

FONTES DE CARBONO AFETAM DIFERENCIALMENTE A EXPRESSÃO DE GENES DO METABOLISMO DE SORBITOL NO PORTA-ENXERTO DE AMEIXEIRA 'MARIANNA 2624' CULTIVADO *in vitro*

JOSIANE ESTELA ROLOFF¹; ELSA KUHN KLUMB¹, ATHOS ODIN SEVERO DORNELES¹; CRISTINA WEISER RITTERBUSCH¹; VALMOR JOÃO BIANCHI¹

¹Universidade Federal de Pelotas – josianeestelaroloff.5@hotmail.com; elsakk91@yahoo.com.br; athos_odin@hotmail.com; crisritterbusch@hotmail.com; valmojb@yahoo.com

1. INTRODUÇÃO

No cultivo *in vitro* de espécies vegetais, a taxa de multiplicação de brotações pode ser afetada por diversos fatores que compõem o meio de cultivo como: tipo e a concentração dos reguladores de crescimento, concentrações de sais, o tipo e concentração de fontes de carbono. A aplicação de carboidratos ao meio de cultivo serve como fonte de energia e como agente para manter o potencial osmótico do meio (HAQUE et al., 2003).

Na grande maioria das espécies vegetais a sacarose é o principal carboidrato transportado via floema. Nas plantas da família Rosaceae, o sorbitol é o principal açúcar presente e transportado podendo constituir até 90% dos açúcares presentes na seiva do floema (AHMAD et al., 2007), portanto possui potencial para uso no cultivo *in vitro*. A frutose também tem sido utilizada, mostrando-se como uma boa fonte de carbono no cultivo *in vitro* do porta-enxerto de macieira 'M9' (BORKOWSKA e SZCZERBA, 1991). Além da fonte, a concentração desta pode influenciar no crescimento das brotações *in vitro* (NICOLOSO et al., 2003).

Plantas da família Rosaceae possuem um aparato enzimático e molecular que possibilita a síntese, transporte e o uso de sorbitol, que é um monossacarídeo (açúcar-álcool) sintetizado nos tecidos fonte a partir de glicose-6-fosfato, que é primeiramente convertida a sorbitol-6-fosfato, pela enzima *sorbitol-6-fosfato desidrogenase* (S6PDH), em seguida desfosforilada a Sorbitol, pela enzima *sorbitol-6-fosfatase*. Em tecidos dreno, a enzima *Sorbitol desidrogenase* (SDH) converte o sorbitol à frutose, que a partir daí pode dar sequência ao metabolismo de carboidratos. Estudos acerca da influência destes açúcares na expressão dos genes que codificam estas enzimas, bem como o efeito da regulação destas no metabolismo de carboidratos das plantas tem sido realizado por diversos autores (CHEONG e AN, 2015; OZUDOGRU et al., 2017). No entanto, ensaios realizados para testar os efeitos das diferentes fontes e concentrações de carboidratos no cultivo *in vitro*, limitam-se a avaliações fisiológicas de crescimento.

Sabe-se que cada fonte de carbono utilizada pode apresentar diferentes mecanismos de assimilação e transporte (BUCHANAN et al., 2015). Assim, o objetivo deste estudo foi investigar se diferentes fontes e concentrações de carbono afetam diferencialmente a expressão de genes do metabolismo de sorbitol no porta-enxerto de ameixeira cv. 'Mariana 2624', cultivado *in vitro*.

2. METODOLOGIA

O estudo foi executado nos Laboratórios de Fisiologia Molecular e de Cultura de Tecidos de Plantas, no Departamento de Botânica de Universidade Federal de Pelotas.

Brotações apicais com aproximadamente 1 cm, oriundas de plantas do porta-enxerto de ameixeira cv. 'Mariana 2624', pré-estabelecidas *in vitro*, foram inoculadas em meio MS suplementado com: 50% da concentração de nitrogênio, mio-inositol (100 mg L^{-1}), ágar (8 g L^{-1}), BAP (1 mg L^{-1}), GA₃ ($0,2 \text{ mg L}^{-1}$), AIB ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) e pH 5,2. Foram utilizadas as seguintes fontes e concentrações de carbono no meio de cultivo: 15 g L^{-1} de sacarose (como controle); 60 g L^{-1} de sacarose; 15 g L^{-1} de frutose; 60 g L^{-1} de frutose; 15 g L^{-1} de sorbitol e 60 g L^{-1} de sorbitol.

Após a inoculação no meio, os explantes foram transferidos para sala de crescimento com temperatura de $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{ C}$, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo luminoso de $48 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, permanecendo nestas condições por 40 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos constituídos por cinco repetições, sendo cada repetição composta por oito explantes. Foram realizadas duas coletas para a extração de RNA, uma aos 10 dias e outra aos 40 dias de exposição aos tratamentos.

Os *primers* para a análise de expressão gênica foram desenhados a partir da busca de sequências codificadoras de *Prunus persica* depositadas no banco de dados GDR – *Genome Database for Rosaceae*, com uso da ferramenta *Primer Designing tool*, do banco de dados NCBI – *National Center for Biotechnology Information*.

Para a obtenção do RNA total, foi utilizado o método de precipitação por Cloreto de Lítio modificado por Chang et al. (1993). A integridade do RNA total foi verificada em gel de agarose a 1% e a quantidade e pureza mensuradas em NanoDrop ND-1000® (GE Healthcare™). Os cDNAs fita simples foram sintetizados por transcrição reversa a partir de $1,5 \mu\text{g}$ de RNA total utilizando o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega), numa reação com volume final de $20 \mu\text{L}$ utilizando primers oligo-dT de acordo com as instruções do fabricante.

As reações de RT-qPCR foram feitas com o uso do fluoróforo SYBR Green (Invitrogen®) e a amplificação foi padronizada em equipamento CFX-96 Real Time Thermal Cycler (Bio-Rad). Foram utilizadas três repetições biológicas. Como gene normalizador, foi utilizado o *EF-1 α* (Fator de alongamento 1 alfa).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliados três genes envolvidos no metabolismo de sorbitol, sendo eles: *sorbitol-6-fosfato desidrogenase (S6PDH)* – que codifica a enzima responsável pela síntese de sorbitol-6-fosfato, um intermediário para a síntese de sorbitol; *sorbitol desidrogenase (SDH)* – que codifica para a enzima responsável pela reação de conversão de sorbitol em glicose ou frutose; e o gene que codifica para um transportador de sorbitol (*SOT1*) comum de tecido dreno (Figura 1).

Em relação ao gene *S6PDH*, todos os tratamentos promoveram a regulação positiva deste, uma vez que apresentaram valores superiores ao controle (15 g de sacarose), ou seja, em todos os tratamentos houve um aumento da expressão de *S6PDH*. Na primeira coleta, o tratamento com 15 g de frutose foi o que favoreceu a maior expressão de *S6DPH* em relação ao controle, já na segunda coleta foi o tratamento de 60 g de frutose que promoveu a maior expressão comparado com os outros tratamentos (Figura 1 A e B).

Para o gene codificador da enzima *SDH*, na primeira coleta, os valores de expressão positiva (*up-regulated*) foram registrados nos tratamentos com maior concentração de fonte de carbono (60 g de sacarose, 60 g de frutose e 60 g de sorbitol), sendo que nos tratamentos com 15 g de frutose e 15 g de sorbitol a expressão se apresentou negativa (*down-regulated*). Na segunda coleta este

parâmetro não se repetiu, e apenas o tratamento com 15g de sorbitol apresenta-se com regulação negativa (Figura 1 C e D).

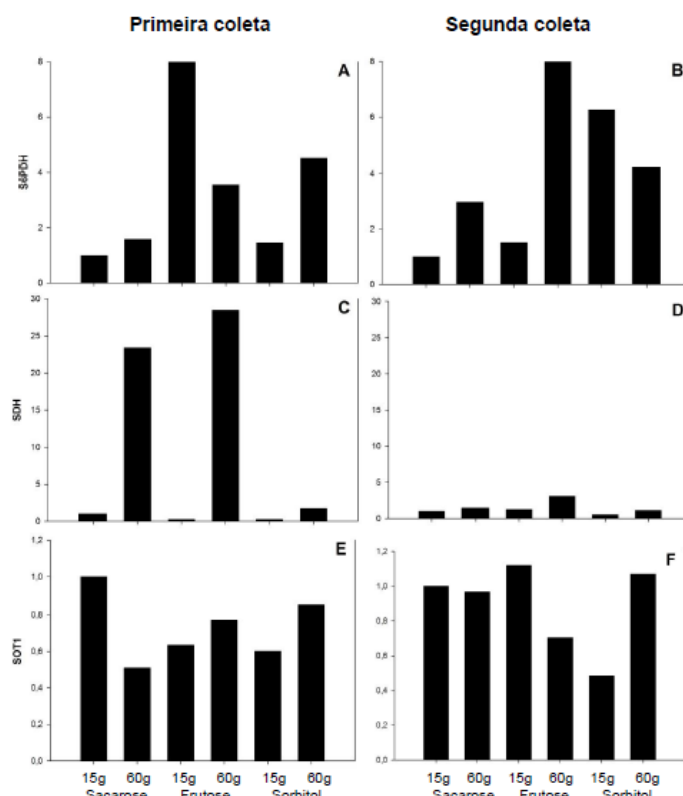


Figura 1. Quantificação relativa da expressão (QR) de genes codificadores das enzimas *S6PDH* (A e B), *SDH* (C e D) e *SOT1* (E e F) em explantes de 'Marianna 2624', cultivados *in vitro*, submetidos a diferentes fontes de carbono e em dois tempos de coleta.

SOT1 teve regulação negativa em todos os tratamentos, em relação ao controle, na primeira coleta. Esta situação praticamente se repete na segunda coleta, onde apenas o tratamento com 15g de frutose apresentou regulação positiva da expressão (Figura 1 E e F). Verificou-se ainda que nos meios contendo sacarose e frutose, bem a maior dose de sorbitol, *SOT1* teve maior expressão em relação ao cultivo em 15g de sorbitol, possivelmente visando compensar a disponibilidade e distribuição de sorbitol no simplasto celular.

O sorbitol mostrou ser uma ótima fonte de carbono, energia e ajuste osmótico em membros da família Rosaceae (MORANDI et al., 2008). A expressão gênica diferencial em resposta as diferentes fontes de carboidratos observadas neste estudo provavelmente estão relacionadas ao papel específico do sorbitol na diferenciação vascular, flutuação no conteúdo endógeno de açúcares redutores (glicose e frutose) e sensibilidade dos tecidos aos produtos de degradação de açúcares, uma vez que tais fatores são influenciados diretamente pela disponibilidade de carboidratos no meio (YASEEN et al., 2013). Estas informações devem ser devidamente exploradas para evitar problemas relacionados à micropropagação, como organogênese, hiperhidricidade e regeneração de explantes *in vitro* de 'Marianna 2624'.

Investigar as fontes de carbono preferencialmente absorvidas do meio de cultura pelos explantes de *Prunus* spp., bem como as rotas de acúmulo de açúcares se faz necessário para desvendar os eventos moleculares envolvidos no metabolismo, em cada espécie. Estudos desta magnitude podem auxiliar de forma significativa na escolha da mais adequada fonte e dose de carbono para otimizar o cultivo *in vitro* de diferentes espécies de *Prunus* spp..

4. CONCLUSÕES

Os genes estudados variam seu padrão de expressão em função da fonte e doses de carbono utilizadas, ao longo do tempo de cultivo.

SOT1 tem maior atividade em meios contendo sacarose e frutose como fonte de carbono, bem como em alta dose de sorbitol.

O presente estudo foi o passo inicial para desvendar os mecanismos moleculares envolvidos na absorção e metabolismo de fontes de carbono, visando otimizar o cultivo *in vitro* do porta-enxerto de ameixeira 'Marianna 2624'.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, T.; ABBASI, N. A.; HAFIZ, I. A.; ALI, A. Comparison of sucrose and sorbitol as main carbon energy sources in micropropagation. **Pakistan Journal of Botany**, Islamabad, v.39, n.4, p.1269-1275, 2007.

BORKOWSKA, B.; J. SZCZERBA. Influence of different carbon sources on invertase activity and growth of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) shoot cultures. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.42, n. 240, p. 911-915, 1991.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, Nova York, v.11, p113-116, 1993.

CHEONG, E. J.; AN, C. Effect of carbohydrates on in vitro shoot growth of various *Prunus* species. **Korean Journal of Plant Sciences**, Seul, v.28, n.3, p.357-362, 2015.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Berkeley: Wiley-Blackwell, 2ª ed, p.237, 2015.

HAQUE, M. S.; WADA, T.; HATTORI, K. Effects of sucrose, mannitol and KH₂PO₄ on root tip derived shoots and subsequent bulblet formation in garlic. **Asian Journal of Plant Science**, Dubai, v.2, n.12, p.903-908, 2003.

MORANDI, B.; GRAPPADELLI, L. C.; RIEGER, M.; LO BIANCO, R. Carbohydrate availability affects growth and metabolism in peach fruit. **Physiologia Plantarum**, Chichester, v.133, p.229-241, 2008.

NICOLOSO, F.T. et al. efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 84-90, 2003.

OZUDOGRU, E. A.; BENELLI, C.; DRADI, G.; LAMBARDI, M. Effect of culture container and carbohydrate content in vitro slow growth storage of the cherry rootstock 'Gisela®5'. **Acta Physiologiae Plantarum**, Varsóvia, v.39, p.1-8, 2017.

YASSEN, M.; AHMAD, G.; SABLOK, G.; STANDARDI, A.; HAFIZ, I. A. Review: role of carbon sources for in vitro plant growth and development. **Molecular Biology Reports**, Boston, v.40, p.2837-2849.