101	F 5' TCCAGATGCGAAGGGGACTA 3' R 5' ATCCGGCTTTGCTTCCATGA 3'	204bp
Sacarose-P-fosfatase 1	CmSPP1	MELO3C009570	F 5' AGTTCGTTTCTTCGTTTGGCT 3' R 5' TTGGCGCTTCTTTTGTGATGG 3'	198bp
Invertase ácida 2	CmAIN2	MELO3C005363	F 5' CTCGATCTGTCAAAAAGCAGC 3' R 5' TTCCCCAAACGCCCCTAAAG 3'	213bp
Sacarose-P-sintase 2	CmSPS2	MELO3C020357	F 5' CTTCTTAAGCAGGGACGCCA 3' R 5' GGGAAATTACTCCACGCCGA 3'	213bp
α-galactosidase ácida 2	CmAAG2	MELO3C011771	F 5' ATGGTATCCAGCGGACTTGC 3' R 5' CCAAGGGAACCAGGCATCTT 3'	226bp
Novo Inibidor de Invertase Putativo	CmINH-LIKE3	MELO3C006266	F 5' CTCGCATTTTCCTTCGTTGT 3' R 5' AAAGGTCCGCCGTGTCGCT3'	163bp
Cytosolic 40s Ribosomal proteinS15	CmRPS15	MELO3C006471	F 5' GAAGCTGCGTAAAGCGAAAC 3' R 5' GGTCTTTCCATTGTAAACTCCAA 3'	132bp
60s Ribosomal protein L	CmRPL	MELO3C023039	F 5' CGACAATACTGGAGCCAAGAA 3' R 5' CATCACCATATCTCCCACACAA 3'	100bp

Resultados e Discussão

As sequências de iniciadores desenhadas para CmSPP1, CmAAG2 não obtiveram expressão nos testes com PCR convencional. Para estes, novos primers foram desenhados, como ilustrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Genes alvo que não apresentaram amplificação e respectivos novos primers foward e reverse para reações de PCR e RT-qPCT.

Gene	Short Form	ID	Primer 5' – 3'	Amplificado
Sacarose-fosfato-fosfatase 1	CmSPP1	MELO3C009570	F 5' TATCGTCACTCTTCTCCAC 3' R 5' CATGAGACGTGCTGAAGCG 3'	182bp
α-galactosidase ácida 2	CmAAG2	MELO3C011771	F 5' ATGATTGTTGGGCTGAACTTGTA T 3' R 5' CCAAGGGAACCAGGCATCTT 3'	178bp

A eficiência ideal para os primers obtida através da curva padrão deve ser próxima a 100%, representada no software do equipamento LightCycler Nano System pelo número 2,0 e o R^2 deve ser o mais próximo possível de 1,0. Aceita-se ainda a variação de 100 ± 10%.

Os resultados das eficiências calculadas até o momento estão representadas na Tabela 3. Os primers para os genes CmINH1 e CmSUS2 necessitam de adequação do gradiente de primer, já para CmSUS1 a presença de bandas inespecíficas sugere a necessidade de testes com gradiente de primer e temperaturas mais altas.

Os pares de primers novos para CmSPP1 e AAG2, bem como o primer para CmINH-LIKE3 estão em processo de compra e ainda não estão disponíveis.

Assim que todos as eficiências estiverem adequadas, o trabalho poderá prosseguir para a etapa de quantificação relativa por RT-qPCR e assim poderá comparar os resultados de fold change com os encontrados por RNA-seq no trabalho de Stroka, Reis e Ayub (2017).

Tabela 3 – Resultados das eficiências calculadas pela curva padrão até o presente momento.

Short Form	Primer 5' – 3'	Amplificado	Eficiência	R2
CmNAG2	F 5' TTCCTGTGGTATCGATGGCG 3' R 5' ATGAATGGTGTGGGAGGCAG 3'	258bp	2,105	0,9895
CmUGE3	F 5' CTGTTGGGGAGAGTGTTGCT 3 R 5' GCTTCGTCCGACCATAAGGA 3'	203bp	2,143	0,9815
CmAIN2	F 5' CTCGATCTGTCAAAAAGCAGC 3' R 5' TTCCCCAAACGCCCCTAAAG 3'	213bp	1,927	0,9911
CmSPS2	F 5' CTTCTTAAGCAGGGACGCCA 3' R 5' GGGAAATTACTCCACGCCGA 3'	213bp	2,121	0,994
CmRPS15	F 5' GAAGCTGCGTAAAGCGAAAC 3' R 5' GGTCTTTCCATTGTAAACTCCAA 3'	132bp	2,12	0,9865
CmRPL	F 5' CGACAATACTGGAGCCAAGAA 3' R 5' CATCACCATATCTCCCACACAA 3'	100bp	2,016	0,996

Conclusões

O trabalho ainda está em andamento. Espera-se que os dados de expressão apresentados na análise de RNA-seq realizada anteriormente sejam validados e ampliem o conhecimento acerca do metabolismo de açúcares nos estágios intermediários de maturação do fruto.

Agradecimentos

Agradeço à UEPG e à Fundação Araucária pela bolsa a mim concedida.

Referências

AYUB, R. et al. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. **Nature Biotechnology,** v. 14, n. 7, p.862-866, jul. 1996.
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.
FREILICH, S. et al. Systems approach for exploring the intricate associations between sweetness, color and aroma in melon fruits. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 1–16, 2015.
JEFFREY, C. A new system of Cucurbitaceae. **Bot Zhurn**, v. 90, p. 332 – 335, 2005.
LEIDA, C. et al. Variability of candidate genes, genetic structure and association with sugar accumulation and climacteric behavior in a broad germplasm collection of melon (*Cucumis melo* L.). **BMC Genetics**, v. 16, n. 1, p. 1–17, 2015.
PARIS, H.S. et al. Cucurbitaceae Melons, Squash, Cucumber. **Encyclopedia Of Applied Plant Sciences**, p.209-217, 2017.
SALADIÉ, M. et al. Comparative transcriptional profiling analysis of developing melon (*Cucumis melo* L.) fruit from climacteric and non-climacteric varieties. **BMC genomics**, v. 16, p. 440, 2015.
STROKA, M. A.; REIS, L.; AYUB, R. A. Transcriptômica do melão (*Cucumis melo*) vr. Eldorado em diferentes estágios de amadurecimento visando a compreensão da formação de açúcares no fruto. In: XXVI ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2017, Ponta Grossa. **Anal do XXVI Encontro Anual de Iniciação Científica da UEPG.** Ponta Grossa: Uepg, 2017. p. 1 - 4.
ZHONG, S. et al. Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 154–159, 2013.