

XVIII

CIC

XI ENPOS  
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:  
por uma ciência do devir



## EXPRESSÃO DE GENES COM FUNÇÃO ESTRUTURAL NA PAREDE CELULAR DURANTE A MATURAÇÃO DE PÊSSEGOS

**COELHO, Miguel Telesca<sup>1</sup>; PEGORARO, Camila<sup>2</sup>; MANICA-BERTO, Roberta<sup>3</sup>; SEVERO, Joseana<sup>4</sup>; BOTH, Vanderlei<sup>5</sup>; ROMBALDI, Cesar<sup>6</sup>; SILVA, Jorge Adolfo<sup>7</sup>**

<sup>1</sup>Acadêmico do Curso de Química de Alimentos da UFPel – Bolsista PIBIC CNPq, e-mail: [telesca.coelho@yahoo.com.br](mailto:telesca.coelho@yahoo.com.br); <sup>2</sup>Mestranda em Ciência e Tecnologia Agroindustrial/FAEM/UFPel - Bolsista CNPq, e-mail: [camyagro@yahoo.com.br](mailto:camyagro@yahoo.com.br); <sup>3</sup>Doutoranda em Agronomia, área de concentração: Fruticultura de Clima Temperado - Bolsista CAPES, e-mail: [robertamanica@yahoo.com.br](mailto:robertamanica@yahoo.com.br); <sup>4</sup>Doutoranda em Ciência e Tecnologia Agroindustrial/FAEM/UFPel - Bolsista CAPES, e-mail: [josi\\_severo@yahoo.com.br](mailto:josi_severo@yahoo.com.br); <sup>5</sup>Acadêmico do Curso de Agronomia da UFSM - Departamento de Fitotecnia. Núcleo de Pesquisa em Pós-Colheita, e-mail [vanderleiboth@yahoo.com.br](mailto:vanderleiboth@yahoo.com.br); <sup>6</sup>Prof. Titular do DCTA/FAEM/UFPel, e-mail: [cesarvrf@ufpel.edu.br](mailto:cesarvrf@ufpel.edu.br); <sup>7</sup>Prof. Adjunto no DCTA/FAEM/UFPel, e-mail: [ctajorge@ufpel.edu.br](mailto:ctajorge@ufpel.edu.br).

### 1. INTRODUÇÃO

Pêssegos são frutos economicamente relevantes, porém, por serem frutos climatéricos, com acelerado metabolismo, apresentam curta vida pós-colheita. O estudo de genes envolvidos no metabolismo da maturação é uma das estratégias básicas para explicar a rápida deterioração de frutos. O processo de amadurecimento é marcado pela redução da firmeza de polpa, ocasionada pela ordenada e sequencial expressão de genes que codificam para proteínas de degradação celular, como a poligalacturonase e a pectina metilesterase. Estudos recentes demonstram que a massiva degradação da parede celular durante o amadurecimento é neutralizada pela síntese de polissacarídeos e, especialmente, pela expressão de genes que codificam para proteínas com função estrutural. Trainotti et al. (2003) estudando os diferentes estádios de maturação de pêssegos encontraram elevados níveis de transcritos para proteínas de degradação da parede celular paralelo à expressão de genes com função estrutural na parede.

Dentre as proteínas estruturais de parede celular encontram-se *Cobra*, *Glucan sintase* e *Galactosil transferase*. *Cobra* (*Cob*) são proteínas envolvidas na síntese de celulose e expressas durante as fases de expansão e biossíntese da parede celular (BRADY et al., 2007). Glucan sintase (*GLS*) está envolvida na síntese de calose na parede celular (BROWNFIELD et al., 2007; TÖLER et al., 2008). A síntese de calose geralmente é latente em células de plantas intactas e rapidamente ativadas em resposta ao estresse (DELMER, 1987). Galactosil transferase (*GalT*) é enzima chave na biossíntese de pectinas. A síntese de pectina ocorre no Complexo de Golgi e depois é transportada por vesículas até a parede celular. As pectinas são compostas pelos polissacarídeos homogalacturonana, ramnogalacturonana-I e

galacturonanas. A *GalT* atua na síntese de rhamnogalacturonanos I, catalisando a transferência de galactose para esse polissacarídeo (RIDLEY et al., 2001).

Neste trabalho se teve por objetivo o estudo da expressão transcricional de genes que codificam para proteínas estruturais de parede celular em três estádios de maturação de pêssegos cv. Granada.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se pêssegos cv. Granada, em estádios de maturação verde, maduro e sobremaduro, oriundos de pomar com seis 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/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* (Tabela 1) 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*<sup>TM</sup>.

A extração de RNAs totais foi baseada no protocolo do reagente *PureLink*<sup>TM</sup> (*Plant RNA Reagent – Invitrogen*<sup>TM</sup>). Os RNAs totais foram submetidos à digestão com DNase I (*Invitrogen*<sup>TM</sup>). Para a síntese dos cDNAs foi utilizado o *kit SuperScript First-Strand System for RT-PCR* (*Invitrogen*<sup>TM</sup>). Para verificar a qualidade dos cDNAs, foi realizada amplificação por PCR semi-quantitativa do 18S – gene com expressão constitutiva. A reação foi realizada em termociclador *PTC-200* (*MJ Research, Inc*<sup>TM</sup>) com utilização de *kit Taq DNA polymerase* (*Invitrogen*<sup>TM</sup>).

A determinação dos níveis de transcritos dos genes selecionados foi obtida por PCR quantitativa (*Real-Time PCR*) em aparelho *7500 Real-Time PCR System* com *Notebook Dell*<sup>TM</sup> (*Applied Biosystems*<sup>TM</sup>) e, como corante para detecção da amplificação, o *kit Power SYBR*<sup>TM</sup> *Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*<sup>TM</sup>). As condições da reação foram 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos, seguidas de 40 ciclos com três etapas: 95°C durante 0,5 minuto, 57°C durante 1 minuto e 72°C durante 1 minuto, e extensão final de 72°C durante 5 minutos, seguido de curva de dissociação padrão.

No final dos ensaios de reação foi obtido  $C_T$  (*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  $QR=2^{-\Delta\Delta C_T}$ , no qual QR representa o nível de expressão gênica,  $C_T$  o ciclo de amplificação na qual cada amostra apresenta amplificação exponencial,  $\Delta C_T$  se refere à diferença entre o  $C_T$  da amostra amplificada para o gene alvo e o  $C_T$  da mesma amostra amplificada para o gene controle (18S), e  $\Delta\Delta C_T$  representa a diferença entre o  $\Delta C_T$  da amostra de interesse e o  $\Delta C_T$  da amostra de referência-calibrador (colheita).

Posteriormente os dados foram submetidos à análise estatística através de ferramentas dos programas *SigmaPlot 10.0* e *Winstat 1.0*.

**Tabela 1. Origens e sequências dos primers alvos.**

Gene	Gi	Forward	Reverse
<i>Parede celular</i>			
<i>Galactosyl transferase (GalT)</i>	22480478	ATGTGAAAAGTGGATGCGGAA TG	TTGGATGAGAAGCGGGAAGAGA
<i>Cobra(Cob)</i>	22478530	ACTCATCCAGGAAGCTGTGTAG	ATGGCTGTATCATTTATTGTCGA

<i>Glucan Synthase (GLS)</i>	22478796	TGGGAAACATGGTGGTATGAGGA	CGA GACATTTGAAGTGAGTGAAC
<i>Normalizador</i>			
18 S	66627320	AAA ACG ACT CTC GGC AAC GGA TA	ATG GTT CAC GGG ATT CTG CAA TT

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1A observa-se RNAs totais de boa qualidade, íntegro e sem impurezas. A viabilidade do cDNA construído pôde ser visualizada através da amplificação do gene constitutivo 18S (figura 1B).

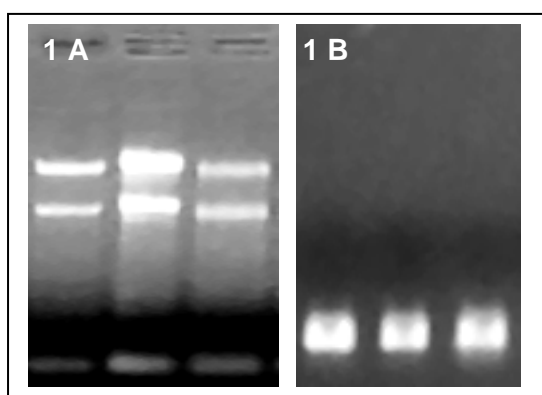


Figura 1: A) Imagem dos produtos de extração de RNAs. B) Amplificação do gene constitutivo 18S a partir de cDNAs.

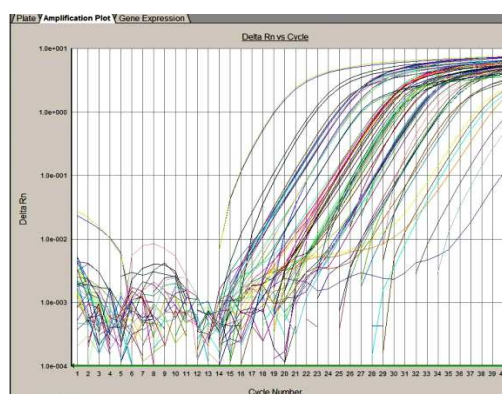


Figura 2: Perfil de amplificação.

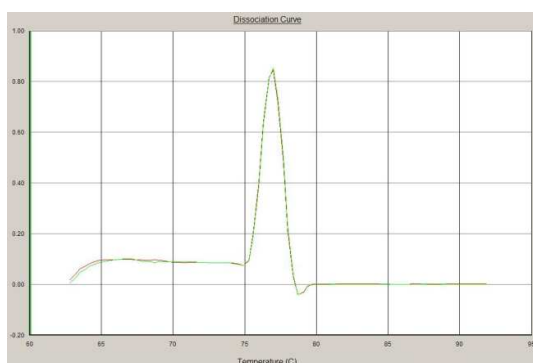


Figura 3: Curva de dissociação.

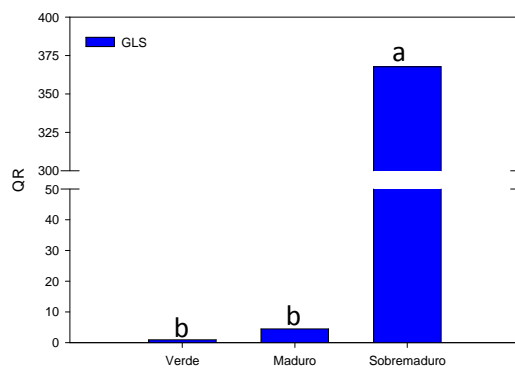
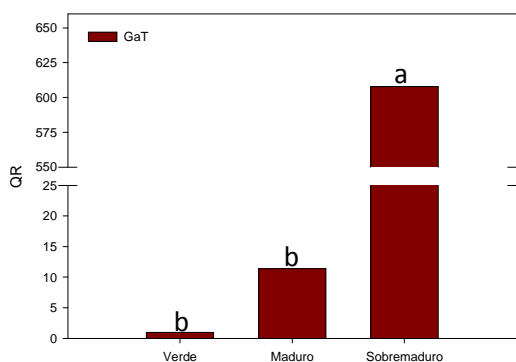
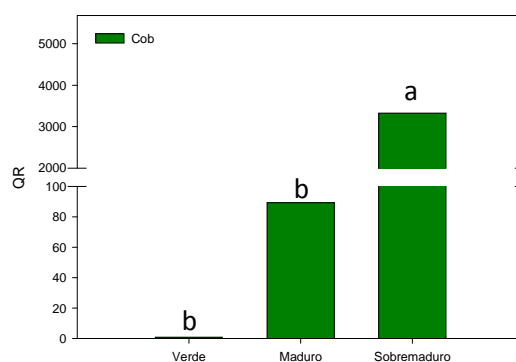


Figura 4: Quantificação relativa da expressão gênica da GLS. Barras seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 5: Quantificação relativa da expressão gênica da GaT. Barras seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).**



**Figura 6: Quantificação relativa da expressão gênica da Cob. Barras seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).**

A reação de Real Time PCR ocorreu normalmente, apresentando crescimento exponencial, seguido pela estabilidade da reação (Figura 2). Os primers utilizados não apresentaram amplificações inespecíficas (Figura 3).

Os genes que codificam para proteínas com função estrutural tiveram seu nível máximo de transcritos no estágio sobremaduro (Figuras 4, 5 e 6). Entretanto, nessa fase, os pêssegos já apresentavam firmeza de polpa muito reduzida (dados não apresentados).

Esses resultados indicam que, além da indução de enzimas de degradação de pectinas que causam o afrouxamento das células, há outros elementos e rotas que são ativos durante o amolecimento de pêssegos. Porém essas enzimas não são suficientes para manter a firmeza de polpa, apenas contribuem para a estabilização da parede celular durante a excessiva degradação no processo de amadurecimento e no início da senescência.

#### 4. CONCLUSÃO

Em pêssegos sobremaduros há um elevado nível de transcritos de genes que codificam para proteínas estruturais de parede celular. Sugere-se que essas proteínas atuam evitando o rompimento da parede celular durante o processo de amadurecimento.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRADY, S. M., S. SONG, K. S. DHUGGA, J. A. RAFALSKI., BENFEY, P. N. Combining expression and comparative evolutionary analysis. The *COBRA* gene family. **Plant Physiol.** 143:172–187, 2007.
- BROWNFIELD, L.; FORD, K.; DOBLIN, M. S.; NEWBIGIN, E.; READ, S.; BACIC, A. Proteomic and biochemical evidence links the callose synthase in *Nicotiana glauca* pollen tubes to the product of the Na GSL1 gene. **Plant J.** v.52, p.147-156, 2007.
- DELMER, D.P. Cellulose biosynthesis. **Plant Physiology**, v.38, p.259-290, 1987.
- 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.
- TÖLER, A.; BROWNFIELD, L.; NEU, C.; TWELL, D.; SCHULZ-LEFERT, P. Dual function of Arabidopsis glucan synthase-like genes GSL8 and GSL10 in male

gametophyte development and plant growth. **The Plant Journal**, v. 54, p. 911-923, 2008.

TRAINOTTI, L.; ZANIN, D.; CASADORO, G. A cell wall-oriented genomic approach reveals a new and unexpected complexity of the softening in peaches. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.54, n.389, p.1821-1832, 2003.