

submetidos à *PCR* para amplificação do gene da PME, onde, após vários testes foi realizada: desnaturação inicial 95°C/4:30min.; 35 ciclos [95°C/1:30 min.; 52°C/1:30 min.; 72°C/1:30 min.] e extensão final 72°C/10 min. O produto da amplificação foi migrado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador-UV. Após esta etapa, extraíram-se RNAs, do mesmo material vegetal. Para cada extração de RNA total, foram pesadas 100 mg de amostra (polpa de pêsego), previamente macerada em nitrogênio líquido com auxílio de gral e pistilo, em um microtubo estéril tipo *Eppendorf*®, pelo método *Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen®)*. Após, procedeu-se a técnica de RT-PCR, que consiste na conjugação das técnicas de síntese de cDNA (uso da enzima transcriptase reversa) e de PCR (uso da enzima *Taq* DNA polimerase). Para a síntese de cDNA (fita simples) foi utilizado o *kit* comercial *SuperScript™ First-Strand System for RT-PCR (Invitrogen®)*. A reação foi realizada no aparelho termociclador *MJ Research PTC-100™*. O processo de PCR consistiu em: desnaturação 95°C/ 1:50min.; 35 ciclos [95°C/1:10 min.; 53°C/1 min.; 72°C/1:45 min.] e ext ensão final 72°C/10 min. O resultado das amplificações foi visualizado em gel de agarose a 1,2%, corado com brometo de etideo, em transiluminador-UV utilizando-se como marcador, 100bp DNA *Ladder (Invitrogen®)*.

3. Resultados e discussão

O produto da amplificação de DNA com nucleotídeos da PME foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador-UV, onde os fragmentos foram de aproximadamente 2000pb, para amplificações de DNA, conforme figura 1. Tais resultados demonstram que esta técnica, para DNA, está calibrada, podendo ser utilizada para os ensaios para RNA. Laratta *et al.* (2008), também obtiveram resultados positivos utilizando o mesmo número de ciclos na PCR e tempos e temperaturas semelhantes, em amplificações de DNA para oligonucleotídeos da PME, em bergamotas (*Citrus bergamia R.*).

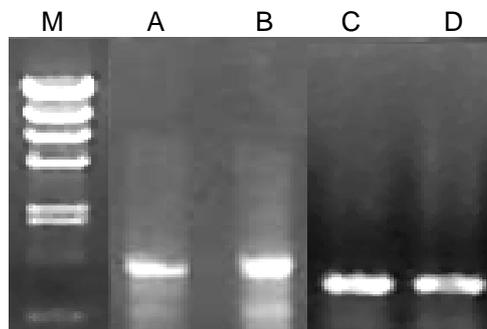


Figura 1: Amplificação por PCR utilizando oligonucleotídeos para PME dos DNAs obtidos de RNAs totais (RT-PCR) de pêsego. M: Marcador λ *DNA/Hind III Fragments*; A e B: amplificações de PME; C e D: controle positivo (18S).

O produto da amplificação de PME e 18S (controle positivo), realizado a partir dos cDNAs obtidos dos extratos de RNA, foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador-UV, onde os fragmentos foram de aproximadamente 500pb e 300pb, respectivamente (Figura 2).

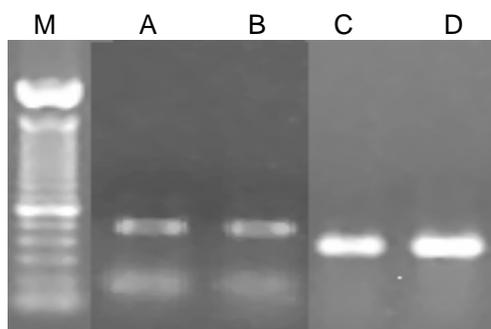


Figura 2: Amplificação por PCR utilizando oligonucleotídeos para PME, dos cDNAs obtidos de RNAs totais (RT-PCR) de pêssego. M: Marcador *100bp DNA Ladder*; A e B: ampliações de PME; C e D: controle positivo (18S).

4. Conclusão

Os resultados obtidos permitiram considerar calibradas as reações para uso nos ensaios de *RT-PCR* em estudos de expressão transcricional da PME, para a continuidade dos trabalhos de pesquisa dentro da expressão deste gene em frutos.

5. Agradecimentos

À CAPES e ao CNPq pela concessão de bolsas e recursos para os projetos.

6. Referencias bibliográficas

ANTON, G.E.; SEKINE, Y.; WATANABE, N.; et al. Thermal inactivation of pectin methylesterase, poligalacturonase and peroxidase in tomato juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.50, p.6153-6159, 2002.

BRACKMANN, A. et al. Utilização da atmosfera controlada para o armazenamento de pêssegos 'Eldorado' colhidos em dois estádios de maturação. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v.30, n.2, p. 209-214, 2005.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**, Lavras: ESAL/FAEPE, 1990. 320P.

LARATTA, B; DE MASI, L; MINASI, P.; GIOVANE, A. Pectin methylesterase in *Citrus bergamia* R.: purification, biochemical characterization and sequence of the exon

related to the enzyme active site. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.110, p.829-837, 2008.

ROMANO, E. Extração de DNA de Tecidos Vegetais. In: **Manual de Transformação Genética de Plantas**, Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998. 309p.

ROMBALDI, C.V., SILVA, J.A., MACHADO, L.B., PARUSSOLO, A., LUCCHETTA, L., ZANUZO, M.R., GIRARDI, C.L., CANTILLANO, R.F. Storage of 'Chiripa' peach in controlled atmosphere. **Científica Rural**, Bagé, v.31, p.43-47, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, 1989.