

EXPRESSÃO TRANSCRICIONAL DE GENES CODIFICADORES DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM TOMATE TRATADO COM RADIAÇÃO UV-C

FRANCO, Jader Job¹; TIECHER, Aline²; BORGES, Carolina Terra³; PAULA, Luciane Arantes de⁴; ROMBALDI, Cesar Valmor⁵.

Universidade Federal de Pelotas-Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial.

¹Graduando em Agronomia, Bolsista de Iniciação Científica-FAPERGS; ²Mestranda em Ciência e Tecnologia Agroindustrial; ³Graduanda em Agronomia, Bolsista de IC – CNPq; ⁴Pós-Doutoranda em Ciência e Tecnologia Agroindustrial; ⁵Professor Titular DCTA-FAEM.
e-mail: jaderjobfranco@yahoo.com.br

SILVA, Jorge Adolfo

Universidade Federal de Pelotas-Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial.

1. INTRODUÇÃO

Como é amplamente conhecido, frutos que são submetidos à situações de estresse térmico, salino e/ou hídrico moderado, ataque por patógenos e/ou radiação ultravioleta-C (UV-C), podem desenvolver mecanismos de defesa como a síntese de metabólitos antioxidantes, redutores de espécies reativas de oxigênio (ROS) e/ou a ativação de enzimas antioxidantes que regulam o metabolismo celular. Dentre essas enzimas, as principais são superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), deidroascorbato redutase (DHAR), glutathione redutase (GR) e monodeidroascorbato redutase (MDHAR) (Foyer et al. 1994).

Acredita-se que a radiação UV-C, aplicada em tomate, possa atuar na indução de resistência às podridões, pelo incremento de compostos bioativos e pela indução de enzimas antioxidantes (Barka, 2001; Charles et al., 2008; Liu et al, 2009). Dessa forma, no presente trabalho se teve como objetivo avaliar o acúmulo de transcritos correspondentes a enzimas antioxidantes no epicarpo e no mesocarpo de frutos de tomate frente à ação da radiação UV-C, partindo-se da hipótese de que a radiação UV-C atua na indução de mecanismos de defesa do fruto, ativando enzimas antioxidantes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Tomates (*Solanum lycopersicum* Mill.) da cultivar Flavortop produzidos através de sistema hidropônico em casas de vegetação no Campus do Capão do Leão da UFPel, foram coletados quando sua coloração apresentava os primeiros sinais de pigmentação amarelada na porção distal do fruto. Imediatamente após a colheita, os frutos foram submetidos a radiação UV-C. Para isso utilizou-se um equipamento com quatro lâmpadas germicidas (*Phillips*[®] 30W), as quais ficaram a distância de 60cm dos frutos. A intensidade da radiação emitida foi determinada com um medidor de luz ultravioleta digital (RS-232 Modelo MRUR-203, *Instrutherm*). Os frutos foram expostos a uma dose de 3,7 kJ m⁻² por 16 minutos, sendo que a cada quatro minutos os tomates foram trocados de posição para que os frutos recebessem a radiação de forma uniforme em toda superfície. Depois de tratados,

os frutos foram acondicionados em bandejas plásticas e mantidos no escuro em temperatura de 20-22°C por sete dias.

A extração de RNAs totais foi feita utilizando o reagente *Concert™ (Plant RNA Reagent)* seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, as amostras de RNAs foram submetidas à separação por eletroforese em gel de agarose (1% m/v), onde se verificou a presença e a integridade das bandas de RNAs ribossomais. Com o objetivo de eliminar DNA genômico residual nas amostras de RNAs, foi realizada digestão com DNase e realizou-se reação de PCR para confirmar a eliminação de DNA residual. Após a digestão, as amostras foram submetidas a síntese de cDNAs, com o uso do kit comercial *SuperScript™ First-Strand System for RT-PCR (Invitrogen®)*. A partir dos cDNAs realizaram-se reações de *Real-time PCR*, utilizando os *primers* específicos, apresentados na Tabela 1. Utilizou-se o sistema *SYBR® Green (Applied Biosystems®)* e aparelho ABI 7500 (*Applied Biosystems®*). Cada reação foi feita em triplicata utilizando placas com capacidade de 96 reações. A expressão relativa (R) dos genes em estudo foi calculada baseada na eficiência (E) e no valor do Ct (*threshold cycle*) da amostra descontando-se o nível transcricional do gene controle 18S (Pfaffl, 2001). Equações:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})}$$

$$R = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta Ct_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Ct_{\text{ref}}(\text{control-sample})}}$$

Os dados foram analisados através de ferramentas do programa *Mult Experiment Viewer (MeV)*, *EASE Expression Analysis Systematic Explorer* versão 4.6 de acordo com Hosack et al. (2003) e apresentados em forma de diagramas de cor.

Tabela 1. *Primers* específicos usados para *Real-time PCR*.

Gene	Acesso	Forward	Reverse
APX	SGN-U578449	TGGACCGCCAATCCCCTTA	GGCATCTTCATCCGCAGCAT
CAT	SGN-U578839	GCCACGCGACCAAGGATCTT	CCTCGGGGTCCATTGTTTGG
SOD	SGN-U581590	AGGCCGTGCCCGTCCTTA	CCAAGGGCATGGACATGGAA
18S	GI 18448	TGTGAAACTGCGAATGGCTCATTA	AAGTCGGGATTTGTTGCACGTATT

*APX: ascorbato peroxidase; CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Não houve incremento no acúmulo de transcritos de genes que codificam para as enzimas antioxidantes estudadas nos frutos controle (Figuras 1 e 2). Quando se aplicou radiação UV-C verificou-se que, após 24h do tratamento, ocorreu maior acúmulo de transcritos no epicarpo dos frutos (Figura 1). No mesocarpo, por sua vez, o maior acúmulo de mRNAs de genes que codificam para enzimas antioxidantes ocorreu no sétimo dia após aplicação de UV-C (Figura 2). Isto pode ser explicado pelo fato de a radiação UV-C ter pouco poder de penetração, agindo mais superficialmente, acarretando inicialmente maior expressão no epicarpo e, na sequência, no mesocarpo. Esse comportamento biológico sugere que a radiação UV-C age inicialmente nas camadas celulares superficiais e, em seguida, transmite o sinal para o mesocarpo do tomate.

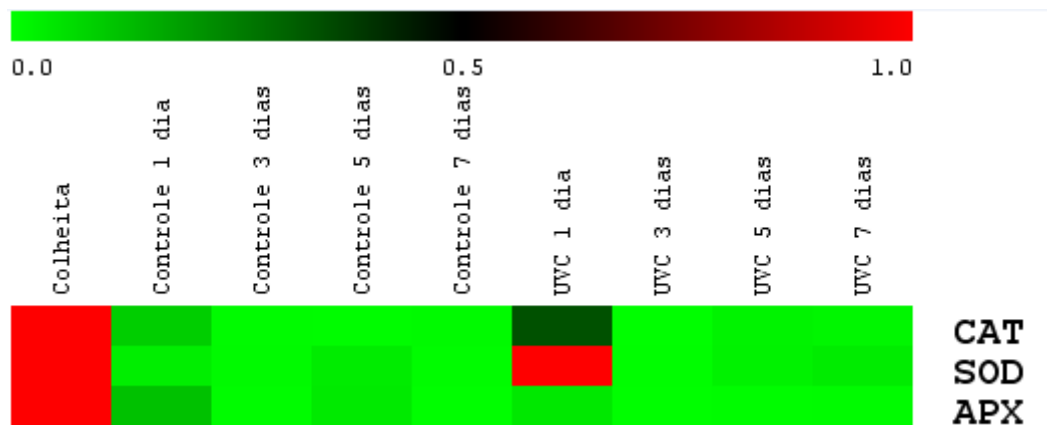


Figura 1. Expressão relativa de enzimas antioxidantes no epicarpo de tomate.

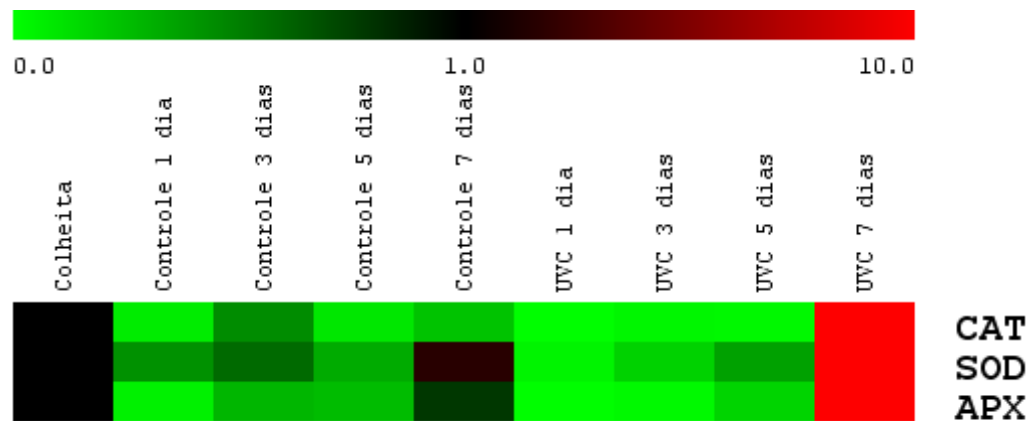


Figura 2. Expressão relativa de enzimas antioxidantes no mesocarpo de tomate.

4. CONCLUSÕES

A radiação UV-C induziu o acúmulo de transcritos de enzimas antioxidantes (CAT, SOD, APX) inicialmente no epicarpo e, em seguida, no mesocarpo dos frutos de tomate. A aplicação de UV-C apresenta potencial para uso no controle de podridões de tomates.

5. AGRADECIMENTOS

À FAPERGS pela Bolsa de Iniciação Científica; ao CNPq pelas bolsas de Iniciação Científica, de Pós-Doutorado Júnior e de Produtividade em Pesquisa e pelo auxílio financeiro; e à CAPES pela bolsa de Mestrado e pelo auxílio financeiro.

6. REFERÊNCIAS

Barka, E.A. Protective enzymes against reactive oxygen species during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits in response to low amounts of UV-C. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne v. 28, p. 785-791, 2001.

Charles, M.T.; Goulet A.; Arul, J. Physiological basis of UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit IV. Biochemical modification of structural barriers. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam v. 47, p. 41-53, 2008.

Foyer C.H. ; Lelandais M. ; Kunert K.J. Photooxidative stress in plants. **Plant Physiology**, Washington v. 92, p. 696-717, 1994.

Hosack, D.A.; Dennis, G.JR.; Sherman, B.T.; Lane, H.C.; Lempicki, R.A. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. **Genome Biology**, v.4, R70, 2003.

Liu, L.H.; Zabarás, D.; Bennett, L.E.; Aguas, P.; Woonton, B.W. Effects of UV-C, red light and sun light on the carotenoid content and physical qualities of tomatoes during post-harvest storage. **Food Chemistry**, London, v.115, p. 495-500, 2009.

Pfaffl, M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.