

A RADIAÇÃO UV-C ATUA COMO UM AGENTE ESTRESSOR CAPAZ DE AFETAR A EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA BIOSÍNTESE DE CAROTENÓIDES E FENÓIS EM TOMATES

ZIMMER, Gustavo¹; TAVARES, Ícaro Borges¹; STÖCKER, Cristiane Mariliz¹; TIECHER, Aline²; ROMBALDI, César Valmor³.

¹ Universidade Federal de Pelotas/Graduando em Agronomia; ² Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. ³ Professor Titular do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial - FAEM. E-mail: gstzimmer@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, existem vários estudos sobre a influência dos estresses abióticos no desenvolvimento das plantas cultivadas. No entanto, esses trabalhos se voltam principalmente para o metabolismo fotossintético de plântulas ou culturas no início do estágio vegetativo, existindo poucos experimentos voltados para influência na qualidade dos produtos (grãos, frutas e hortaliças) colhidos sob esses estresses. Quando se fala em qualidade de frutas e hortaliças, a atividade antioxidante é um dos fatores mais importantes, refletindo em efeitos benéficos na saúde humana. Nos estudos disponíveis, se tem verificado uma tendência de aumento na concentração de antioxidantes em culturas expostas a estresses. Os estudos com radiação UV citam que esse elicitador abiótico causa aumento nos teores de compostos fenólicos (WANG & FREI, 2011). Além dos compostos fenólicos, os carotenóides também são importantes antioxidantes, e podem ter a síntese induzida por UV-C, pois atuam como protetores de tilacóides. Em tomates (*Solanum lycopersicum* Mill.) a coloração vermelha típica do fruto maduro decorre do acúmulo de carotenóides nos cromoplastos (BARSAN et al., 2010), sendo o licopeno o principal deles.

A radiação UV-C, que vem sendo utilizada na conservação de alimentos devido principalmente à ação germicida (MARQUENIE et al., 2002; STEVENS et al., 1998), pode atuar como agente estressor, capaz de ativar mecanismos de defesa nos tecidos vegetais. Dentre esses mecanismos, estão a síntese de compostos antioxidantes (ERKAN et al., 2008; LIU et al., 2009), além da proteção antioxidante enzimática (BARSAN et al., 2010). Assim, o presente trabalho teve como objetivo apresentar alguns resultados encontrados até o momento além de enfatizar a importância de avaliar a influência da radiação UV-C não somente em frutos após a colheita, mas também durante o desenvolvimento desses frutos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Tomates cv. Flavortop[®] produzidos em casa de vegetação da Universidade Federal de Pelotas foram colhidos quando sua coloração apresentava os primeiros sinais de pigmentação amarelada na porção distal do fruto, estágio conhecido como *breaker*. Imediatamente após a colheita, os frutos foram submetidos aos seguintes tratamentos: controle e radiação UV-C a 3,7 kJ m⁻². Para o tratamento com radiação UV-C, utilizou-se um equipamento com quatro lâmpadas germicidas (Phillips[®] 30W), ficando a uma distância de 60 cm 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 à dose de 3,7 kJ m⁻² por 16 minutos; a cada quatro minutos os tomates foram girados 90° para que todos 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 20-32°C. A coleta de amostras para a extração de RNAs foi realizada no momento da colheita, um dia e sete dias após a aplicação dos tratamentos.

O RNA total foi isolado usando *PureLink™ Plant Reagent (Invitrogen)*, e o cDNA foi sintetizado usando *SuperScript III RT™ (Invitrogen)*. As reações de qPCR foram analisadas através do equipamento *7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems)*, usando *SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)*. As sequências de nucleotídeos para tomate foram obtidas no *Sol Genomics Network* e NCBI, usando *Vector™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, E.U.A.)* para desenhar os *primers* gene-específicos (Tab. 1). A eficiência de amplificação de cada par de *primers* foi calculada a partir da seguinte equação: $E = 10(-1/slope)$. Para cada amostra, o valor de Ct (*threshold cycle*) foi obtido e a expressão relativa foi calculada usando a expressão $ER = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). A expressão foi analisada usando *Multi Experimental Viewer (MeV)*, *EASE Expression Analysis Systematic Explorer Ver. 4.6*, e apresentando o diagrama de cor usando frutos do tratamento controle, por ocasião da colheita como calibrador.

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

Genes*	Nº de Acesso	Forward	Reverse
Biossíntese de carotenóides			
AccA	GI 225315532	GTGGTGCACATGCTGATCCGTA	GGAAGCCACCAAGTTTTTCGGAA
AccD	ID 9284	TGCCGAACCCAATGCCTACAT	TCAGCTGCTTGTGAACCTTCGG
PSY	GI 120969569	GCAGGCAGCCTTGGTGAAGA	CAAGCCCAAATTCCCGGA
ZDS	SGN-U568537	TCGGGGGCCAAAGCTGAAA	TCGACATGCCTGCAAGCCC
LCY-B	GI 150014714	TGGTTCATCCATCCACCGGT	TGGCATTGGCAACAACAGGA
CRTRB	SGN-U568606	TTGGGCGAGATGGGCACAC	TGGCGAAAACGTCGTTACAGC
Biossíntese de Fenilpropanóides			
PAL	GI 30687012	CCGGTCGTCCCAATTCCAAA	ATCCAACCGCCGTGCCATT
CHS	SGNU579222	TGGATTTGGGCCTGGGCTT	AGCCCAGCCCCTAAGCAGC
FLS	GI 225321931	ATGGAGGCAGCTGGTGGTGAA	CAGGCCTTGGACATGGTGGATA
Controle endógeno			
ACT	GI 47105122	GGTCGGAATGGGACAGAAGGAT	ACAGGGTGTTCTCAGGAGCAA

* Acetil-CoA carboxilase A (AccA), Acetil-CoA carboxilase D (AccD), Fitoeno sintase (PSY), ζ-caroteno desaturase (ZDS), Licopeno β-ciclase (LCY-B), β-caroteno hidroxilase (CRTRB), Fenilalanina amônia liase (PAL), Chalcona sintase (CHS), Flavonol sintase (FLS), Actina (ACT).

Para os estudos que estão sendo realizados com tratamentos pré-colheita, se escolheu como modelo vegetal o tomate cv. Microtom® pela sua facilidade de cultivo e fácil aplicação da radiação UV-C devido ao porte reduzido. Os frutos estão sendo produzidos em casa de vegetação, testando-se várias doses de UV-C com o intuito de se otimizar o modelo vegetal. Além disso, haverá tratamentos em vários estádios de desenvolvimento, desde a pré-floração até o amadurecimento. Porém, os dados estão sendo obtidos e ainda não foram transformados em resultados e conhecimento.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisarem-se os acúmulos relativos de transcritos de genes apresentados na Fig. 1 pode-se perceber que: a) a radiação UV-C estimula um acúmulo precoce (no primeiro dia após aplicação) de transcritos relacionados à biossíntese de carotenóides tanto no epicarpo como no mesocarpo; b) as respostas

foram mais acentuadas no mesocarpo, com exceção apenas dos transcritos relacionados à enzima accD; c) esses resultados eram esperados, ou seja, que a radiação UV-C, como agente oxidante, estimulasse a síntese de metabólitos protetores do sistema fotossintético (ERKAN et al., 2008; LIU et al., 2009; TANAKA et al., 2008). Porém, por ser um agente físico de ação superficial, se lançou a hipótese de que as respostas seriam mais intensas no epicarpo, entretanto, isso não ocorreu. É possível que outras vias metabólicas tenham sido ativadas com maior intensidade, de modo a proteger as células. Segundo Tanaka et al (2008), as células vegetais desenvolvem mecanismos de defesa frente a agentes estressores, de modo não cumulativo, ou seja, se num determinado tecido ou órgão se estimula a síntese de compostos fenólicos, pode ocorrer redução do acúmulo de carotenóides e/ou antocianinas e/ou ácido ascórbico, ou vice-versa. Assim, é possível que no epicarpo outros genes, de outras vias metabólicas, tenham sido ativados, devido ao efeito superficial que esse tipo de radiação possui (Barka et.al, 2001), enquanto no mesocarpo a via dos carotenóides tenha sido a mais afetada.

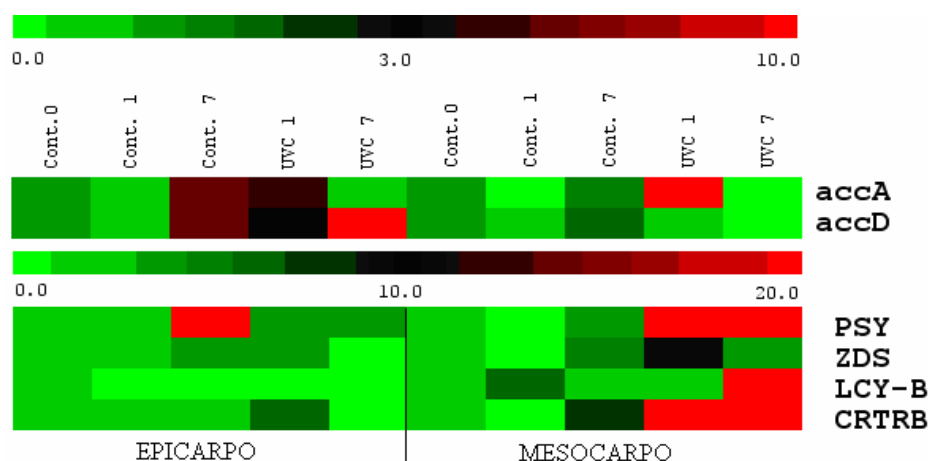


Figura 1. Acúmulo relativo de transcritos de genes que codificam enzimas que atuam na biossíntese de carotenóides no epicarpo e mesocarpo de tomates cv. Flavortop® armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. A escala indica o nível relativo de transcritos em relação ao tratamento controle, primeiramente no epicarpo e depois no mesocarpo.

Além desses transcritos, avaliaram-se aqueles relacionados à biossíntese de compostos fenólicos (Fig. 2). Desse estudo se pode observar que em frutos completamente maduros o tratamento com radiação UV-C estimulou o acúmulo de transcritos tanto no epicarpo como no mesocarpo. Isso evidencia que, apesar do UV-C ter ação superficial, o que estimularia uma resposta maior no epicarpo, pode ter ocorrido uma resposta tecidual sistêmica, estimulando esse acúmulo em camadas mais internas do fruto como é o caso do mesocarpo.

4 CONCLUSÃO

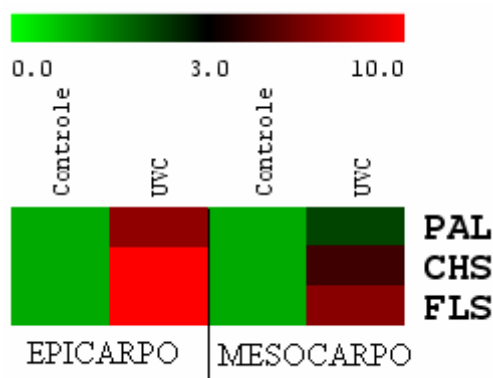


Figura 2. Acúmulo relativo de transcritos de genes que codificam enzimas que atuam na biossíntese de fenilpropanóides no epicarpo e mesocarpo de tomates cv. Flavortop®. A escala indica o nível relativo de transcritos em relação ao tratamento controle.

A radiação UV-C estimula a expressão de genes envolvidos com a biossíntese de carotenóides e fenilpropanóides em frutos de tomate, evidenciando sua capacidade de ativar mecanismos de defesa.

5 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**, v. 28, p. 785-791, 2001.

BARSAN, Cristina; SANCHEZ-BEL, Paloma; ROMBALDI, César; EGEA, Isabel; ROSSIGNOL, Michel; KUNTZ, Marcel; ZOUINE, Mohamed; LATCHÉ, Alain; BOUZAYEN, Mondher; PECH, Jean-Claude. Characteristics of the tomato chromoplast revealed by proteomic analysis. **Journal of Experimental Botany**, v.61, n. 9, p. 2413-2431, 2010.

ERKAN, M.; WANG, S. Y.; WANG, C. Y. Effect of UV treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme and decay in strawberries fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, p. 163-171, 2008.

LIU, L. H.; ZABARAS, 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**, v. 115, p. 495-500, 2009

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.

MARQUENIE, D. MICHAELS, C. W.; GEERAERD, A. H.; SCHENK, A.; SOONTJENS, C.; VAN IMPE, J. F.; NICOLAI, B. M. Using survival analysis to investigate the effect of UVC and heat treatment on storage rot of strawberry and sweet cherry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 187-196, 2002.

STEVENS, C.; LIU, J.; KHAN, V. A.; LU, J. Y.; WILSON, C. L.; IGWEGBE, E. C. K.; KABWE, M. K.; CHALUTZ, E.; DROBY, S. Application of hormetic UV-C for delayed ripening and reduction of *Rhizopus* soft rot in tomatoes: the effect of tomatine on storage rot development. **Journal Phytopathology**, v. 146, p. 211-221, 1998.

TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. **The Plant Journal**, v. 54, p. 733-749, 2008.

WANG, Yunxia; FREI, Michael. Stressed food – The impact of abiotic environmental stresses on crop quality. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 141, p. 271-286, 2011.