

## EXPRESSÃO TRANSCRICIONAL DE GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE PAREDE CELULAR EM *PHYSALIS*

**BORGES, Carolina Terra<sup>1</sup>; PEGORARO, Camila<sup>2</sup>; MANICA-BERTO, Roberta<sup>3</sup>; FRANCO, Jader Job<sup>4</sup>; SEVERO, Joseana<sup>5</sup>; ROMBALDI, Cesar Valmor<sup>6</sup>; SILVA, Jorge Adolfo<sup>7</sup>.**

<sup>1</sup>Aluna de graduação do Curso de Agronomia FAEM/UFPeI – Bolsista IC-FAPERGS, e-mail: carol\_tborges@hotmail.com; <sup>2</sup>Aluna de mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial/FAEM/UFPeI - Bolsista CNPq, e-mail: camyagro@yahoo.com.br; <sup>3</sup>Aluna de doutorado em Agronomia, área de concentração: Fruticultura de Clima Temperado - Bolsista CAPES, e-mail: robertamanica@yahoo.com.br.; <sup>4</sup>Acadêmico do Curso de Agronomia FAEM/UFPeI - Bolsista IC-CNPq. <sup>5</sup>Aluna de doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial - Bolsista CAPES josi\_severo@yahoo.com.br.; <sup>6</sup>Prof Titular no DCTA/FAEM/UFPeI, e-mail: cesarvrf@ufpel.edu.br, <sup>7</sup>Prof. Adjunto no DCTA/FAEM/UFPeI, e-mail: ctajorge@ufpel.edu.br.

### 1. Introdução

*Physalis peruviana* L. é um fruto que contém altos níveis de vitaminas A, B, C, de carotenóides e de fósforo. Segundo Trinchero et al. (1999), frutos de *physalis* possuem comportamento similar a de frutos climatéricos, pois durante o amadurecimento apresentam um aumento na taxa respiratória, aumento na síntese de etileno e diminuição da firmeza de polpa. Em frutos climatéricos, o etileno induz diferentes enzimas que atuam na degradação da parede celular. O amolecimento durante a maturação é ocasionado pela ação de enzimas como a poligalacturonase (PG), que catalisa a hidrólise das ligações  $\alpha$  1-4 entre os resíduos de ácido galacturônico da cadeia de pectina (FISCHER E BENNETT, 1991). A atuação da pectina metilesterase (PME) desmetilando as pectinas se faz necessária, vez que a PG se torna inativa na presença de grupos metílicos. Na maioria dos frutos as atividades da PG e da PME aumentam durante o amadurecimento concomitantemente com um aumento na maciez do fruto e a solubilização de poliuronídeos da parede. A pectato liase (PL) catalisa a eliminação entre dois resíduos de ácido galacturônico mais ou menos esterificados. Quebram as ligações por transeliminação do hidrogênio dos carbonos das posições 4 e 5 da porção aglicona da pectina.

Estudos realizados com maturação em outros frutos (TRAINOTTI et al., 2003) demonstram que o amolecimento é acompanhado por um aumento na expressão de genes que codificam para enzimas de degradação da parede celular em paralelo à expressão de genes que codificam para proteínas estruturais da parede celular. Dentre as proteínas estruturais de parede celular encontram-se as *Cobra*, *Galactosil*

*transferase* e *Cinamil CoA redutase*. *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). Galactosil transferase (*GalT*) é uma 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). A Cinamoil-CoA redutase (CCR) participa da biossíntese de ligninas, polímero que confere rigidez à parede celular.

Neste trabalho se teve por objetivo quantificar a expressão de genes envolvidos no metabolismo de parede celular de frutos de *physalis* em diferentes estádios de maturação.

## 2. Materiais e métodos

Utilizaram-se *physalis* em estádios de maturação verde, em início de maturação e maduro, oriundos do Horto Experimental da UFPEL. O delineamento experimental foi completamente casualizado, consistindo em três tratamentos com duas repetições cada. Após a colheita foi determinada cor com colorímetro eletrônico, marca Minolta mod. CR-300, com iluminante D65 e abertura de 8mm, L\*, a\* e b\* (*CIE-Lab*). Foram realizadas duas leituras em faces opostas de cada fruto, utilizando-se cinco frutos de cada tratamento. A partir das leituras foram calculados os valores da tonalidade da cor (ângulo h°), expressa em graus, pela fórmula  $h^{\circ} = \tan^{-1} b^*/a^*$ .

A extração de RNA total foi baseada no protocolo do reagente *PureLink™* (*Plant RNA Reagent – Invitrogen™*). Os RNAs totais foram submetidos à digestão com DNase I (*Invitrogen™*). Para a síntese dos cDNAs foi utilizado o *kit SuperScript First-Strand System for RT-PCR (Invitrogen™)*. Para verificar a qualidade dos cDNAs, foi realizada 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 MgCl<sub>2</sub>; 0,5 µL dNTPs; 1,0 µL *primer R*; 1,0 µL *primer F*; 1,0 µL cDNA e 17,95 µL de água ultrapura tratada ao 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 foi utilizado o gene 18S. Os *primers* objeto desse estudo (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™*.

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 o *kit Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™)*. O programa utilizado no aparelho foi: 50°C/2min; 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. No final dos ensaios de reação foi obtido o C<sub>T</sub> (*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<sub>T</sub> o ciclo de amplificação na qual cada amostra apresenta amplificação exponencial,  $\Delta C_T$  se refere à diferença entre o C<sub>T</sub> da amostra amplificada para o gene alvo e o C<sub>T</sub> da

mesma amostra amplificada para o gene controle (18S), e o  $\Delta\Delta C_T$  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* versão 10.0 e *Winstat* 1.0.

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

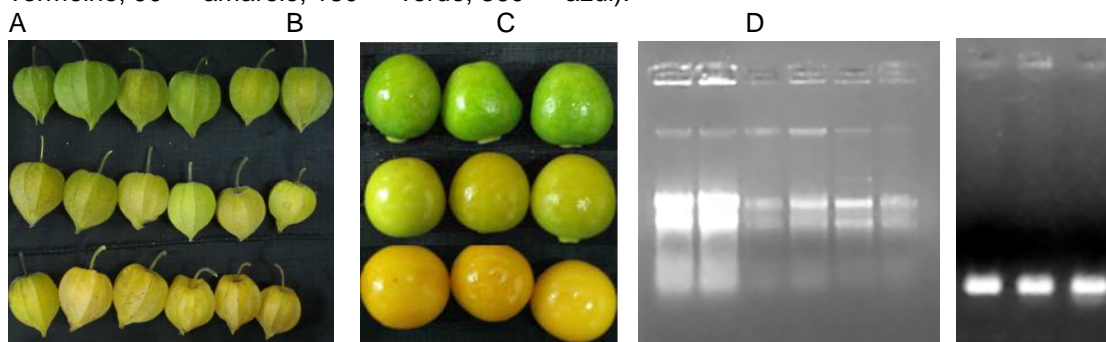
Gene	gi	Forward	Reverse
<b>Parede celular</b>			
Galactosyl transferase (GalT)	22480478	ATGTGAAAAGTGGATGCGGAA TG	TTGGATGAGAAGCGGGAAGAGA
Cobra(Cob)	22478530	ACTCATCCAGGAAGCTGTGTAG	ATGGCTGTATCATTTATTGTCGCA
Cinnamoyl-CoA reductase (CCR)	22481300	ATCAAGTCCAAGACCCCGAGAA	CGCCCA ACA CGGTGCCAGGA
Pectate lyase: (PL)	22483439	AGGTGGCCTCCATTCTCTCTCAGTT	GGAAGCAGAGAGAGACCAGTTCAA
Endopolygalacturonase: (PG)	110293962	AAAGGGTGCCCTGGTCAGGTAAGATA	GCTCTTCTAGGTGGAAGCCCAAGAAA
Pectina methylesterase (PME)	1213628	AGGTGGCCTCCATTCTCTCTCAGTT	GGAAGCAGAGAGAGACCAGTTCAA
<b>Normalizador</b>			
18 S	66627320	AAA ACG ACT CTC GGC AAC GGA TA	ATG GTT CAC GGG ATT CTG CAA TT

### 3. Resultados e Discussão

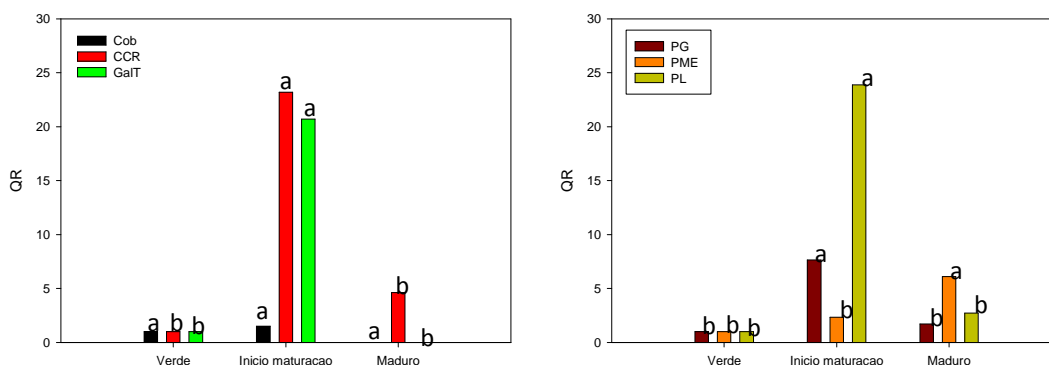
**Tabela 2: Coloração de epiderme ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $h^\circ$ ) de frutos de physalis em três estádios de maturação<sup>1,2</sup>.**

Maturação	$L^*$	$a^*$	$b^*$	Ângulo Hue
Verde	54,86 b	-22,39 c	43,05 b	117,54 a
Início Maturação	62,10 ab	-3,19 b	51,48 a	94,82 b
Maduro	66,80 a	13,12 a	55,37 a	76,77 c

<sup>1/</sup>Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). <sup>2/</sup>  $L^*$  (0 = preto, 100 = branco);  $a^*$  (+a = vermelho, - a = verde);  $b^*$  (+b = amarelo, - b = azul); ângulo  $h^\circ$  (0° = vermelho, 90° = amarelo, 180° = verde, 360° = azul).



**Figura 1: Imagem dos frutos nos estádios de maturação verde, início de maturação e maduros (A e B); dos produtos de extração de RNAs (C) e amplificação do gene constitutivo 18S (D) a partir de cDNAs de physalis.**



**Figura 2: Expressão gênica de *Cob*, *CCR*, *GalT*, *PG*, *PME* e *PL* em diferentes estádios de maturação de *physalis*. Para comparação dos dados foi realizado teste de Tukey a 5% de significância - letras distintas indicam diferença significativa.**

As mudanças observadas na coloração (Tabela 2) durante o amadurecimento podem ser correlacionadas com a degradação de clorofilas e acúmulo de carotenóides. O RNA total foi obtido de forma íntegra e sem contaminantes (Figura 1), o que possibilitou a obtenção de cDNA de boa qualidade.

Ao analisar a expressão dos genes envolvidos na degradação da parede celular observou-se que os correspondentes às enzimas PG e PL tiveram sua expressão máxima no início da maturação enquanto que o da PME só apresentou aumento na expressão quando os frutos já estavam maduros. Sugere-se que o nível máximo de transcritos obtidos com o avanço da maturação seja uma resposta à ação do etileno e o amolecimento na maturação é consequência do produto desses genes.

Na avaliação da expressão dos genes CCR e GalT, ambos com função estrutural na parede celular, verificou-se um aumento de expressão no início da maturação. O gene Cob manteve-se constante durante todo o processo de amadurecimento. A alta expressão de genes com função estrutural é explicada pela contribuição dessas proteínas na estabilização da parede celular durante a excessiva degradação no processo de amadurecimento e no início da senescência, conforme descrito por Trainotti et al., (2003).

#### 4. Conclusão

Durante o amadurecimento de *physalis* ocorre um aumento na expressão de genes que codificam para proteínas de degradação da parede celular, concomitantemente com o aumento da expressão de genes que codificam para proteínas com função estrutural. Esses conhecimentos possibilitarão manejar adequadamente esses frutos no período pós-colheita visando maior vida de prateleira.

#### 5. Agradecimentos

À CAPES e ao CNPq pelas bolsas de estudo de iniciação científica, de mestrado e de doutorado e pelo auxílio à pesquisa.

#### 6. Referências Bibliográficas

BRADY, S. M., SONG, S., DHUGGA, K., RAFALSKI, J. A., BENFEY, P. N. Combining Expression and Comparative Evolutionary Analysis. The COBRA Gene Family. **Plant Physiology**, v. 143, p.172-187, 2007.

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.

RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins, structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**. v.57, p.929-967, 2001.

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.

TRINCHERO , D. G., SOZZI, G. O., CERRI, A. M., VILELLA, F., FRASCHINA, A. A. Ripening-related changes in ethylene production, respiration rate and cell-wall enzyme activity in goldenberry (*Physalis peruviana* L.), a solanaceous species. **Postharvest Biology and Technology**, v.16, p.139-145, 1999.