

GENES CYP707A EM MORANGO (*Fragaria x ananassa* Duch)

HUGO CARLOS BOLZON GONZALEZ¹; PEDRO REISSER²; AUDREY CHRISTINA DO NASCIMENTO³; FABIANA ROOS NORA⁴; VANESSA GALLI⁵; CESAR VALMOR ROMBALDI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – hugocarlos.bg@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – reisser.pedro@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – audreydadycn@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – fabiana.nora@me.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*) é uma espécie hortícola de importância regional nacional, tanto sob o aspecto econômico quanto nutricional. Essa espécie produz pseudofruto amplamente consumido em função das características sensoriais, principalmente, da coloração, sabor e aroma (SCHAART et al., 2013). Além disso, é rico em compostos bioativos, com destaque para os compostos fenólicos e as antocianinas (GIAMPIERI et al., 2012).

Em várias espécies vegetais, dentre elas o morangueiro, tem sido atribuído ao ácido abscísico (ABA) um papel importante nas respostas a agentes estressores abióticos. Além disso, há variações nos acúmulos de ABA nos estádios de crescimento e desenvolvimento, especialmente a maturação de frutos e pseudofrutos, tanto climatéricos quanto não climatéricos (LI et al., 2011). Estudos mostraram que este hormônio possui capacidade de induzir a produção de pigmentos associados ao processo de maturação quando aplicado exogenamente (JIA et al., 2011), sugerindo seu potencial de aplicação na biofortificação dessa espécie, bem como na sinalização do acúmulo destes compostos em situações de estresse.

Via de regra, o ABA ativo é catabolizado rapidamente em plantas superiores através de duas rotas principais sendo estas: inativação por glicosilação ou degradação oxidativa promovida pela enzima Ácido Abscísico 8'-Hidroxilase (CYP707A). Neste último caso, trata-se de uma inativação irreversível, onde o ABA é convertido a ácido faseico e este, por sua vez, a ácido dehidrofaseico. No entanto, não existem sequências completas descritas na literatura para este gene, dificultando seu estudo e aplicação. Dada a importância dos genes CYP707A, associada à falta de sequências específicas para morango identificadas e indexadas, o presente estudo tem como objetivo buscar e caracterizar possíveis sequências CYP707A em morango.

2. METODOLOGIA

Sequências de genes CYP707A das espécies *Pyrus pyrifolia*, *Prunus avium*, e *Malus x domestica* (Tabela 1) foram buscadas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e utilizadas como referência na ferramenta *MultiBlast*, do programa CLC Genomics Workbench 10 – Quiagen®, em contraste com o transcriptoma ‘in house’ de morango, a fim de identificar sequências homólogas nesta espécie.

Tabela 1. Genes utilizados como iscas para busca de *contigs* de CYP707As de morango no transcriptoma ‘in house’

Espécie	Inscrição NCBI
<i>Prunus avium</i>	>GU559990.1
<i>Prunus avium</i>	>GU559989.1
<i>Prunus avium</i>	>GU559988.1
<i>Prunus avium</i>	>GU559987.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	>JF825450.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	>LC155802.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	>KP723487.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	>KP723486.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	>KP723485.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	>KP723484.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	>KP723483.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	>KP279631.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	>KP279630.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	>KP162149.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	>KP162148.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	>KP057206.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	>JN602256.1
<i>Malus</i> <i>χ domestica</i>	>AB593331.1
<i>Malus</i> <i>χ domestica</i>	>AB593330.1

As maiores *contigs* resultantes da pesca no transcriptoma foram escolhidas e submetidas ao *ORFfinder* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) sob os parâmetros: Tamanho mínimo de ORF: 150 nucleotídeos; Código Genético: Universal; Códon Iniciador: Apenas ATG; Ignorar ORFs Sobrepostas: Não. Esta metodologia foi utilizada de modo a identificar as possíveis fases de leitura aberta (tradução de *open reading frame – ORF*) para cada um dos *contigs*.

A maior fase de leitura aberta identificada para cada *contig* foi utilizada nas ferramentas *SmartBlast* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/smartblast/smartBlast.cgi>) e *BlastP* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para analisar a existência de domínios proteicos conservados, bem como buscar identificar superdomínios de famílias proteicas em comparação com as sequencias já depositadas nos bancos de dados do *NCBI*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando a metodologia previamente descrita, foi possível identificar, no total, quatro prováveis sequências codificadoras de CYP707A em morango: CL15525Contig1; CL18454Contig1; CL17770Contig1 e CL24483Contig1. Dessas quatro sequências, uma (CL15525Contig1) corresponde à sequência que já havia sido descrita até o momento pela literatura por JIA ET AL. (2011). Assim, contribui-se para identificar três novas CYP707A em morango. Após submissão das *contigs* ao *ORFfinder* foi possível obter os dados relativos as maiores ORFs de cada *contig*, sendo observado que a *contig* CL15525Contig1 possui maior ORF enquanto a *contig* CL24483Contig1 possui a menor. Assim também foi destacado que todas as *contigs* possuíam estrutura inversa, tendo suas ORFs em sentido anti-senso, estando também fora de fase de leitura (Tabela 2).

Tabela 2. Contigs do transcriptoma com suas respectivas maiores ORFs

CONTIG	NT TOTAL ¹	FRAME	INÍCIO	FIM	NT ORF ²	AA ORF ³
CL15525Contig1	1753	-3	1670	225	1446	481
CL18454Contig1	895	-2	840	>1	840	279
CL17770Contig1	1603	-3	1520	225	1296	431
CL24483Contig1	653	-2	484	194	291	96

¹Nucleotídeos totais; ²Nucleotídeos da ORF; ³Aminoácidos da ORF.

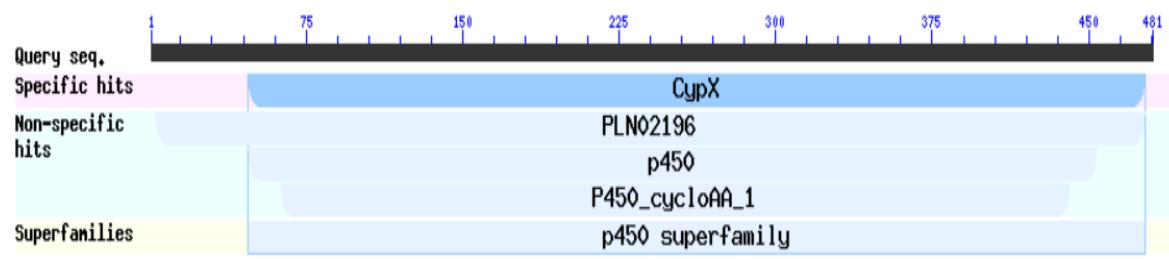
A sequência de aminoácidos prevista para a maior ORF de cada um dos contigs foi utilizada na ferramenta *SmartBlast* para verificar os acessos já depositados ao banco que apresentam maior identidade e cobertura em relação à sequência consultada. Os resultados mostram que apenas CL18454Contig1 apresentou identidade e cobertura maior com uma sequência de CYP707A de *Arabidopsis thaliana* enquanto que as outras contigs mostraram maior similaridade a sequências de *Glycine max*. O alinhamento destas sequências também permitiu sugerir que as contigs CL15525Contig1 e CL17770Contig1 possam tratar-se de CYP707A completas, visto que apresentam comprimento similar aos acessos depositados no Genbank para outras espécies. As descrições de identidade apresentadas para as ORFs das quatro contigs trabalhadas indica que todas se assemelham ao Ácido Abscisíco 8'-Hidroxilase 4, como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3. Consulta ao *SmartBlast* utilizando a maior ORF de cada uma das contigs

CONTIG	MATCH	DESCRÍÇÃO	COBERTURA	IDENTIDADE	E-VALUE
CL15525Contig1	<i>Glycine max</i>	<i>abscisic acid 8'-hydroxylase 4-like</i>	99%	71%	0.0
CL18454Contig1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 4</i>	100%	73%	1e-154
CL17770Contig1	<i>Glycine max</i>	<i>abscisic acid 8'-hydroxylase 4</i>	99%	64%	0.0
CL24483Contig1	<i>Glycine max</i>	<i>abscisic acid 8'-hydroxylase 4</i>	97%	80%	1e-50

Utilizando as mesmas sequências aminoacídicas foi realizada uma pesquisa no *BlastP* onde possíveis domínios conservados apareceram no sumário gráfico. Expandindo os resultados, foi possível observar que, para todas as quatro CYP707A, a superfamília p450 estava presente, bem como uma homologia específica ao grupamento CypX, como ilustrado na Figura 1, referente ao contig CL15525Contig1.

Figura 1. Ilustração dos grupamentos das superfamílias p450 e CypX presentes na maior ORF da contig CL15525Contig1.



4. CONCLUSÕES

De fato, não há conclusões. A estratégia utilizada permitiu realizar a identificação e caracterização inicial de novas possíveis sequências CYP707As em morango. Acredita-se que a metodologia utilizada, embora tenha sido capaz de realizar tais identificações, possa ser aprofundada de modo a melhorar seu refinamento ao analisar outras sequências presentes no transcriptoma ‘in house’, sendo ainda possível descobrir e caracterizar novas sequências ainda não descritas na literatura. No entanto, para se chegar a conclusões, há que se validar o conhecimento gerado, em ensaios biológicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SCHAART, J. G., DUBOS, C., ROMERO DE LA FUENTE, I., VAN HOUWELINGEN, A. M. M. L., DE VOS, R. C. H., JONKER, H. H., XU, W., ROUTABOUL, J.-M., LEPINIEC, L. AND BOVY, A. G. Identification and characterization of MYB-bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits. **New Phytologist**, v. 197, p. 454-467, 2013
- GIAMPIERI, F.; TULIPANI, S.; ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; QUILES, J.; MEZZETTI, B.; BATTINO, M. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. **Nutrition**, v. 28, n. 1, p. 9–19, 2012.
- LI, C.; JIA, H.; CHAI, Y.; SHEN, Y. Abscisic acid perception and signaling transduction in strawberry - A model for non-climacteric fruit ripening. **Plant Signaling & Behavior**, v.6, p.1950-1953, 2011.
- JIA, H.F.; CHAI, Y.M.; LI, C.L.; LU, D.; LUO, J.J.; QIN, L.; SHEN, Y.Y. Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. **Plant Physiology**, v.157, p.188–199, 2011.