



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DE CHAPADINHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

ÉVELYN SILVA DE AGUIAR

CARACTERIZAÇÃO E PERFIL DE EXPRESSÃO DE FAMÍLIAS GÊNICAS
ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DO ASCORBATO EM PIMENTEIRA
(*Capsicum annuum* L.)

Chapadinha – MA

2024

ÉVELYN SILVA DE AGUIAR

**CARACTERIZAÇÃO E PERFIL DE EXPRESSÃO DE FAMÍLIAS GÊNICAS
ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DO ASCORBATO EM PIMENTEIRA
(*Capsicum annuum* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, do Centro de Ciências de Chapadinha, da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Área de concentração: Meio Ambiente e Recursos Naturais

Linha de pesquisa: Produção agrícola e desenvolvimento sustentável

Orientador: Prof. Dr. Clesivan Pereira dos Santos

Chapadinha – MA

2024

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Aguiar, Evelyn Silva de.

Caracterização e perfil de expressão de famílias gênicas envolvidas no metabolismo do ascorbato em pimenteira (*Capsicum annuum* L.) / Evelyn Silva de Aguiar. -2024.

159 f.

Orientador(a): Clesivan Pereira dos Santos.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais/ccch, Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha, 2024.

1. Ácido ascórbico. 2. *Capsicum*. 3. Perfil transcricional. 4. Regulação metabólica. I. Santos, Clesivan Pereira dos. II. Título.

ÉVELYN SILVA DE AGUIAR

**CARACTERIZAÇÃO E PERFIL DE EXPRESSÃO DE FAMÍLIAS GÊNICAS
ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DO ASCORBATO EM PIMENTEIRA
(*Capsicum annuum* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, do Centro de Ciências de Chapadinha, da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Área de concentração: Meio Ambiente e Recursos Naturais

Linha de pesquisa: Produção agrícola e desenvolvimento sustentável

Orientador: Prof. Dr. Clesivan Pereira dos Santos

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Clesivan Pereira dos Santos (orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Samuel Vieira Brito (membro interno)
Universidade Federal do Maranhão

Dra. Thais Andrade Germano (membro externo)
Universidade Federal do Ceará

Chapadinha – MA

2024

*Dedico à minha família e a todas as
pessoas que direta ou indiretamente
contribuíram para a realização dessa
pesquisa.*

AGRADECIMENTOS

Esses dois anos de mestrado foram de um enorme aprendizado e crescimento não só na perspectiva acadêmica, mas principalmente na minha trajetória pessoal. A providência de Deus foi mais uma vez surpreendente por colocar em minha vida pessoas generosas, que dispensaram um tempo das suas vidas para de alguma forma me ajudar. A elas, minha gratidão.

Agradeço de modo especial ao Prof. Dr. Clesivan Pereira dos Santos, pela primorosa orientação, por sua solicitude desde o primeiro momento, quando manifestei interesse em realizar o mestrado sob sua orientação. Sua inteligência, educação e paciência para lidar com as limitações alheias são admiráveis. Serei para sempre grata!

Ao Prof. Dr. Samuel Vieira Brito, por ter aceitado o convite para participar da banca de defesa, por seu tempo dedicado à leitura do meu trabalho. Agradeço ainda pelo apoio no cumprimento do componente curricular Estágio de Docência, que realizei em sua disciplina.

À Dra. Thais Andrade Germano, por ter aceitado o convite para participar da banca de defesa, por seu tempo dedicado à leitura do meu trabalho e colaboração desde quando ele era um projeto.

Ao Prof. Dr. Pedro Augusto de Oliveira Morais e à Prof. Dra. Luma Castro de Souza, que se disponibilizaram para serem os membros suplentes da banca.

Agradeço também ao Prof. Dr. José Hélio Costa, da Universidade Federal do Ceará, por seu apoio no processo de publicação do primeiro artigo da minha dissertação, bem como aos demais coautores, pelas contribuições.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa em Genômica de Plantas, egressos e atuais: Abigailde Dias, Francisco Victor Sousa, Jaqueline Bastos, Myllena Almeida e Raquel Sousa.

Ao Prof. Dr. Nítalo André Farias Machado e aos demais integrantes do Grupo Inovar, pela agradável convivência que tivemos durante os meses em que compartilhamos o mesmo laboratório.

Ao querido Daniel Lobo, pela sincera amizade que construímos em tão pouco tempo de convivência, pelas longas conversas e momentos divertidos que passamos juntos.

A todos os meus colegas de mestrado (turma de 2022), dos quais cito o Maciel Garreto e o Pedro Victor Cardoso, que estão comigo desde a graduação, são pessoas muito queridas.

À Universidade Federal do Maranhão, minha instituição formadora. Agradeço aos funcionários do CCCh, que são sempre muito solícitos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais (PPGCAM), pela oportunidade de realização do mestrado. Agradeço ao corpo docente pelos conhecimentos transmitidos. Devo também reconhecer e agradecer ao Prof. Dr. Felipe Ottoni, por seu dedicado e ágil trabalho enquanto coordenador do programa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

Ao Instituto Hesed, que me acompanhou em tantos momentos desde o processo seletivo até a elaboração dessa dissertação, por meio das *lives* oracionais.

Agradeço aos meus pais, Valdivan e Elizangela, e aos meus irmãos, Wesley e Lara Beatriz, por todo amor, cuidado e incentivo aos meus estudos.

Eu agradeço a Deus por absolutamente tudo. Esse trabalho do início ao fim é consagrado a Ele, assim como toda a minha vida.

“É justo que muito custe o que muito vale.”

Santa Teresa d' Ávila

RESUMO

O ascorbato (ASC, vitamina C) é um antioxidante e cofator enzimático crucial para animais e plantas. No entanto, não é sintetizado por humanos, sendo sua aquisição primariamente proveniente de vegetais. A ação antioxidante do ASC em plantas reduz o excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas em condições fisiológicas normais, e sobretudo diante de estresses ambientais, de forma não enzimática e enzimática através do ciclo ascorbato-glutationa (ASC-GSH). *Capsicum annuum* L. engloba várias cultivares de pimenteiras, cujos frutos são amplamente consumidos e reconhecidos pelo elevado conteúdo de ASC. No entanto, os mecanismos regulatórios envolvidos no metabolismo desse micronutriente ainda são pouco esclarecidos nessa espécie. Dessa forma, o presente estudo, organizado em três capítulos, objetivou avançar na compreensão do metabolismo do ASC em *C. annuum*. O primeiro capítulo apresenta uma revisão de literatura sobre a produção e os efeitos das EROs nas células, os mecanismos antioxidantes de defesa das plantas, bem como sobre o papel e o metabolismo do ASC. Os dois capítulos seguintes apresentam uma investigação da expressão dos genes que codificam para a sua biossíntese (capítulo 2) e para o ciclo ASC-GSH (capítulo 3). Foram conduzidas análises *in silico*, com a coleta de dados genômicos e de nove bioprojetos de RNA-Seq representativos do desenvolvimento do fruto, exposição da planta a estresses bióticos e abióticos e a fitormônios. No total, foram identificados 21 genes codificando para as quatro vias de biossíntese de ASC em pimenteira. Os dados de expressão confirmaram o papel principal da via da L-galactose nas diferentes condições analisadas, enquanto genes de vias alternativas parecem ter algum papel coadjuvante sob situações específicas de estresse e exposição a fitormônios. Os membros *GGP2*, *GME1* e *2*, e *GalLDH* destacaram-se como promissores alvos regulatórios. Em relação ao ciclo ASC-GSH, foram identificados 14 genes codificando para isoenzimas atuantes em diferentes compartimentos subcelulares. O perfil de expressão evidenciou os genes *APX3* e *5*, da via de oxidação, como os mais expressos nas diferentes condições analisadas, acompanhados por *APX2* e *6* no fruto vermelho maduro e *APX4* em tratamentos de estresse abiótico e fitormônios. Quanto à via de reciclagem, os membros *MDHAR3*, *DHAR2* e *GR2* foram mais responsivos nas diferentes condições de estresse analisadas. Em suma, esses resultados fornecem um melhor entendimento sobre a regulação transcricional do metabolismo do ASC em *C. annuum*, e traçam um caminho para futuras investigações que visem a biofortificação de culturas com baixo conteúdo de ASC, promovendo assim o aumento do valor nutricional e da tolerância a estresses ambientais.

Palavras-chave: ácido ascórbico, *Capsicum*, perfil transcricional, regulação metabólica.

ABSTRACT

Ascorbate (ASC, vitamin C) is an antioxidant and enzyme cofactor essential for animals and plants. However, it is not synthesized by humans and its acquisition is primarily obtained from vegetables. The antioxidant action of ASC in plants reduces the excess of reactive oxygen species (ROS) generated under normal physiological conditions and especially in face of environmental stresses, through non-enzymatical and enzymatical responses involving the ascorbate-glutathione (ASC-GSH) cycle. *Capsicum annuum* L. includes several hot and bell peppers cultivars, which are widely recognized and consumed fruits due its high ASC content. However, the regulatory mechanisms involved in the metabolism of this micronutrient are still poorly understood in this species. Thus, this study, divided into three chapters, aims to advance on understanding of ASC metabolism in *C. annuum*. The first chapter presents a literature review about the production and effects of ROS, the antioxidant plant defense mechanisms, as well as the role and metabolism of ASC. The next two chapters examine the expression of the genes encoding to its biosynthesis (chapter 2) and the ASC-GSH cycle (chapter 3). *In silico* analyses were performed by collecting genomic data and nine RNA-Seq bioprojects representatives of fruit development, plant exposure to biotic and abiotic stresses, and phytohormones. A total of 21 genes encoding enzymes of the four proposed ascorbate biosynthesis pathways in pepper were identified. The expression data confirmed the major role of the L-galactose pathway in the different conditions analyzed, while genes from alternative pathways seem to play a supporting role under specific situations of stress and exposure to phytohormones. The members *GGP2*, *GME1* and 2, and *GalLDH* emerged as promising regulatory targets. In relation to the ASC-GSH cycle, 14 genes were identified to encode isoenzymes acting in different subcellular compartments. The expression profile showed that *APX3* and 5, from the oxidation pathway, were the most highly expressed genes in the different conditions analyzed, followed by *APX2* and 6 in ripe red fruits and *APX4* under abiotic stress and phytohormone treatments. Regarding the recycling pathway, *MDHAR3*, *DHAR2* and *GR2* members were more responsive under the different stress conditions analyzed. In conclusion, these results provide a better understanding on the transcriptional regulation of ASC metabolism in *C. annuum* and trace a path for future investigations aiming at the biofortification of crops with low ASC content, thus promoting increased nutritional value and tolerance to environmental stresses.

Keywords: ascorbic acid, *Capsicum*, transcriptional profile, metabolic regulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura das formas reduzida (AsA) e oxidada (DHA) de vitamina C	15
Figura 2 - Esquema das reações do ciclo ascorbato-glutationa.....	21
Figura 3 - (A) Cultivar de pimenta <i>C. annuum</i> do tipo ‘Jalapeño’; (B) cultivar do tipo ‘Cayenne’; (C) morfologia do fruto de <i>C. annuum</i> (pimentão).....	23
Figura 4 - Desenvolvimento de frutos de <i>C. annuum</i> . A – Variedades de pimentas 1: ‘SJ11-3’ e 2: ‘06g19-1-1-1’, nos estádios verde imaturo (VdI; 20 DAA (dias após a antese)); verde maduro (VdM; 30 DAA); breaker (Br; 40 DAA) e vermelho maduro (VoM; 50 DAA). B – Pimentões (<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>) nos estádios imaturo 1 (IM1; 35 DAC (dias antes da colheita)); IM2 (35-25 DAC); IM3 (15-25 DAC); IM4 (15 DAC); breaker (BR; 7 DAC) e maduro (M; ponto de colheita).....	25

LISTA DE SIGLAS

AAs	Ácido ascórbico
AO	Ascorbato oxidase
APX	Ascorbato peroxidase
ASC	L-ascorbato
ASC-GSH	Ascorbato-glutationa
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	<i>Base pairs</i> /pares de base
BP	<i>Breaking point</i>
BR	<i>Breaker</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i> /DNA complementar
°C	Graus Celsius
Ca	<i>Capsicum annuum</i>
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de carbono
CPM	Contagem por milhão
DAA	Dias após a antese
D-GalUR	D-galacturonato redutase
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> /ácido desoxirribonucleico
DHA	Dehidroascorbato
DHAR	Dehidroascorbato redutase
DPI	Dias pós-inoculação
EROs	Espécies reativas de oxigênio
g	Gramma
GalDH	L-galactose desidrogenase
GalLDH	L-galactono-1,4-lactona desidrogenase
Gb	Gigabase
GGP	GDP-L-galactose fosforilase
GME	GDP-D-manose-3', 5'-epimerase
GMP	GDP-D-manose pirofosforilase
GPP	L-galactose-1-fosfato-fosfatase

GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
GSSH	Glutathione disulfide
h	Hour
H ₂ O	Water
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
MDHA	Monodehydroascorbate
MDHAR	Monodehydroascorbate reductase
MF	Fresh mass
mg	Milligram
MIOX	Mio inositol oxygenase
mM	Millimolar
NADPH	<i>Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NO	<i>Nitric oxide</i> /Óxido nítrico
O ₂	Oxygen
ONU	United Nations Organization
p	p-value
pKa	Dissociation potential
pH	Hydrogen ion potential
PMI	Fosfomanose isomerase
PMM	Fosfomanose mutase
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> /ácido ribonucleico
RNA-Seq	RNA Sequencing
SRA	<i>Sequence Read Archive</i>
UTR	<i>Untranslated region</i> /Região não traduzida
VdI	Immature green
VdM	Mature green
VoM	Mature red
μmol/L	Micromolar

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	11
1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
1.1 Estresses ambientais e desafios à produção agrícola	11
1.2 Relação entre espécies reativas de oxigênio e compostos antioxidantes	13
1.3 Ácido ascórbico/Ascorbato	15
1.3.1 <i>Biossíntese do ascorbato</i>	17
1.3.2 <i>Ciclo Ascorbato-Glutationa</i>	20
1.4 <i>Capsicum annuum</i> L.	21
1.4.1 <i>Desenvolvimento de frutos de C. annuum</i> L.	24
1.4.2 <i>Ascorbato em C. annuum</i> L.	25
1.5 Genômica funcional e Desenvolvimento Sustentável	26
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3 HIPÓTESE	30
REFERÊNCIAS	31
 CAPÍTULO II.....	 42
1. Introduction	45
2. Results	48
2.1 <i>Identification and Characterization of Genes Encoding Ascorbate Biosynthesis Enzymes</i>	48
2.2 <i>Expression Profile of Genes of Ascorbate Biosynthesis Enzymes during Fruit Development</i>	50
2.3 <i>Expression Profile of Genes of Ascorbate Biosynthesis Enzymes under Abiotic Stresses</i>	54
2.4 <i>Expression Profile of Genes of Ascorbate Biosynthesis under Biotic Stresses</i>	58
2.5 <i>Expression Profile of Genes of Ascorbate Biosynthesis Enzymes under Phytohormones Treatments</i>	61
2.6 <i>Cis-Acting Elements in the Promoter Region of Genes Involved in Ascorbate Biosynthesis</i>	62
3. Discussion	63

4. Materials and Methods	70
4.1 <i>Identification and Annotation of Genes Involved in Ascorbate Biosynthesis</i>	70
4.2 <i>Gene Expression Analyses Using Capsicum annuum RNA-Seq Experiments</i>	71
4.3 <i>Searches for Regulatory Cis-Elements in Genes Promoter Regions</i>	72
4.4 <i>Statistical Analysis</i>	72
5. Conclusions	72
References	74

CAPÍTULO III	82
1. Introdução	84
2. Material e Métodos	86
2.1 <i>Anotação dos genes envolvidos no ciclo ascorbato-glutationa</i>	86
2.2 <i>Predição da localização subcelular de proteínas</i>	87
2.3 <i>Seleção de dados transcriptômicos e análise da expressão gênica</i>	87
2.4 <i>Identificação de elementos cis na região promotora dos genes</i>	88
2.5 <i>Análise estatística</i>	88
3. Resultados	88
3.1 <i>Identificação e caracterização de genes codificando para o ciclo ASC-GSH no genoma de C. annuum L.</i>	88
3.2 <i>Predição da localização subcelular das proteínas AO, APX, DHAR, MDHAR e GR de C. annuum L.</i>	91
3.3 <i>Perfil de expressão dos genes codificando para o ciclo ASC-GSH durante o desenvolvimento do fruto</i>	91
3.4 <i>Perfil de expressão de genes codificando para o ciclo ASC-GSH em pimenteiras sob estresse abiótico</i>	96
3.5 <i>Perfil de expressão de genes codificando para o ciclo ASC-GSH em pimenteiras sob estresse biótico</i>	101
3.6 <i>Perfil de expressão de genes do ciclo ASC-GSH em pimenteiras tratadas com fitormônios</i>	104
3.7 <i>Análise dos elementos de ação cis na região promotora de genes do ciclo ASC-GSH e AO</i>	106
4. Discussão	107
5. Conclusão	114
Referências	115

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	123
APÊNDICES	124
ANEXO.....	153