



EXPRESSÃO TRANSCRICIONAL DE GENES DA POLIGALACTURONASE EM MORANGOS CV CAMAROSA SUBMETIDOS À IRRADIAÇÃO GAMA

DOS SANTOS, Railson Schreinert¹; SEVERO, Joseana²; MONTE, Fernanda Garcia³; FAES, Altair⁴; SILVA, Jorge Adolfo⁵; ROMBALDI, Cesar Valmor⁶.

¹.Aluno de graduação do curso de agronomia FAEM/UFPEL – Bolsista PIBIC CNPq, e-mail: rschsan@yahoo.com.br; ².Aluna de mestrado em Ciência e Tecnologia de Agroindustrial/FAEM/UFPEL - Bolsista CAPES, e-mail: josi_severo@yahoo.com.br; ³.Aluna de graduação do curso de agronomia FAEM/UFPEL - Bolsista PIBIC CNPq, e-mail: fe_monte2@hotmail.com; ⁴. Físico – Centro de Oncologia/Medicina – UFPEL, e-mail: faes@uol.com.br; ⁵. Prof. Adjunto no DCTA/FAEM/UFPEL, e-mail: ctajorge@ufpel.edu.br; ⁶. Prof. Titular no DCTA/FAEM/UFPEL, e-mail: cesarvrf@ufpel.edu.br;

Introdução

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) é um pseudofruto que durante a maturação tem comportamento não-climatérico, mas, após a colheita, apresenta alta taxa respiratória que, juntamente com a fragilidade estrutural, resulta em curta vida-de-prateleira. As duas alterações indesejáveis mais facilmente perceptíveis durante a pós-colheita de morangos são a excessiva redução da firmeza de polpa e a deterioração por *Botrytis cinerea*, causador da podridão cinzenta. A perda de firmeza é resultado da ação de enzimas de degradação da parede celular, majoritariamente atuantes nos polissacarídeos, como é o caso de poligalacturonase, pectato liase, pectina metil esterase β -galactosidase, α -L-arabinofuranosidase, endo-(1,4)- β -D-glucanase, β -xyloxidase, expansina, xyloglucano endotrasglucosilase e endo-mananase.

A ação dessas enzimas facilita ainda mais o ataque por fungos causadores de podridão, embora esses tenham capacidade de ação sobre células intactas. Fungos do gênero *Rhizopus*, por exemplo, são capazes de secretar enzimas pectinolíticas que degradam a lamela média e causam extravasamento do conteúdo celular.

Em morangos, a redução da firmeza de polpa está associada às alterações nas características dos polissacarídeos da parede celular, cujos principais componentes são as substâncias pécticas (MARTÍNEZ & CIVELLO, 2008). A poligalacturonase (PG) é umas das enzimas envolvidas nesse processo, catalizando a hidrólise das ligações α 1-4 galacturônicas da cadeia de pectina (SINGH, P., DWIVENDI, 2008).

Diversos são os meios para prolongar a vida-de-prateleira de morangos, incluindo o melhoramento e a transformação genética, o armazenamento refrigerado, o uso de atmosfera modificada ou controlada, tratamentos químicos e físicos na pré e pós-colheita. Dentre eles a irradiação utilizando alta energia é um procedimento que pode auxiliar no prolongamento do período de conservação de morangos *in natura*. Os raios gama criam cargas, positivas ou negativas, que resultam em efeitos químicos e biológicos, impedindo a divisão celular de microrganismos pela ruptura de sua estrutura molecular. É conhecido que o uso de irradiação gama não resulta em contaminação radiotiva no produto, mas pode

induzir à formação de radicais livres e, como descrito por Alighourchi *et al.* (2008), doses maiores que 2,0kGy, podem causar perdas na quantidade de antocianinas no caso de suco de romã. Fan *et al.* (2003) considera que os radicais livres gerados pela irradiação podem agir como sinais de *stress* e dar início à respostas em plantas de alface, resultando em maior síntese de compostos com atividade antioxidante. Quando aplicada em órgão vegetal fisiologicamente ativo, espera-se que as células lancem um mecanismo de redução desses radicais, seja por sistemas enzimáticos antioxidantes e/ou pela produção de moléculas com esse potencial (compostos fenólicos, ácido ascórbico, por exemplo).

Além disso, a irradiação pode atuar sobre moléculas já existentes, alterando sua atividade biológica, como é o caso da indução ou inibição da transcrição gênica, ou da inativação da tradução ou atividade enzimática.

Neste contexto, o presente trabalho buscou analisar a hipótese de que haja redução da expressão de genes da enzima PG nos morangos tratados com irradiação gama, o que contribuiria na redução da velocidade de perda de firmeza do fruto. Além do tratamento com irradiação gama, buscou-se otimizar os procedimentos para avaliação da “expressão em mRNAs da PG”, pela extração de RNAs totais, *RT-PCR* (*Reverse Transcription - Polimerase Chain Reaction*) e validação do método com o uso de gene marcador.

Metodologia (Material e Métodos)

Os morangos, cv. Camarosa, utilizados no experimento foram obtidos em lavoura comercial no município de Pelotas-RS, safra 2007, colhidos no mês de outubro.

Após a colheita os morangos foram imediatamente acondicionados em embalagens, tipo bandeja, de isopor, com capacidade unitária de 150 a 200g, cobertos por filme “esticável” de PVC e transportados até o Centro de Oncologia da UFPel para efetuar-se a irradiação gama em equipamento Eldorado-78 com fonte de Co-60. A condição de tratamento foi de 67,69 Gy/min e dose de 3,0 kGy. Como controle, mantiveram-se unidades experimentais sem aplicação de irradiação. As amostras foram analisadas logo após a colheita e três dias após, mantendo-se os frutos em temperatura ambiente (23-25°C) e umidade relativa de 70-80%. Como variável dependente estudou-se a expressão de RNAs da PG e a firmeza de polpa.

A extração de RNA total foi baseada no protocolo do reagente *PureLink™* (*Plant RNA Reagent – Invitrogen™*). Para a síntese dos cDNAs foi utilizado o kit comercial *SuperScript First-Strand System for RT-PCR (Invitrogen™)*. Os cDNAs foram amplificados em PCR tradicional, semi-quantitativa, em aparelho termociclador *PTC-200 (MJ Research, Inc.™)*, sendo utilizados na reação, os seguintes componentes: 2,5 µL Tp 10x; 1,5 µL MgCl; 1,0 µL dNTPs; 1,0 µL *primer* R; 1,0 µL *primer* F; 2,0 µL cDNA e 15,7 µL de água U.P. tratada com D.E.P.C. As condições de amplificação foram: desnaturação a 95°C/5min; anelamento a 54°C/1:30min e extensão: 72°C/2min, num total de 36 ciclos.

Os *primers* para a sequência do *gene 18s* (constitutivo), utilizado como controle positivo de reação, e dos genes de poligalacturonase (PG), foram construídos a partir de sequência obtida no *NBCI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), GePG: GI 92429376: PG (cv. Camarosa - 367pb), GI 92429374: PG (cv. Camarosa - 452pb), GI 15150142: Endo-PG (cv. Chandler - 604pb), com auxílio do programa *Vector (Invitrogen™)*. *Primers PG: Forward: 5'ATACTGCAGGCGCCACCAATTG3', Reverse: 3'CCTGGTCCACAACCTTAC5'. Primers 18S: Forward: 5'TGACGGAGAATT3', Reverse: 5'AGGGTTTCG3'*

Os produtos da *PCR* foram analisados em gel de agarose 1,5%, corado em brometo de etídeo e visualizado em transluminador UV. Eletroforese conduzida a 80V, por 120min.

A firmeza dos frutos foi obtida em texturômetro *TA.XT Plus* com probe de 2mm e penetração até 30mm a velocidade de 1,0 mm/s, sendo os resultados expressos em Newton (N).

Resultados e Discussão

No que concerne à uniformidade das extrações de RNAs, obtiveram-se bons resultados, com *ratios* (260/280nm) entre 1,8 e 2,1 (Tabela 1), sendo, estes valores, indicativos da pureza dos extratos. As concentrações obtidas também foram boas, permitindo a realização de *RT-PCR* com resultados confiáveis. Paralelamente, realizou-se uma migração em gel de agarose para se verificar a integridade do produto da extração e observou-se que as condições utilizadas, além de permitirem a obtenção de RNAs de boa pureza e concentração, apresentavam-se, provavelmente, íntegros.

Tabela 1. *Ratio* (260/280nm) e concentração ($\mu\text{gRNA}/\mu\text{L}^{-1}$) de extratos de RNAs, utilizados na síntese dos cDNAs, obtidos de morangos cv. Camarosa submetidos a irradiação gama. Pelotas/RS, safra 2007

	Amostra (cDNA)	Ratio (260/280nm)	Concentração ($\mu\text{gRNA}/\mu\text{L}^{-1}$)
Colheita	1	2,0	1,0
	2	2,1	2,3
Sem irradiação 3 dias	1	1,8	3,1
	2	2,0	3,5
Irradiados 3 dias	1	2,1	5,9
	2	2,0	2,8

Na figura 1, em eletroforese em gel de agarose (1,5%), verifica-se o produto da amplificação do *gene 18s* pela *PCR*, produzindo um fragmento de 400pb, confirmando o controle positivo da reação. A otimização da extração e a reprodutibilidade de resultados de expressão com gene controle positivo são condições obrigatórias para os estudos de expressão gênica, pois garantem a veracidade dos resultados. Nesse trabalho essas condições foram atingidas e, em função disso, passou-se a estudar a expressão do gene que constitui o objeto de estudo, a PG.

Figura 1. Produto da amplificação, por *RT-PCR*, dos transcritos dos genes da PG. **Pista 1** - morangos sem tratamento após a colheita; **pista 2** - morangos não irradiados, 3 dias após a colheita; **pista 3** - morangos 3 dias após a irradiação.

Os morangos irradiados e não irradiados não demonstraram diferenças na expressão dos genes da PG mesmo quando comparados aos frutos na colheita (Fig. 2). No entanto, os frutos irradiados demonstraram significativa redução da firmeza de polpa, apresentando uma média de 9,45N, enquanto que os morangos não irradiados apresentaram média de 17,03N (Tabela 2). Esses resultados indicam que a irradiação parece não reduzir a ação das enzimas estudadas e, possivelmente esteja, também, estimulando outras enzimas que agem na degradação da parede celular levando ao conseqüentemente amolecimento dos frutos. A perda de firmeza, verificada pelo texturômetro, pode também ocorrer devido à alteração de componentes da parede celular pela alta energia da irradiação gama.

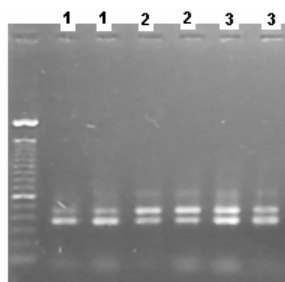


Figura 2. Produto da amplificação, por RT-PCR, dos transcritos dos genes da PG. **Pista 1** - morangos sem tratamento após a colheita; **pista 2** - morangos não irradiados, 3 dias após a colheita; **pista 3** - morangos 3 dias após a irradiação.

Tabela 2. Firmeza, em Newton, dos frutos, nos diferentes tratamentos

Tratamentos	Firmeza (N)
Colheita	18,25
Não Irradiados (3 dias)	17,03
Irradiados (3 dias)	9,45
Média	14,91
Desvio Padrão	4,77

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Conclusões

A irradiação gama, na dose de 3,0kGy, não afeta a expressão transcricional de três genes de poligalacturonase, além de não contribuir para a preservação da firmeza de morangos cv. Camarosa.

Agradecimentos

Apoio financeiro e bolsas de estudo fornecidas pelo CNPq e pela CAPES.

Referências Bibliográficas

- ALIGHOURCHI, H., BARZEGAR, M, ABBASI, S. Effect of gamma irradiation on the stability of anthocyanins and shelf-life of various pomegranate juices. *Food Chemistry* v. 110, p. 1036-1040, 2008.
- FAN, X., TOIVONEN, P.M.A., RAJKOWSKI, K.T., SOKORAI, K.J.B., Warm water treatment in combination with modified atmosphere packaging reduces undesirable effects of irradiation on the quality of fresh-cut iceberg lettuce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 51, p. 1231–1236, 2003.
- KHATTAK K.F., SIMPSON T. J., IHASNULLAH, Effect of gamma irradiation on the extraction yield, total phenolic content and free radical-scavenging activity of *Nigella staiva* seed. *Food Chemistry* v. 110, p. 967-972, 2008.
- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG).** Disponível em: <<http://www.genome.jp/kegg/>>. Acesso em: 30 ago. 08.
- MARTÍNEZ, G.A., CIVELLO, P.M. Effect of heat treatments on gene expression and enzyme activities associated to cell wall degradation in strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology* v 49, p. 38-45, 2008.

National Center for Biotechnology Information (NCBI).Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 30 ago. 08.

SINGH, P., DWIVENDI, U. N. Purification and characterisation of multiple forms of polygalacturonase from mango (*Mangifera indica* cv. Dashehari) fruit. *Food Chemistry* v. 111, p. 345-349, 2008.

Software *Statistica* versão 7.