

ACÚMULO DE TRANSCRITOS DE GENES RELACIONADOS COM A SÍNTESE DE ETILENO E DE ÉSTERES, DEGRADAÇÃO DE CLOROFILAS E PAREDE CELULAR APÓS A COLHEITA DE MELÕES TRANSFORMADOS GENETICAMENTE COM UM CLONE DA ACC OXIDASE “ANTISENSE”

CIANE XAVIER GONÇALVES¹; ÍCARO BORGES TAVARES¹; CESAR VALMOR ROMBALDI²

¹Universidade Federal de Pelotas (UFPeI) - anexg@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas (UFPeI) - cesarvrf@ufpel.tche.br

1. INTRODUÇÃO

Melões Cantaloupe (*Cucumis melo* var. *Cantalupensis*, Naud cv. Védrantais) são frutos que, a plena maturação comercial é antecedida do aumento da respiração e da produção autocatalítica de etileno, (PÉRIN et al., 2002; KAYS; PAULL, 2004). Sabe-se que o etileno afeta a síntese de compostos voláteis, especialmente ésteres (AYUB et al., 1996; BAUCHOT et al., 1998; YAHYAOUÏ et al., 2002; SILVA et al., 2004). Em melões do grupo Cantaloupe, a síntese de compostos voláteis depende fortemente do catabolismo de ácidos graxos, envolvendo a ação de lipoxigenases (LOX), α e β -oxidação, seguida pela redução em aldeídos e álcoois com a participação de álcool desidrogenase (ADH), e finalmente, com a etapa de esterificação catalisada por síntese de álcool aciltransferase (AAT) (HARADA et al., 1985; AHARONI et al., 2000; BEEKWILDER et al., 2004).

De modo geral, para melões que apresentam comportamento climatérico, há uma correlação negativa entre produção de etileno e conservabilidade, e correlação positiva entre produção de etileno e intensidade aromática. Fato comprovado através de transformação genética de melão com gene ACC (ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano) oxidase antisense (AYUB et al., 1996 e SILVA et al., 2004). AYUB et al. (1996) utilizaram um gene ACC oxidase antisense de melão (pMEL1AS), isolado e caracterizado por BALAGUÉ et al. (1993); SILVA et al. (2004) utilizaram um gene ACCO antisense de maçã 'Royal Gala' (pAP4AS). Devido à supressão dos transcritos da ACC oxidase, os melões transformados utilizados nesse experimento apresentam baixa produção de etileno. Desta maneira, os melões transgênicos pAP4AS e pMEL1AS se constituem num bom modelo para o estudo do acúmulo de transcritos de genes relacionados com a síntese de etileno e de ésteres.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados melões Cantaloupe (*Cucumis melo* var. *Cantalupensis*, Naud cv. Védrantais), não transformados (NT) e transformados com os clones ACC oxidase antisense pMEL1AS (AYUB et al., 1996) e pAP4AS (SILVA et al., 2004). As plantas foram cultivadas em casa vegetação de acordo com as normas de biossegurança estabelecidas pela CTNBio (Brasil), seguindo os padrões de cultivo desse fruto. Foi avaliado o acúmulo de transcritos através

de PCR quantitativo (q-PCR). O RNA foi extraído da polpa do melão, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante para o reagente PureLinK™ (*Plant RNA Reagent* - Invitrogen). O RNA total foi tratado com DNase I - Invitrogen. A qualidade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose e por PCR, e quantificado espectroscopicamente. Os cDNAs foram obtidos a partir de 2µg de RNA utilizando o kit comercial SuperScript First-Strand System (Invitrogen™). Os *primers* para os genes específicos foram desenhados a partir de sequências depositadas no GenBank usando o Vector NTI Advance 10 (Invitrogen). Os fragmentos resultantes de amplificação e a sua especificidade foram avaliados em gel de agarose e sequenciados antes de RT-qPCR. As curvas de dissociação foram avaliadas e somente os *primers* com um pico indicando a amplificação específica do respectivo gene alvo foram utilizados. A curva padrão foi gerada para cada gene com diluições do cDNA e somente os genes com eficiências de amplificação da PCR próxima a 100% foram usados para estudar a expressão relativa. Para cada cDNA, β -actina foi usada como gene normalizador, com o ciclo limite de cruzamento (Ct), variando menos de 1,4. A q-PCR foi realizada no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando o corante fluorescente SYBR Green. A reação de amplificação foi realizada em um volume total de 25 µL. As amostras foram colocadas em placas ópticas de 96 poços (Applied Biosystems) e recobertas com filme adesivo óptico (Applied Biosystems). Cada placa foi considerada como um bloco. As condições para cada ciclo térmico foram as seguintes: desnaturação a 50°C por 2min e 95°C por 10min, seguindo 40 ciclos de três etapas (95°C por 30s, 57°C por 1min e 72°C por 1min) e a extensão final de 72°C por 5min. Em função da alta eficiência da reação (perto de 100%) de todos os genes mantidos neste estudo, o acúmulo relativo de transcritos de cada gene foi calculado usando a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Dos trinta genes selecionados, apenas doze foram mantidos em função da sua especificidade e eficiência: a) síntese de etileno (*ACC* oxidase), produção de compostos voláteis (*HPL* - Triacilglicerol lipase, *LOX* - Lipoxigenase, *AAT1*, *AAT2*, *AAT3* e *AAT4* - Álcool aciltransferase), síntese de aromas (*ADH1*- Álcool dehidrogenase), metabolismo da parede celular (*PL* - Pectato Liase, *PG1* e *PG2* - Poligalacturonase) e *BoPaO* - Feoforbídeo *a* oxigenasse.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Ao se aplicar etileno nos melões pMEL1AS, há uma rápida resposta em termos de acúmulo de transcritos dos genes *HPL*, *ATT1* e *ATT3*, fato não observado em melões pAP4AS. De maneira geral os frutos pMEL1AS tratados com etileno apresentaram indução no acúmulo de transcritos. Ocorrem respostas fisiológicas dos melões pMEL1AS frente à aplicação de etileno assemelhando-se aos NT, e isso não ocorre com melões pAP4AS (Figura 1). Para a maioria dos estudos, há consenso de que a síntese de ésteres em frutos climatéricos é um evento etileno-dependente, e que a indução da expressão de *AATs* é necessária e suficiente para que isso ocorra (EL-SHARKAWY et al., 2005). Talvez essa seja uma das razões pelas quais os melões pAP4AS não são capazes de restabelecer a síntese de ésteres.

Com o tempo, houve diminuição do acúmulo de transcritos da *ACC* oxidase para os frutos NT e, para os frutos pMEL1AS e pAP4AS, mesmo com aplicação de etileno, não houve aumento *ACC* oxidase. Para *PG1* e *PG2*

ocorreu acúmulo de transcritos durante a maturação dos frutos NT, e nos frutos transgênicos foi induzida pelo ação do etileno (Figura 1).

De modo geral, o acúmulo de transcritos foi mais induzido nos melões pMEL1As do que nos pAP4AS. Isso indica que, apesar da transformação genética ter sido eficiente para reduzir a produção de etileno, deve também ter afetado outras vias de transdução do sinal hormonal, pois as respostas à aplicação exógena foram diferenciadas.

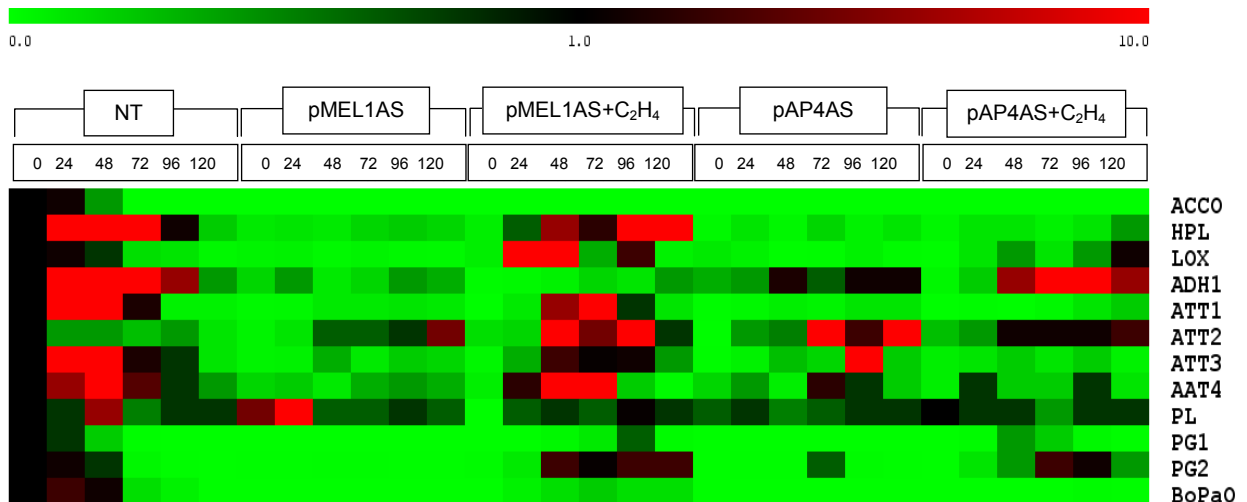


Figura 1: Acúmulo relativo de transcritos de genes da ACC (ACC) oxidase, Triacilglicerol lipase (HPL), Lipoxigenase (LOX), Álcool desidrogenase (ADH1), Álcool aciltransferase (ATT1, ATT2, ATT3 e ATT4), Pectato Liase (PL), Poligalacturonase (PG1 e PG2) e Feoforbídeo a oxigenase (PaO). O nível de transcritos é apresentado numa escala de 0 a 10. A cor verde a esquerda da escala indica o nível de expressão mínimo (0), a cor preta no centro representa 5 vezes o nível de expressão mínima e a cor vermelha representa 10 vez mais que o mínimo.

4. CONCLUSÕES

As respostas à aplicação de etileno são variáveis entre os genótipos, especialmente no que concerne aos genes da síntese de ésteres. A causa exata desse comportamento não foi elucidada.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à Capes pelo auxílio à pesquisa e bolsas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHARONI, A.; KEIZER, L.C.P.; BOUWMEESTER, H.J.; SUN, Z.K.; ALVAREZ-HUERTA, M.; VERHOEVEN, H.A.; BLAAS, J.; VAN HOUWELINGEN, A.; DE VOS, R.C.H.; VAN DER VOET, H.; JANSEN, R.C.; GUIJ, M.; MOL, J.; DAVIS, R.W.; SCHENA, M.; VAN TUNEN, A.J.; O'CONNELL, A.P. Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. **The Plant Cell**, n.12, p.647-661.

AYUB, R.; GUIJ, M.; BEM-AMOR, M.; GILLOT, L.; ROUSTAN, J. P.; LATCHÉ, A.; BOUZAYEN, M.; PECH, J.C. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. **Nature Biotechnology**, London, v.14, p.862-866, 1996.

BALAGUÉ, C.; WATSON, C.F.; TURNER, A.J.; ROUGE, P.; PICTON, S.; PECH, J.C.; GRIERSON, D. Isolation of a ripening and wound-induced cDNA from *Cucumis melo* L. encoding a protein with homology to the ethylene-forming enzyme. *European Journal of Biochemistry* n.212, p.27-34 bell pepper. **Plant Physiology**, n.112, p.615-622, 1993.

BAUCHOT, A.D.; MOTTRAM, D.S.; DODSON, A.T.; JOHN, P. Effect of aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase antisense gene on the formation of volatiles ester in cantaloupe charentais melon (cv. Védrandais). **Journal of Agricultural and Chemistry**, n.46, p.4787-4792, 1998.

BEEKWILDER, J.; ALVAREZ-HUERTA, M.; NEEF, E.; VERSTAPPEN, F.W.A.; BOUWMEESTER, H.J.; AHARONI, A. Functional characterization of enzyme forming volatile esters from strawberry and banana. **Plant Physiology**, n.135, p.1865-1878, 2004.

EL-SHARKAWY, I., MANRÍQUEZ, D., FLORES, F., REGAD, F., BOUZAYEN, M., LATCHÉ, A.; PECH, J.C. Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity. **Plant Molecular Biology**, n.59, p.345-362, 2005.

HARADA, M.; UEDA, Y.; IWATA, T. Purification and some properties of alcohol acyltransferase from banana fruit. **Plant Cell Physiology**. n.26, p.1067-1074, 1985.

KAYS, S.J.; PAULL, R.E. Metabolic processes in harvested products. **Postharvest Biology**, p.79-136, 2004.

PÉRIN, C.; GOMEZ-JIMENEZ, M.C.; HAGEN, L.; DOGIMONT, C.; PECH, J.C.; LATCHÉ, A.; PITRAT, M.; LELIÈVRE, J.M. Molecular and genetic characterisation of a non-climacteric phenotype in melon reveals two loci conferring altered ethylene response in fruit. **Plant Physiology**, n.129, p.209-300, 2002.

SILVA, J.A.; DA COSTA, T.S.; LUCCHETTA, L.; MARINI, L.J.; ZANUZO, M.R.; NORA, L.; NORA, F.R.; TWYMAN, R.M.; ROMBALDI, C.V. Characterization of ripening behavior in transgenic melons expressing an antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene from apple. **Postharvest Biology and Technology**, v.32, n.3, p.263-268, 2004.

YAHYAOU, F.E.; WONGS-AREE, C.; LATCHÉ, A.; HACKETT, R.; GRIERSON, D.; PECH, J.C. Molecular and biochemical characteristics of a gene encoding an alcohol acyl transferase involved in the generation of aroma volatiles esters during melon ripening. **European Journal of Biochemistry**, v.269, n.9, p.2359-2366, 2002.