



EXPRESSÃO TRANSCRICIONAL DE GENES *GLDH* E *LGALDH* DA ROTA DE SÍNTESE DO ÁCIDO ASCÓRBICO EM TOMATE

TIECHER, Aline¹; SEVERO, Joseana²; PEGORARO, Camila³; MANICA-BERTO, Roberta⁴; ROMBALDI, Cesar Valmor⁵; SILVA, Jorge Adolfo⁶.

¹Aluna de mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial/FAEM/UFPeI - Bolsista CAPES, e-mail: atiecher@yahoo.com.br; ²Aluna de doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial/FAEM/UFPeI - Bolsista CAPES, e-mail: josi_severo@yahoo.com.br; ³Aluna de mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial/FAEM/UFPeI - Bolsista CNPq, e-mail: camyagro@yahoo.com.br; ⁴Aluna de doutorado em Agronomia/FAEM/UFPeI - Bolsista CAPES, e-mail: robertamanica@yahoo.com.br; ⁵Prof. Titular do DCTA/FAEM/UFPeI, e-mail: cesarvrf@ufpel.edu.br; ⁶Prof. Adjunto do DCTA/FAEM/UFPeI, e-mail: ctajorge@ufpel.edu.br.

1. INTRODUÇÃO

O tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é um fruto amplamente consumido devido à grande multiplicidade de usos, tanto na forma *in natura* quanto processada. A maior parte dos frutos comercializados são colhidos no estágio de maturidade fisiológica verde/maduro, “*breaker*”, e completam o processo de maturação durante o transporte, o armazenamento e a comercialização. Danos físicos causados por impactos, variações de temperatura e radiações são alguns exemplos de estresses a que os frutos são submetidos na pós-colheita.

As plantas possuem estratégias para minimizar os danos gerados por estresses bióticos e abióticos, como a produção de compostos com propriedade antioxidante. A vitamina C é um importante composto para o metabolismo vegetal e humano, possuindo capacidade antioxidante. Em frutos e vegetais, a vitamina C impede o estresse oxidativo causado pela fotossíntese, metabolismo oxidativo e exposição a poluentes (NASCIMENTO et al., 2005).

A vitamina C é composta predominantemente pelo ácido ascórbico (AA) e pelo primeiro produto de sua oxidação, o ácido de dehidroascórbico (DHA), sendo o AA o principal responsável pela atividade vitamínica. AA é sintetizado em duas etapas a partir da L-galactose através da ação das enzimas L-galactose dehidrogenase (LGALDH, EC 1.1.1.122) e L-galactono-1,4-lactone dehidrogenase (GLDH, EC 1.3.2.3) (LEFERINK et al., 2008). A regulação da expressão dos genes que codificam estas enzimas varia de acordo com o tipo de fruto ou vegetal, assim como, com a etapa de desenvolvimento e o tecido analisado.

Neste estudo objetivou-se investigar a localização e o nível da expressão transcricional dos genes *LGALDH* e *GLDH* envolvidos na rota metabólica de síntese do ácido ascórbico em tomates.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Frutos de tomate cv. *Flavortop*[®] provenientes de canteiro comercial localizado na cidade de Pelotas-RS foram colhidos em estágio de maturação “breaker”.

A extração de RNAs totais, da casca e polpa dos tomates, foi baseada no protocolo do reagente *Concert*[™] (*Plant RNA Reagent – Invitrogen*[™]). Para a síntese dos cDNAs utilizou-se o kit *SuperScript First-Strand System for RT-PCR* (*Invitrogen*[™]). Para verificar a qualidade dos cDNAs realizou-se a amplificação do gene *18S* (constitutivo) por PCR semi-quantitativa, em aparelho termociclador *PTC-200* (*MJ Research, Inc.*[™]). A integridade das bandas ribossomais e a amplificação do gene *18S* foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose 1%.

Os *primers* construídos para o estudo de expressão transcricional por PCR quantitativa (QR) estão descritos na Tabela 1. Para a reação de PCR em tempo real utilizou-se o sistema *SYBR*[®] *Green* (*Applied Biosystems*[®]) e aparelho *ABI 7500* (*Applied Biosystems*[®]) nas seguintes condições: 50°C por 2min, 95°C por 1 0min, 40 ciclos a 95°C por 30s, 60°C por 1min, 72°C por 1min , e extensão final a 72°C por 5min.

Cada repetição foi avaliada em triplicata em placas com capacidade de 96 reações. Para cada amostra foi calculado o valor do *Ct* (*Thershold cycle*) a partir da curva de amplificação. A média dos *Ct*'s de cada amostra foi utilizada para estudo de quantificação relativa utilizando o *18S* como normalizador (padrão interno) e a amostra casca como calibrador. Foi então calculado o $\Delta\Delta Ct$ que foi utilizado na equação para expressão dos resultados (Equação 1) (LIVAK, K. J. L.; SCHMITTGEN, 2001; SEVERO, 2009).

$$\begin{aligned} \text{médiaCt}_{\text{amostra}} - \text{médiaCt}_{18\text{S}} &= \Delta\text{Ct}_{\text{amostra}} \\ \Delta\text{Ct}_{\text{amostra}} - \Delta\text{Ct}_{\text{calibrador}} &= \Delta\Delta\text{Ct} \end{aligned} \quad (\text{Equação 1})$$

Após cada reação de PCR em tempo real realizou-se a construção da curva de dissociação durante 30min com temperatura aumentando gradualmente de 60°C a 95°C, comprovando desta maneira a qualidade dos *primers* e cDNAs na reação.

Tabela 1. *Primers* construídos para o estudo de PCR quantitativa dos genes *LGALDH* e *GLDH*.

GI*	Gene	Sequência	Amplicon
18448	18S	Sense: TGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAA Antisense: AAGTCGGGATTTGTTGCACGTATT	110
16555789	LGALDH	Sense: TGCTTGGTAAGGGACTAAAGGCTTT Antisense: AAGCCTCTCCAAGCTCTCGTCAATA	139
186510765	GLDH	Sense: TGCCTCCATTAGAGAGCAGCAGATT Antisense: CACCTGCTCATCAATAGGAGGCAAT	90

*NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 representa as derivadas das curvas de dissociação das amplificações obtidas a partir dos *primers* correspondentes aos genes *18S*, *GLDH* e *LGALDH* em casca e polpa de tomates, onde é possível demonstrar a qualidade dos *primers* utilizados no experimento.

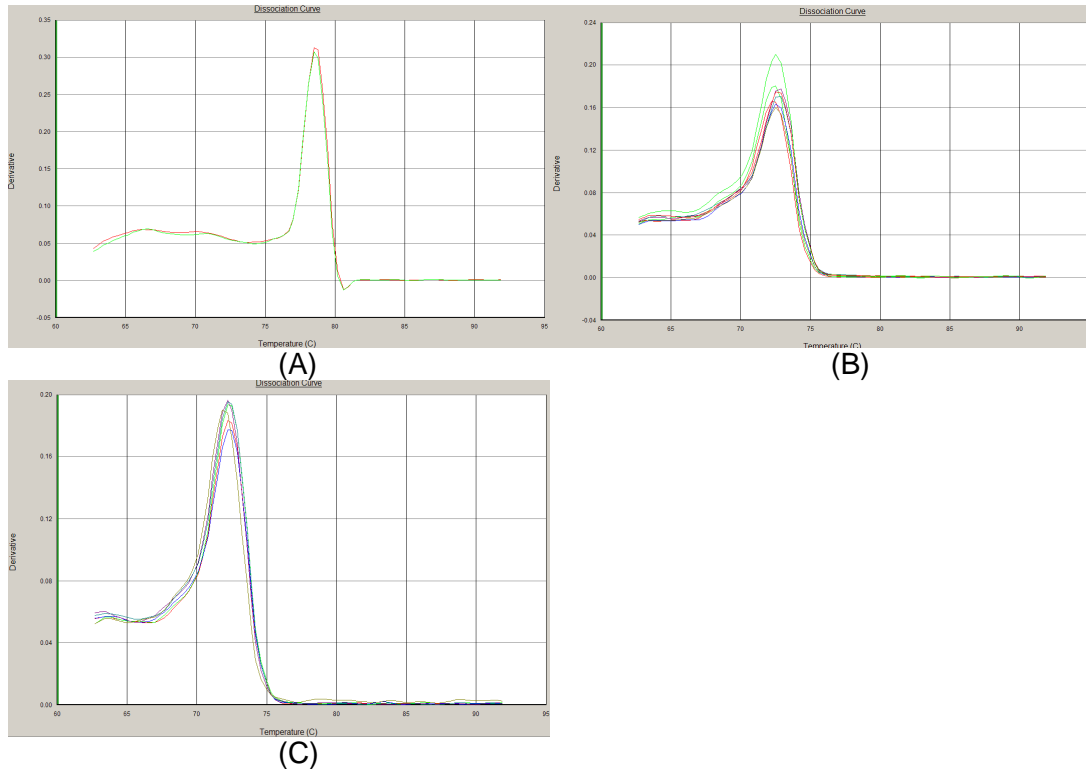


Figura 1. Derivadas das curvas de dissociação das amplificações produzidas a partir dos *primers* construídos para os genes *18S* (A), *GLDH* (B) e *LGALDH* (C).

A expressão transcricional dos genes *LGALDH* e *GLDH*, em média, foi superior na casca, quando comparada à expressão na polpa do fruto (Figura 2). Este comportamento é possivelmente decorrente da maior exposição desse tecido em comparação à polpa, possuindo, portanto, níveis mais elevados de expressão a fim de garantir a proteção do fruto à estresses oxidativos. Araújo et al. (2009), avaliando o teor de vitamina C em frutos de jambolão, e Li et al. (2008) em maçãs, observaram concentrações mais elevadas dessa vitamina na casca, confirmando a tendência de predomínio de acúmulo de transcritos de genes envolvidos na biossíntese da vitamina na casca de frutos.

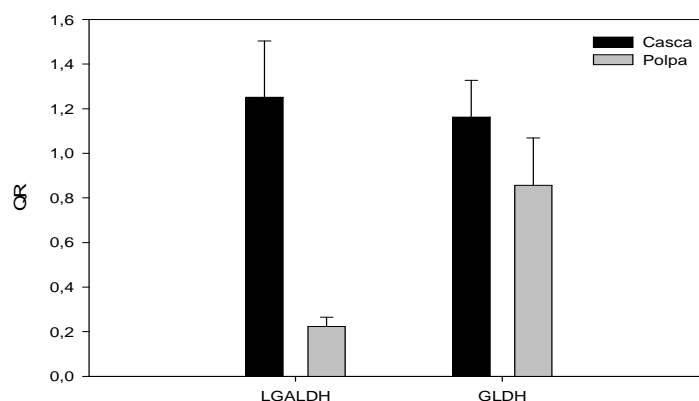


Figura 2. Expressão dos genes *GLDH* e *LGALDH* em casca e em polpa de tomate.

4. CONCLUSÕES

Em tomate, cv. *FlavorTop*[®], no estágio de maturação “*breaker*”, os genes *GLDH* e *LGALDH* apresentaram expressão transcricional superior na casca quando comparada com a expressão observada na polpa. Sendo este tecido de revestimento, a maior expressão está de acordo com a ação protetora do ácido ascórbico produto da ação das enzimas L-galactose dehidrogenase e L-galactono-1,4-lactone dehidrogenase codificadas pelos genes *GLDH* e *LGALDH*.

5. AGRADECIMENTOS

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

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, M.C.P.; GOUVÊA, A.C.M.S.; ROSA, J.S.; OIANO-NETO, J.; GODOY, R.L.O.; PACHECO, S.; GIORI, F.P. Quantificação via CLAE dos teores de vitamina C na casca e na polpa de jambolão (*Syzygium cumini* Lamarck). **32^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Fortaleza, 2009.

LEFERINK, N.G.H.; van den BERG, W.A.M.; van BERKEL, W.J.H. L-Galactono-γ-lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*, a flavoprotein involved in vitamin C biosynthesis. **FEBS Journal**, v. 275, p. 713–726, 2008.

LI, M.J.; MA, F.W.; ZHANG, M.; PU, F. Distribution and metabolism of ascorbic acid in apple fruits (*Malus domestica* Borkh cv. Gala). **Plant Science**, v. 174, p. 606–612, 2008.

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

NASCIMENTO, J.R.O.; HIGUCHI, B.K.; GÓMEZ, M.L.P.A.; OSHIRO, R.A.; LAJOLO, F.M. l-Ascorbate biosynthesis in strawberries: l-Galactono-1,4-lactone dehydrogenase expression during fruit development and ripening. **Postharvest Biology and Technology**, v. 38, p. 34–42, 2005.

SEVERO, J. **Maturação e UVC na expressão transcricional de genes envolvidos nas rotas metabólicas de parede celular, compostos fenólicos e aromas em morango**. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2009.