

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



EXPRESSÃO TRANSCRIPCIONAL DE GENES ENVOLVIDOS NO SISTEMA DE TRANSPORTE ENDOCELULAR EM PÊSSEGOS CV. GRANADA

DOS SANTOS, Railson Schreinert¹; PEGORARO, Camila²; MANICA-BERTO, Roberta³; CASARIL, Jardel⁴; SILVA, Jorge Adolfo⁵; ROMBALDI, Cesar Valmor⁶.

^{1,2,4,5,6}Dept^o de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – FAEM/UFPel Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900. rschsan@yahoo.com.br; ³Dept^o de Fitotecnia – FAEM/UFPel Campus Universitário – CEP 96010-900. robertamanica@yahoo.com.br.

1. INTRODUÇÃO

O pêsego (*Prunus persica* (L.) Batsch) é um fruto de frágil estrutura celular e intenso metabolismo, favorecendo a rápida deterioração após a colheita. É o caso da cultivar Granada, que embora destinada à industrialização, também tem boa aceitação no mercado *in natura* em função da aparência e sabor.

Uma das alterações mais facilmente perceptíveis durante a maturação de pêsegos é o amolecimento, decorrente da ação de enzimas hidrolíticas dos polímeros da parede celular. As principais enzimas envolvidas no processo de solubilização da parede celular, na maioria dos frutos, são as pectina metil esterases (PME), as poligalacturonases (PG), pectato liases (PL), celulases, hemicelulases e β -glucuronases, assim como proteínas reguladoras como as expansinas (*Girardi et al.*, 2005).

Por se tratarem de enzimas cuja atividade ocorre na parede celular, há necessidade de que haja a síntese e transporte dessas proteínas para o espaço periplasmático. Essas enzimas são codificadas por genes cuja proteína predita contém peptídeo sinal de transito, o que determina o transporte e modificações pós-traducionais via retículo endoplasmático, complexo de Golgi e vesículas (*Cosson et al.*, 2005). No mecanismo de transporte, estão envolvidas vesículas que têm sua especificidade determinada por proteínas como as v-Snares, t-Snares e Rabs (*Tuvim et al.*, 2005).

As SNAREs são proteínas ligadas a membranas de vesículas que permitem a fusão dessas com a da organela de destino, e controlam a especificidade desse evento (*Cosson et al.*, 2005). As v-SNAREs, como por exemplo, a VAP-27-2, são proteínas situadas nas vesículas e interagem com suas t-SNAREs específicas, no caso, a *Syntaxin*, situadas na membrana da organela alvo, regulando o transporte. Diversas GTPases da família das Rabs, conhecidas como reguladoras do tráfego entre membranas e organelas, foram descritas e localizadas em vários compartimentos intracelulares (*Wilcke et al.*, 2000). Entre essas enzimas encontra-se a Rab11, que parece ser regulada de forma etilenodependente (*González-Agüerro et al.*, 2008). Assim sendo forma-se um complexo v-SNARE/vesícula, dirigido por Rab sob demanda energética gerida por GTP, levando o complexo à membrana alvo com as t-SNAREs correspondentes (*Schimmo et al.*, 2005).

Nesse contexto, acredita-se que a indução de genes envolvidos com o sistema de transporte constitua-se na condição prévia ao início do amolecimento, tendo em vista que as enzimas envolvidas na solubilização da parede celular são transportadas via sistema endomembranário.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os pêssegos cv. Granada no estágio “verde”, “maduro” e “sobremaduro”, utilizados no experimento, foram colhidos no Centro Agropecuário da Palma/Universidade Federal de Pelotas (UFPel), no mês de dezembro de 2008.

Após a colheita, os frutos foram avaliados e imediatamente transportados para o laboratório onde as amostras de polpa foram congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas em *Ultrafreezer* (-80°C) para posteriores análises moleculares. A firmeza de polpa, o teor de sólidos solúveis totais e produção de etileno foram avaliados de acordo com *Girardi et al.* (2005).

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™)*. Para verificar a qualidade dos cDNAs, realizou-se amplificação por PCR semi-quantitativa, em aparelho termociclador *PTC-200 (MJ Research, Inc.™)*, sendo utilizados na reação, os seguintes componentes: 2,5 µL de Tampão de Reação 10x; 0,75 µL MgCl₂; 0,5 µL dNTPs; 1,0 µL *primer* R; 1,0 µL *primer* F; 1,0 µL cDNA e 17,95 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 a 72°C/2min, num total de 36 ciclos. Para controle da reação utilizou-se o gene 18s.

A avaliação por *Real-Time PCR* foi realizada em aparelho *7500 Real-Time PCR System* com *Notebook Dell™ (Applied Biosystems™)* e, como corante para detecção da amplificação, utilizou-se o *Kit Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™)*. O programa utilizado no aparelho foi: 50°C/2 min; desnaturação inicial a 95°C/10min; desnaturação a 95°C/30seg; anelamento a 57°C/1min e extensão: 72°C/1min; e extensão final a 72°C/5min.

Os *primers* foram construídos a partir das sequências selecionadas no *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), com a utilização do programa *Vector™*: 18S: *P. persica* (GI 66627320), *Pectate lyase (PL)*: *A.thaliana* (GI 22483439), *SNARE-like protein Vap 27-2*: *A.thaliana* (GI 22481415), *Syntaxin*: *M. domestica* (GI 56162812), *RabGTP-binding protein (Rab11)*: *G.hirsutum* (GI 22484722).

Ao final da reação obteve-se a representação gráfica (*Amp Plot*) e numérica (*Ct, Cycle Threshold*) do aumento de fluorescência ocorrido durante os ciclos. Os dados foram analisados no programa *7500 System Software*. O cálculo do $\Delta\Delta Ct$ foi realizado utilizando-se a expressão $QR=2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual QR representa o nível de expressão gênica, Ct o ciclo de amplificação na qual cada amostra apresenta amplificação exponencial, ΔCt refere-se à diferença entre o Ct da amostra amplificada para o gene alvo e o Ct da mesma amostra para o gene controle (18S), e o $\Delta\Delta Ct$ representa a diferença entre o ΔCt da amostra de interesse (expressão em determinado tempo) e o ΔCt da amostra calibradora (verde).

Tabela 1: Firmeza de polpa, sólidos solúveis e produção de etileno de pêssegos cv. Granada., nos estádios de maturação verde, maduro e sobremaduro.

*Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

| | Estádios de Maturação | | |
|--|-----------------------|--------|-------------|
| | Verde | Maduro | Sobremaduro |
| Firmeza de Polpa (N) | 23,14a* | 9,65b | 4,87c |
| Sólidos Solúveis (°Brix) | 11,71b | 13,69a | 13,90a |
| Produção de Etileno (mL.h ⁻¹ .g ⁻¹) | 1,62b | 8,37a | 0,61c |

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A qualidade das preparações de RNAs foi boa, tendo-se verificado a integridade do produto da extração (figura 1). Isso permitiu boa uniformidade e reprodutibilidade na amplificação de cDNAs do gene 18s (figura 2).

Figura 1: Imagem dos produtos de extração de RNAs de polpa de pêssegos, 1: Verde, 2: Maduro, 3: Sobremaduro M: Marcador molecular

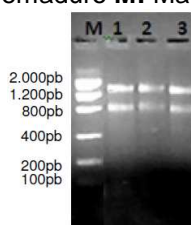


Figura 2: Amplificação do gene constitutivo 18s a partir de cDNAs de pêssegos, 1: Verde, 2: Maduro, 3: Sobremaduro

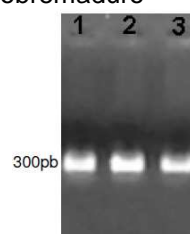
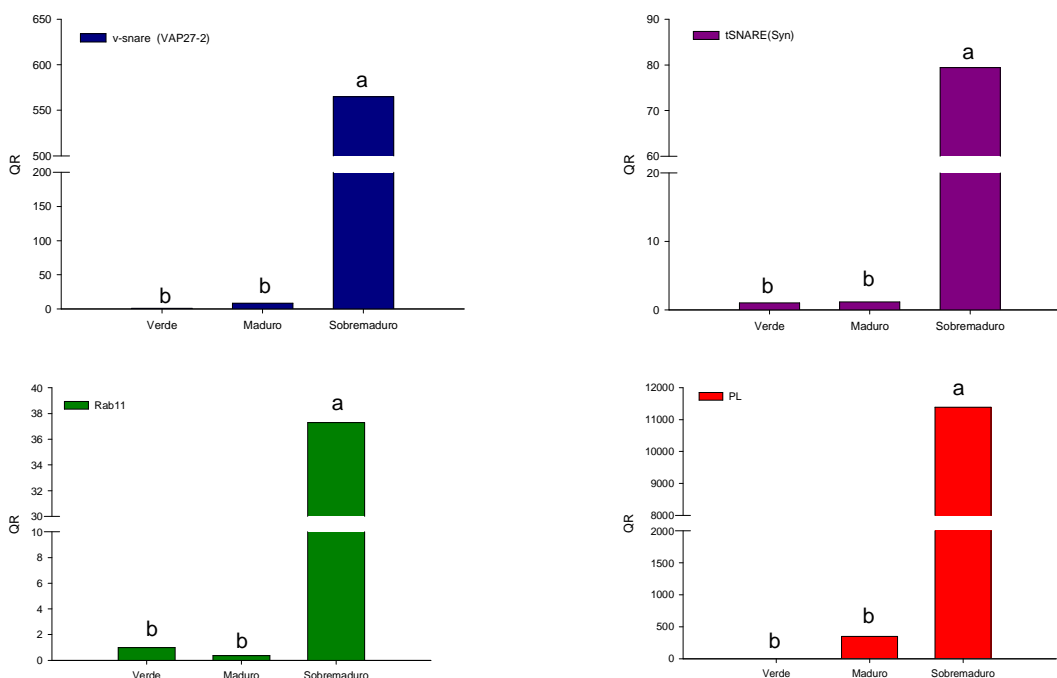


Figura 3: Quantificação relativa da expressão gênica de *Vap 27-2*, *Syntaxin*, *Rab11* e *PL* em pêssegos granada, em estádios de maturação verde, maduro e sobremaduro. Para comparação dos dados foi realizado teste de Tukey a 5% de significância - letras distintas indicam diferença significativa



Ao estudar-se a expressão dos genes-alvo, verificou-se que a máxima expressão foi detectada no estágio sobremaduro (figura 3). Nesse estágio, os frutos já apresentam-se amolecidos (firmeza de polpa de aproximadamente 5N), indicando que a ação de enzimas envolvidas com a solubilização da parede celular já ocorreu, bem como a crise climática já foi concluída.

Em pêssegos Granada o máximo incremento na produção de etileno ocorre na transição do estágio verde para o maduro (tabela 1). É conhecido que o amolecimento de pêssegos é um evento parcialmente dependente do etileno. Assim, embora a redução de firmeza de polpa possa ocorrer antes do início da crise climatérica, o aumento da produção e/ou ação do etileno acelera o processo. Isso se explica pela indução de genes de PG, β -gluconases e pectato liases sob a ação do etileno (*Trainotti et al.*, 2003). Neste experimento mostrou-se que a redução da firmeza de polpa do estágio verde para maduro foi acompanhada de elevação da produção de etileno, mas não foi precedida de incremento da expressão dos genes estudados.

Como as proteínas v-SNAREs, t-SNAREs e Rab11 estão envolvidas no transporte endocelular, acreditava-se que a indução desses genes precederia o amolecimento. Isso não ocorreu, pelo contrário, a máxima expressão transcricional ocorreu em frutos em estágio pós-climatérico (figura 3). Isso sugeriria que esses genes, codificadores para proteínas envolvidas no transporte vesicular podem participar de processos de reciclagem endocelular, como a formação de endossomos, como observado por (*Appezatto-da-Glória et al.*, 2004), o que ocorre nos pêssegos em casos de senescência ou sob estresses abióticos.

4. CONCLUSÕES

Os genes Rab11, Vap 27-2 e Syntaxin têm máxima expressão em pêssegos sobremaduros, indicando que não tem relação majoritária com o transporte de proteínas envolvidas no amolecimento de frutos.

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

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COSSON, P., RAVAZZOLA, M., VARLAMOV, O., SÖLLNER, T. H., DI LIBERTO M., VOLCHUK, A., ROTHMAN, J. E., ORCI, L., Dynamic transport of SNARE proteins in the Golgi apparatus. **PNAS**, v.102, p.4647–14652, 2005.

GIRARDI, C. L., CORRENT A.R., LUCCHETTA, L., ZANUZO M.R., DA COSTA T.S., BRACKMANN, A., TWYMAND, R.M., NORA, F.R., NORA, L., SILVA J.A., ROMBALDI, C.V., Effect of ethylene, intermittent warming and controlled atmosphere on postharvest quality and the occurrence of woolliness in peach (*Prunus persica* cv. Chiripá) during cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, v.38 p.25–33, 2005.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). Capturado em 9 mai. 2009. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

PFEFFER, S. R., Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. **Nature Cell Biology**, v. 1 p, 1999.

SCHIMMO, F., SIMON, I. PFEFFER .S. R., Rab GTPases, Directors of Vesicle Docking. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273 p.22161–22164, 1998.

WILCKE, M., JOHANNES, L., GALLI, T., MAYAU, V., GOUD, B., SALAMERO, J., Rab11 Regulates the Compartmentalization of Early Endosomes Required for Efficient Transport from Early Endosomes to the trans-Golgi Network. **The Journal of Cell Biology**, v.151, p.1207–1220, 2000.

TRAINOTTI, L., ZANIN, D., GIORGIO, C., A cell wall-oriented genomic approach reveals a new and unexpected complexity of the softening in peaches. **Journal of Experimental Botany**, v.54, p. 1821–1832, 2003.

TUVIM, M. J., ADACHI, R., HOFFENBERG, S., DICKEY, B. F., Traffic Control: Rab GTPases and the Regulation of Interorganellar Transport. **News in Physiological Sciences**, v.16 p.56-61, 2001.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B., BRON, I.U., MACHADO, S.R., Lanosidade em cultivares de pêsego (*Prunus persica* (L.) Batsch): estudos anatômicos e ultra-estruturais. **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, p.55-61, 2004.