

EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO TRANSPORTE CELULAR DURANTE A MATURAÇÃO DE PÊSSEGOS

CASARIL, Jardel¹; PEGORARO, Camila²; MANICA-BERTO, Roberta³; TIECHER, Aline⁴; BRACKMANN, Auri⁵; ROMBALDI, Cesar Valmor⁶, SILVA, Jorge Adolfo⁷

¹Acadêmico do Curso de Agronomia da FAEM/UFPeI – Bolsista PIBIC/CNPq, e-mail: casarilagro@ibest.com.br; ²Mestranda em Ciência e Tecnologia Agroindustrial/FAEM/UFPeI - Bolsista CNPq, e-mail: camyagro@yahoo.com.br; ³Doutoranda em Agronomia, área de concentração: Fruticultura de Clima Temperado - Bolsista CAPES, e-mail: robertamanica@yahoo.com.br; ⁴Mestranda em Ciência e Tecnologia Agroindustrial/FAEM/UFPeI - Bolsista CAPES, e-mail: atiecher@yahoo.com.br ⁵ Professor Adjunto na Agronomia/UFSM, e-mail: auri.brackmann@pq.cnpq.br ⁶ Prof. Titular DCTA/FAEM/UFPeI, e-mail: cesarvrf@ufpel.edu.br; ⁷Prof. Adjunto DCTA/FAEM/UFPeI, e-mail: ctajorge@ufpel.edu.br

Introdução

O Rio Grande do Sul é maior produtor brasileiro de pêssegos. A produção gaúcha tradicionalmente possui dois destinos: o consumo *in natura* e o processamento industrial. Os pêssegos da cv. 'Granada' são considerados frutos de dupla finalidade em virtude da aparência, época de colheita e aceitação no mercado.

Pêssegos são frutos climatéricos e caracterizam-se por apresentar um pico na taxa respiratória, que antecede ou sucede um drástico incremento na síntese de etileno (Lelièvre et al., 1997). Esse pico pode ser chamado de *climatério respiratório*, o qual corresponde a maturação comercial dos frutos. Durante o amadurecimento ocorrem transformações bioquímicas, fisiológicas e estruturais. Essas mudanças afetam a aparência, firmeza e aroma, conferindo-lhes melhores características sensoriais.

O estudo de genes envolvidos no metabolismo da maturação é uma das estratégias básicas para explicar a rápida deterioração de frutos, onde a caracterização de genes dentro de uma via biossintética ou reguladora coloca em evidência sua funcionalidade e respostas frente ao desenvolvimento, crescimento e estresses. Esses conhecimentos possibilitam a intervenção no processo de amadurecimento visando aumentar a vida pós-colheita de pêssegos.

A pectina metil esterase (PME) catalisa a desmetilação do C6 do grupo carboxílico de resíduos de galacturosil, desesterificando-os. A poligalacturonase (PG), por sua vez, somente catalisa a hidrólise de ligações α 1-4 do ácido galacturônico quando desesterificado pela PME (Fischer e Bennett, 1991). Portanto, a hidrólise de pectinas depende da ação da PME, que está presente em todos os estádios de desenvolvimento dos frutos, porém, o aumento em sua atividade só ocorre durante o amadurecimento. Essa

enzima é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso e seu transporte até a parede celular ainda não é conhecido.

González-Agüero et al., (2008) ao comparar o transcriptoma de pêssegos que tiveram amadurecimento normal e anormal, observaram grupos de genes diferencialmente expressos, dentre esses, estão os genes envolvidos no metabolismo de parede celular e no tráfego de proteínas por vesículas. Dessa forma, se há transporte celular por vesículas durante a maturação, sugere-se que as proteínas de parede celular sejam transportadas por vesículas até o seu destino final.

Vesículas revestidas por clatrina mediam o transporte seletivo, transportando enzimas hidrolíticas do sítio *trans*-Golgi para o sistema vacuolar. O revestimento se dissocia tão logo se forma a vesícula, deixando-a pronta para se fundir com a membrana-alvo. A clatrina forma uma rede poliédrica, composta por muitas moléculas, que reveste a vesícula que se forma. No transporte mediado por clatrininas há a participação de uma GTPase (Guanosina-trifosfatase) chamada dinamina (*dynamim like protein*), que facilita a formação das vesículas e auxilia no transporte vesicular. Dinaminas, além da importância no tráfego vesicular, têm função regulatória (Sever et al., 1999), recrutando ligações do maquinário endocítico, lipídeos, moléculas de sinalização e proteínas do citoesqueleto (Mcniven, et al.,2000).

Neste sentido o presente trabalho objetivou estudar a possível relação existente entre proteínas envolvidas no transporte vesicular e proteínas de degradação da parede celular durante o amadurecimento de frutos.

Material e Métodos

Para realização dos estudos foram utilizados pêssegos, cv. Granada, em estádios de maturação verde, maduro e sobremaduro, oriundos de um pomar com 6 anos de idade, sobre porta-enxerto 'Capdebosq', com espaçamento entre plantas de 1,5m e sistema de condução em Y, localizados no Centro Agropecuário da Palma da UFPel. O delineamento experimental foi completamente casualizado, consistindo em três tratamentos com duas repetições cada. Após a colheita foi determinada firmeza de polpa com penetrômetro manual com ponteira de 8 mm de diâmetro.

Os *primers* utilizados neste estudo (Tabela 1) foram construídos a partir das sequências selecionadas no *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), por meio do programa *Vector*TM.

A extração de RNAs totais foi baseada no protocolo do reagente *PureLink*TM (*Plant RNA Reagent – Invitrogen*TM). Para a síntese dos cDNAs foi utilizado o *kit* comercial *SuperScript First-Strand System for RT-PCR* (*Invitrogen*TM). Para verificar a qualidade dos cDNAs, realizou-se amplificação por PCR semi-quantitativa, em aparelho termociclador *PTC-200* (*MJ Research, Inc*TM). Para controle da reação utilizou-se o gene constitutivo 18S.

A avaliação por *Real-Time PCR* foi realizada em aparelho *7500 Real-Time PCR System Com Notebook Dell*TM (*Applied Biosystems*TM) e o sistema corante SYBR green (*Applied Biosystems*[®]).

No final dos ensaios de reação foi obtido o C_T (*Threshold Cycle*) do aumento da fluorescência ocorrido durante os ciclos da reação. Os dados ópticos foram analisados com auxílio do programa *7500 System Software*. O cálculo $\Delta\Delta C_T$, baseado na reação exponencial da PCR, foi obtido a partir da expressão $QR=2^{-\Delta\Delta C_T}$,

Os dados foram submetidos á análise estatística através de ferramentas dos programas *SigmaPlot* versão 10.0 e *Winstat* 1.0.

Tabela 1. Origens e seqüências dos primers alvos.

Gene	gi	Forward	Reverse
Metabolismo de parede celular			
Pectina metil esterase (PME)	1213628	AAT GGG CGA CCG TCC TTT TTA C	CAT CGA GCG ATC CAC ACT AGA T
Trafego endomembranas			
Dynamín-like protein1A (ADL1A)	22481576	GTG AAC AAA ATC CAA AGA GCT TG	GCC AGT TTC TCG ATC TGT CTC
Clathrin-binding protein b-adaptín) (Cla)	22483877	CTT GGT GAT CTG ATT GGC ATG G	ACT TGT GGA ACC TGA AGG GGT C
Normalizador			
18 S	66627320	AAA ACG ACT CTC GGC AAC GGA TA	ATG GTT CAC GGG ATT CTG CAA TT

Resultados e Discussão

Tabela 2. Firmeza de polpa.

Maturação	Firmeza (N) ¹
Verde	14,3 a
Maduro	6,5 b
Sobremaduro	4,0 c

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

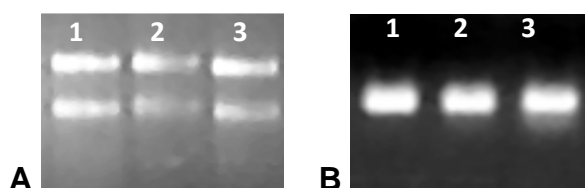


Figura 1: A) Produtos de extração de RNAs de polpa de pêssegos verde (1), maduro (2) e sobremaduro (3). B) Amplificação do gene constitutivo 18S a partir de cDNAs de pêssegos verde (1), maduro (2) e sobremaduro (3).

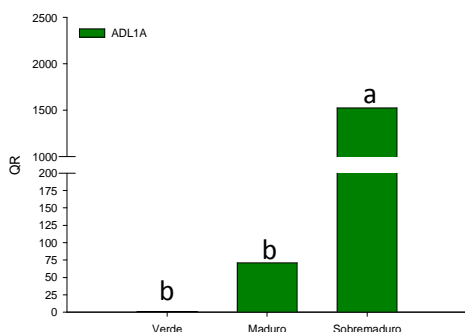
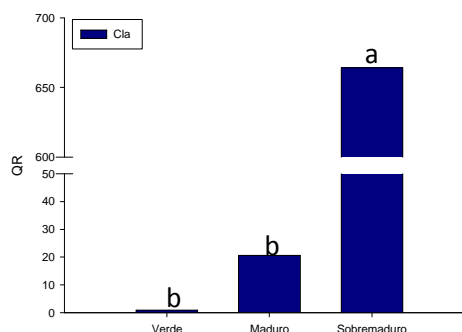
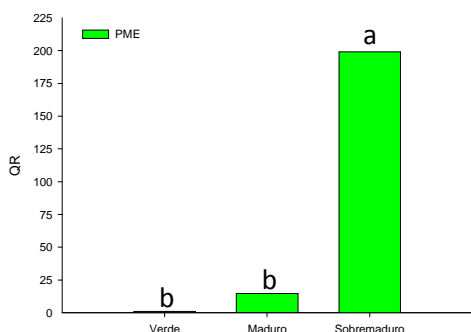


Figura 2: Quantificação relativa da expressão gênica de PME, Cla e ADL em pêssegos 'Granada', em estágios de maturação verde, maduro e sobremaduro. Barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A obtenção de RNAs íntegros (Figura 1A) possibilitou a uniformidade e reprodutibilidade na amplificação de cDNAs do gene 18S (Figura 1B).

(São três figuras) A expressão máxima dos genes de Cla, ADL1A e PME foi detectada no estágio sobremaduro (Figura 2). Esses resultados permitem

fazer uma correlação entre as expressões e emitir a hipótese de que as proteínas de transporte agem junto a PME durante sua produção até a ação na parede celular. Nesse estágio, os frutos apresentam firmeza de polpa muito reduzida (Tabela 2) e estão próximos ao processo de senescência. Ou seja, frutos sobremaduros já sofreram a ação de enzimas envolvidas com a solubilização da parede celular e a crise climatérica já foi concluída.

Conclusão

Os genes de Cla e de ADL possuem máxima expressão em pêssegos cv. Granada sobremaduros, indicando que não há uma 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.

Referências Bibliográficas

- FISCHER, R.L.; BENNETT, A.B. *Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. Annual Review Physiology Plant Molecular Biology*, v.42, p.675-703, 1991.
- GONZÁLEZ-ANGÜERO, M.; PAVEZ, L.; IBÁÑEZ, F.; PACHECO, I., CAMPOS-VARGAS, R., MEISEL, L. A.; ORELLANA, A., RETAMALES, J., SILVA, H., GONZÁLEZ, M., CAMBIAZO, V. *Identification of woolliness response genes in peach fruit after post-harvest treatments. Journal of Experimental Botany*, v.59, n.8, p.1973-1986, 2008.
- LELIÉVRE, J.-M. et al. *Ethylene and fruit ripening. Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.101, p.727-739, 1997.
- LIVAK, K. J., 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.
- MC NIVEN, M. A.; CAO, H.; PITTS, K. R.; YOON, Y. *The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places. Trends in Biochemical Sciences*, n.25, p.115-120, 2000.