

## EXPRESSÃO TRANSCRICIONAL DE GENES CODIFICADORES DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NA BIOSÍNTESE DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM TOMATE TRATADOS COM RADIAÇÃO UV-C

**TAVARES, Ícaro Borges<sup>1</sup>; TIECHER, Aline<sup>2</sup>; ZIMMER, Gustavo<sup>3</sup>; ROMBALDI, Cesar Valmor<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Graduando em Agronomia, Bolsista de Iniciação Científica-CNPQ; <sup>2</sup>Doutoranda em Ciência e Tecnologia Agroindustrial; <sup>3</sup>Graduando em Agronomia FAEM/UFPEL, <sup>3</sup>Bolsista de Iniciação Científica CNPq <sup>4</sup>Professor Titular DCTA-FAEM. Universidade Federal de Pelotas-Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial. E-mail: icarob.tavares@yahoo.com.br

### 1 INTRODUÇÃO

Durante o amadurecimento do fruto, a transição de cloroplastos para cromoplastos é umas das alterações mais perceptíveis (BARSAN et al., 2010). É nos cromoplastos que os carotenóides responsáveis pela coloração vermelha típica do tomate são armazenados. A enzima acetil-CoA carboxilase consiste em quatro subunidades, sendo que três são codificadas no genoma nuclear (AccA, AccB, AccC) e uma codificada no genoma plastidial (AccD) (KAHLAU; BOCK, 2008). Esta enzima está associada à biossíntese de ácidos graxos durante a maturação dos frutos para proporcionar o acúmulo de carotenóides.

Vários trabalhos evidenciam o uso da radiação UV-C como potente agente estressor capaz de ativar mecanismos de defesa dos tecidos vegetais (CHARLES et al., 2008; ERKAN et al., 2008; LIU et al., 2009). Desse modo, a radiação UV-C pode promover incremento na biossíntese de carotenóides nos frutos.

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da radiação UV-C na expressão de genes relacionados com a biossíntese de ácidos graxos que proporcionam o acúmulo de carotenóides nos frutos.

### 2 MATERIAL E MÉTODOS

Tomates da cultivar Flavortop<sup>®</sup>, cultivados em casa de vegetação no Campus Capão do Leão da Universidade Federal de Pelotas foram coletados no estádio de maturação *breaker* e submetidos à radiação UV-C imediatamente após a colheita com auxílio de um equipamento dotado de 4 lâmpadas germicidas, (Phillips<sup>®</sup> 30W), as quais ficaram a uma distância de 60 cm dos frutos. A intensidade da radiação emitida foi determinada com um medidor de luz ultravioleta digital (RS-232 Modelo MRUR-203, Instrutherm). Os frutos foram submetidos a uma dose de 3,7 kJ m<sup>-2</sup> por 16 minutos sendo que a cada 4 minutos era feito uma movimentação de 180° para que todas as partes do fruto tivessem a mesma radiação. Após este tratamento os frutos foram acondicionados no escuro a temperatura de 20° a 22°C por 7 dias. Para relacionar os efeitos da radiação UV-C com o hormônio etileno, frutos foram submetidos a um tratamento com o 1-metilciclopropeno, (1-MCP), já que a ação do UV-C atua na síntese desse hormônio. Assim tiveram-se os seguintes tratamentos: controle, UV-C,1-MCP; e 1-MCP + UV-C. As coletas para as análises foram realizadas no momento da colheita, um dia e sete dias após os tratamentos.

A extração de RNA's totais foi feita utilizando *PureLink™ Plant Reagent* (Invitrogen), seguido de digestão com DNase I™ (Invitrogen). O cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA usando *SuperScript III RT™* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. As reações de qPCR foram analisadas através do equipamento *7500 Fast Real Time PCR System* (Applied Biosystems), a partir de 1 µL do cDNA (diluído 5 vezes) e 2 mM de *primers forward* e *reverse*, usando *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) em um volume total de 20 µL. As amostras foram depositadas em placas de 96 poços, cobertas com adesivo ótico. Os parâmetros de temperatura para a reação de qPCR foram: 50°C, por dois minutos; 95°C, por dez minutos, 40 ciclos de três etapas: 95°C, por 30 segundos; 57°C, durante um minuto e; 72°C, por um minuto, com extensão final de 72°C, por cinco minutos, a qual foi seguida pela curva padrão de dissociação, para verificar a especificidade dos *primers* utilizados. As sequências de nucleotídeos para tomate foram obtidas no *Sol Genomics Network* e *National Center for Biotechnology Information*, usando *Vector™* (Invitrogen, Carlsbad, CA, E.U.A.) para desenhar os *primers* gene-específicos (Tab. 1). Os critérios de seleção foram os seguintes: tamanho 18 e 20 pb; temperatura de anelamento entre 60-65°C; percentual de bases CG entre 40 e 60%; tamanho médio dos fragmentos amplificados entre 50 e 150 pb, e não mais de duas bases C ou G entre os cinco últimos nucleotídeos da extremidade 3'. A eficiência de amplificação de cada par de *primers* foi calculada a partir da seguinte equação:  $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ .

Par a cada amostra, o valor de Ct (*threshold cycle*) foi obtido e a expressão relativa foi calculada usando a expressão  $ER = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001). A expressão foi analisada usando *Multi Experimental Viewer* (MeV), *EASE Expression Analysis Systematic Explorer* Ver. 4.6, e apresentando o diagrama de cor usando o controle 0 como calibrador.

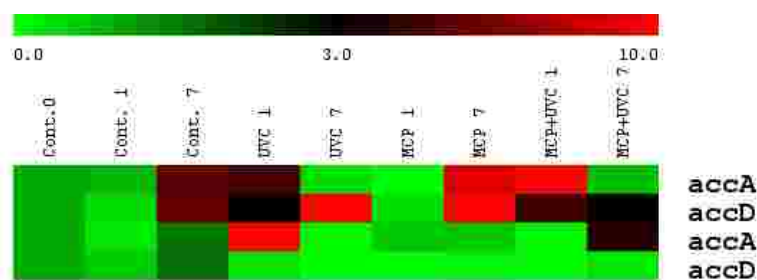
Tabela 1. Primers usados para qPCR

Genes	Número de Acesso	Forward	Reverse
Acetil-CoA carboxilase A (accA)	GI 225315532	GTGGTGACATGCTGATCCGTA	GGAAGCCACCAAGTTTTTCGGAA
Acetil-CoA carboxilase D (accD)	ID 9284	TGCCGAACCCAAATGCCTACAT	TCAGCTGCTTGTGAACCTTCGG
Controle endógeno Actina (ACT)	GI 47105122	GGTCGGAATGGGACAGAAGGAT	ACAGGGTGTTCCTCAGGAGCAA

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene que codifica para a *AccA*, no genoma nuclear, sofreu incremento na expressão transcricional no epicarpo e no mesocarpo dos frutos submetidos à radiação UV-C no primeiro dia, tendo portanto uma resposta imediata ao tratamento (Fig. 1). De maneira semelhante, a *AccA* foi estimulada nos frutos submetidos ao tratamento com 1-MCP+UV-C no epicarpo dos frutos (Fig. 1) e somente no sétimo dia nos frutos submetidos somente ao tratamento com 1-MCP. Observou-se que *AccD* teve aumento na expressão somente no epicarpo dos frutos, apresentando respostas iniciais nos frutos submetidos ao tratamento com radiação UV-C no primeiro dia após a aplicação do tratamento e respostas mais tardias nos frutos que não receberam esse tratamento (Fig.1). Nos frutos controle, *AccA* e *AccD* tiveram aumento no número de transcritos somente no sétimo dia no epicarpo dos frutos.

Durante o amadurecimento do fruto, verifica-se que a enzima acetil-CoA carboxilase, expressa as formas de *AccA* e *AccD* em diferentes fases, a fim de garantir a biossíntese de ácidos graxos para o armazenamento de carotenóides.



**Figura 1.** Acúmulo relativo de transcritos de genes que codificam enzimas que atuam na biossíntese de compostos fenólicos no epicarpo e mesocarpo de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. A cor verde à esquerda da escala indica o nível de expressão mínimo (0), a cor preta no centro representa 3.0 vezes o nível de expressão mínima e a cor vermelha representa 10.0 vezes mais do que o mínimo.

#### 4 CONCLUSÃO

O trabalho apresenta como conclusão o fato que o nível de transcritos dos genes *AccA* e *AccD* aumentam durante a transição de cloroplastos para cromoplastos, sendo estimulada pela radiação UV-C.

#### 5 REFERÊNCIAS

BARSAN, C.; SANCHEZ-BEL, P.; ROMBALDI, C.; EGEA, I.; ROSSIGNOL, M.; KUNTZ, M.; ZOUINE, M.; LATCHÉ, A.; BOUZAYEN, M.; PECH, J. C. Characteristics of the tomato chromoplast revealed by proteomic analysis. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 2413-2431, 2010.

CHARLES, M. T.; MERCIER, J.; MAKHLOUF, J.; ARUL, J. Physiological basis of UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit I. Role of pre- and post-challenge accumulation of the phytoalexin-rishitin. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47 p. 10-20, 2008.

ERKAN, M.; WANG, S. Y.; WANG, C. Y. Effect of UV treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme and decay in strawberries fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, p. 163-171, 2008.

Kahlau, S., Bock, R., Plastid transcriptomics and translomics of tomato fruit development and chloroplast-to-chromoplast differentiation: chromoplast gene expression largely serves the production of a single protein. **Plant Cell**, v. 20, p. 856–874, 2008.

LIU, L. H.; ZABARAS, D.; BENNETT, L. E.; AGUAS, P.; WOONTON, B. W. Effects of UV-C, red light and sun light on the carotenoid content and physical qualities of tomatoes during post-harvest storage. **Food Chemistry**, v. 115, p. 495-500, 2009.

LIVAK, K. J. L., & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Method. *Methods*, 25, 402–408, 2001.