

IDENTIFICAÇÃO E REGULAÇÃO PÓS-TRANSCRICIONAL DE GENES SOD EM *Fragaria x ananassa*.

IGOR POLETTI¹; **ROSANE LOPES CRIZEL**²; **VANESSA GALLI**³

¹*Universidade Federal de Pelotas – igorpoletti96@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – rosanecrizel@gmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – vane.galli@yahoo.com.br*

1. INTRODUÇÃO

O morango comercial (*Fragaria x ananassa*) é uma espécie híbrida octaplóide resultante do cruzamento entre a *Fragaria virginiana* (HOKANSON et al., 2007). As cultivares 'Oso Grande' (no Sudeste) e 'Camarosa', 'Aromas' e 'Albion' (no Sul) são amplamente cultivadas (ANTUNES, 2016), com uma produção nacional que ultrapassa 139 mil toneladas (IBGE, 2017).

Embora seja botanicamente considerado um pseudofruto, o morango é comumente chamado de fruto, e é muito apreciado devido às suas características sensoriais distintas, como cor, sabor e aroma (SCHAART et al., 2013). Além disso, o morango é reconhecido por sua riqueza em compostos bioativos, como fenilpropanóides, antocianinas, minerais essenciais e vitamina C (SCHAART et al., 2013), conferindo-lhe propriedades benéficas à saúde, como antioxidantes, anti-inflamatórias, dentre outras atividades, tornando-o um alimento funcional altamente nutritivo (AFRIN et al., 2016; KHOO et al., 2017).

Estresses bióticos (como patógenos e herbívoros) e abióticos (como altas temperaturas e seca) afetam o desenvolvimento e a produtividade do morangueiro, pois resultam na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (FOYER & NOCTOR, 2011). Essas EROs desempenham um papel importante nas respostas de defesa e adaptação da planta. O equilíbrio entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes é fundamental para a saúde das plantas e afeta diretamente a produção de frutos.

Neste contexto, a enzima superóxido dismutase (SOD) é responsável por converter o superóxido, uma ERO prejudicial, em oxigênio e peróxido de hidrogênio, que são menos tóxicos (MITTLER et al., 2011), ajudando a proteger as células contra danos oxidativos causados pelos EROs gerados em resposta aos estresses (JIN et al., 2009; LIGHTFOOT et al., 2017). Estudos têm demonstrado a existência de diferentes isoformas de SOD encontradas em plantas, incluindo a Cu-ZnSOD, MnSOD e FeSOD, possuindo características distintas em termos de estrutura e atividade enzimática, e pode estar localizada em diferentes compartimentos celulares, como o citoplasma, apoplastos, cloroplasto, mitocôndria e peroxissomo, refletindo a necessidade de proteção antioxidante em diferentes organelas (TYAGI et al., 2019). Em alguns estudos já se tem conhecimento da existência de SOD em *Fragaria vesca* (ZHANG et al., 2019; WANG et al., 2021); entretanto, em *Fragaria x ananassa* não é encontrado na literatura estudos de identificação e caracterização estrutural destas sequências, ou do perfil de expressão transcrecional em nenhuma condição. A ação das enzimas SOD é dependente do seu nível transcrecional e pode ser regulado a nível transcrecional e pós-transcrecional, dentre os mecanismos de regulação pós-transcrecional existem os miRNAs que são pequenas sequências de RNA que atuam como reguladores negativos da expressão gênica porque se ligam a RNAs mensageiros alvos

promovendo inibição da tradução ou a sua degradação (SUN, 2012; HE *et al.*, 2022). Portanto, o objetivo deste estudo é identificar as SODs de *Fragaria x ananassa* e predizer os miRNAs atuantes na regulação pós-transcricional de genes *FaSOD*.

2. METODOLOGIA

Para encontrar os genes putativos de *FaSOD* foi utilizado o banco de dados *Fragaria_x_ananassa_Reference_Genome_v1.0_FANhybrid_r1.2_gene.gff3*, disponível no Genome Database for Rosaceae (GDR) (<https://www.rosaceae.org/>) e os bancos de RNA seq *in house*, que estão depositados no GEO (Gene Expression Omnibus), sob o número SRA: SRP082122. Treze sequências previamente caracterizadas de *Arabidopsis thaliana*, disponíveis no banco de dados NCBI foram utilizados como iscas no programa CLC Genomics Workbench para identificar sequências SOD em *Fragaria x ananassa*. Sequências homólogas foram identificadas através do programa BLASTX e VECTOR NTI 10 e as sequências putativas foram traduzidas em peptídeos a partir do 'open reading frame' utilizando a ferramenta ORFFinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). No caso de sequências com 100% de homologia, foi mantida apenas a sequência de maior tamanho. A ferramenta ProtParam (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) foi utilizada para se obter informações de propriedades moleculares, como peso molecular, ponto isoelétrico, índice de instabilidade da proteína, bem como parâmetros físico-químicos. Para realização da predição da localização celular foi utilizada a ferramenta DeepLoc 1.0 server (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepLoc-1.0/>). Os miRNAs responsáveis pela regulação pós-transcricional dos genes *FaSODs* identificados foram preditos pela ferramenta online psRNATarget (<https://www.zhaolab.org/psRNATarget/analysis>) (DAI. ZHAO, 2011).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificadas sete sequências putativas de genes *FaSOD* no morango, categorizadas em três grupos: Cu/Zn-SOD, Fe-SOD e Mn-SOD. Essas proteínas apresentam variações em suas propriedades. A análise do índice de instabilidade mostrou que a maioria das *FaSODs* é estável. As diferentes sequências apresentaram variações em relação ao comprimento e peso molecular, com a *FaSOD6* sendo a maior sequência com 263 aminoácidos e 30,26 kDa, e a *FaSOD7* sendo a menor, com 152 aminoácidos e 15,22 kDa. O ponto isoelétrico (pI) variou de 4,58 a 7,90, sugerindo diferentes propriedades de carga dessas proteínas.

Foram identificadas diferentes isoformas de SOD em *F. ananassa*, cada uma com funções específicas em diversos compartimentos celulares. As Cu/Zn-SODs estão presentes no citoplasma e peroxissomo, onde desempenham um papel vital na detoxificação do superóxido e na resposta a estresses ambientais. As Fe-SODs são encontradas nos cloroplastos e protegem contra o estresse oxidativo durante a fotossíntese. As Mn-SODs estão localizadas na mitocôndria, onde preservam o equilíbrio redox e a função respiratória. Essa diversidade de SODs reflete a complexidade do sistema antioxidante da planta, permitindo sua adaptação a diferentes estresses, como estresse salino, hídrico ou patogênico.



Tabela 1 – Informações sobre as sequências de SODs identificadas em *F. ananassa*.

Nome	CDS (nt)	aa	Peso Molecular (kDa)	pl	Índice de instabilidade	Parâmetros físico-químicos	Localização celular
FaSOD1	585	194	20,01	6,85	25,51	Ácido	Peroxissomo
FaSOD2	654	217	22,07	6,02	15,99	Ácido	Plastídeo
FaSOD3	519	172	19,73	4,58	46,12	Ácido	Citoplasma
FaSOD4	690	229	25,03	7,90	29,82	Básico	Mitocôndria
FaSOD5	687	228	26,53	4,79	49,85	Ácido	Citoplasma
FaSOD6	792	263	30,26	6,79	40,91	Ácido	Plastídeo
FaSOD7	459	152	15,22	5,77	24,44	Ácido	Citoplasma

Quanto à regulação pós-transcricional, o estudo revelou a presença de vários miRNAs (miR319c, miR838, miR482c, miR5015b.1 e miR858) que têm o potencial de regular os genes SOD em *F. ananassa*. Cada um desses miRNAs desempenha um papel específico na regulação pós-transcricional das FaSODs, variando em termos de mecanismo de ação (clivagem ou tradução). Essa diversidade sugere que as FaSODs são alvos de uma rede complexa de regulação em resposta a diversos estímulos ambientais e hormonais. Portanto, esses miRNAs desempenham um papel crucial na modulação da resposta antioxidante e na manutenção do equilíbrio redox da planta em diferentes contextos.

Tabela 2 – miRNAs responsáveis pela regulação pós-transcricional de genes SOD.

Nome	miRNA	Expect	Tipo de inibição
FaSOD1	miR319c	5.0	Tradução
FaSOD2			
FaSOD3	miR838	4.0	Clivagem
	miR482c	5.0	Clivagem
FaSOD4	miR5015b.1	5.0	Clivagem
FaSOD5	miR838	5.0	Clivagem
FaSOD6	miR858	5.0	Tradução
FaSOD7			

4. CONCLUSÕES

Foram identificadas sete FaSODs as quais diferiram quanto às características físico-químicas e localização subcelular e são reguladas por cinco miRNAs (miR319c, miR838, miR482c, miR5015b.1 e miR858). O estudo sobre as superóxidos dismutases (SODs) em *Fragaria x ananassa* demonstra uma relevância significativa para a biotecnologia vegetal e o avanço tecnológico e a caracterização dessas enzimas, podendo nos levar a novas aplicações tecnológicas, como o desenvolvimento de morangueiros geneticamente

modificadas com maior resistência ao estresse oxidativo causado por diversos estresses.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFRIN, Sadia *et al.* Promising health benefits of the strawberry: a focus on clinical studies. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 22, p. 4435-4449, 2016.

ANTUNES, L.E.C. Morangueiro. Brasília-DF: Embrapa, 2016.

DAI X, ZHAO PX. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. **Nucleic Acids Res.** 2011 Jul

HE M, KONG X, JIANG Y, QU H, ZHU H. MicroRNAs: emerging regulators in horticultural crops. **Trends Plant Sci.** 2022

JIN, Xiaoli *et al.* Genotypic difference in response of peroxidase and superoxide dismutase isozymes and activities to salt stress in barley. **Acta Physiologae Plantarum**, v. 31, p. 1103-1109, 2009.

K.E. HOKANSON, M.J. SMITH, A.M. CONNOR, J.J. LUBY, and J.F. HANCOCK. 2007. Relationships among subspecies of New World octoploid strawberry species, *Fragaria virginiana* and *Fragaria chiloensis*, based on simple sequence repeat marker analysis. **Canadian Journal of Botany**. 84(12): 1829-1841.

KHOO, Hock Eng *et al.* Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. **Food & nutrition research**, v. 61, n. 1, p. 1361779, 2017.

LIGHTFOOT, Damien J.; MCGRANN, Graham RD; ABLE, Amanda J. The role of a cytosolic superoxide dismutase in barley-pathogen interactions. **Molecular plant pathology**, v. 18, n. 3, p. 323-335, 2017.

MITTLER, Ron *et al.* ROS signaling: the new wave?. **Trends in plant science**, v. 16, n. 6, p. 300-309, 2011.

NOCTOR, G., QUEVAL, G., MHAMDI, A., CHAOUCH, S., & Foyer, C. H. (2011). Glutathione. **Arabidopsis Book**, 9, e0142.

SCHAART, Jan G. *et al.* Identification and characterization of MYB-b HLH-WD 40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria ananassa*) fruits. **New phytologist**, v. 197, n. 2, p. 454-467, 2013.

SUN, G. MicroRNAs and their diverse functions in plants. **Plant Mol Biol** 80, 17–36 (2012)

TYAGI, Shivi *et al.* Role of superoxide dismutases (SODs) in stress tolerance in plants. **Molecular Approaches in Plant Biology and Environmental Challenges**, p. 51-77, 2019.

WANG S, SHI M, ZHANG Y, XIE X, SUN P, FANG C, ZHAO J. FvMYB24, a strawberry R2R3-MYB transcription factor, improved salt stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. **Biochem Biophys Res Commun**. 2021

ZHANG S, TONG Y, LI Y, CHENG ZM, ZHONG Y. Genome-wide identification of the HKT genes in five Rosaceae species and expression analysis of HKT genes in response to salt-stress in *Fragaria vesca*. **Genes Genomics**. 2019.