

## LANOSIDADE EM PÊSSEGOS: EXPRESSÃO GÊNICA, PROCESSOS ENZIMÁTICOS E MOLECULARES ASSOCIADOS, TECNOLOGIAS E PREVENÇÃO

BORGES, Carolina Terra<sup>1</sup>; PEGORARO, Camila<sup>2</sup>; TIECHER, Aline<sup>3</sup>; FRANCO, Jader Job<sup>4</sup>.

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

<sup>1</sup> Graduanda em Agronomia Bolsista de IC/CNPq; <sup>2</sup> Doutoranda em Fitomelhoramento; <sup>3</sup> Mestranda em Ciência e Tecnologia Agroindustrial; <sup>4</sup> Graduando em Agronomia Bolsista de IC/FAPERGS. E-mail: Carol\_tborges@hotmail.com

SILVA, Jorge Adolfo.

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

### 1. INTRODUÇÃO

A lanosidade é uma desordem fisiológica que afeta frutos de caroço que passaram por longos períodos de armazenamento a frio. Os sintomas são expressos internamente no momento do consumo (Infante et al, 2009), caracterizando-se pela falta de suculência da polpa do fruto. Em pêssegos de polpa branca, como 'Chimarrita', a lanosidade é principal causa de perda de qualidade e depreciação comercial.

Uma das hipóteses mais aceitas sobre as causas da lanosidade é a que associa esse problema ao desequilíbrio entre a atividade das principais enzimas envolvidas com o metabolismo da parede celular, as poligalacturonases (PGs, EC 3.2.1.15 e EC 3.2.1.67) e a pectina metilesterase (PME, EC 3.1.1.11) (Ben Arie e Sonogo, 1980; Zhou et al., 2000; Lurie et al., 2005; Brummell et al., 2004). No entanto, a participação dessas enzimas no processo de desenvolvimento da lanosidade ainda não foi completamente elucidada.

Recentemente González-Agüero et al., (2008), ao comparar os transcriptomas de pêssegos com e sem lanosidade observaram grupos de genes diferencialmente expressos: um grupo de genes envolvidos no metabolismo de parede celular e outro no tráfego celular por vesículas. A maioria dos transcritos desses genes diminuiu em frutos lanosos, possivelmente devido ao prolongado armazenamento a frio que precede o amadurecimento.

Esse trabalho serviu para testar a hipótese de que o frio provoca redução da expressão dos genes que codificam para proteínas envolvidas no tráfego endomembranas (Rab 11 e Vap 27-2), comprometendo a secreção de componentes da parede celular, alterando o metabolismo normal de maturação dos frutos e desenvolvendo a lanosidade. Neste sentido neste trabalho se teve por objetivo quantificar a expressão de genes relacionados ao amadurecimento de pêssego cultivar Chimarrita em diferentes condições de armazenamento.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se pêssegos da cultivar Chimarrita, cultivados sobre porta-enxerto 'Capdebosqc', provenientes de pomares com seis anos de idade, 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: Tratamento I: Armazenamento em temperatura ambiente (TA) ( $23\pm 3^{\circ}\text{C}$  e 75% UR) durante 120h, com coleta de amostras a cada 24h; Tratamento II: Armazenamento em câmara refrigerada (AR) ( $4^{\circ}\text{C}\pm 1$  e  $80\%\pm 5\%$ ) durante 30 dias, seguido de manutenção em TA por 120h, com coleta de amostras a cada 24h; Tratamento III: armazenamento em atmosfera controlada (AC) ( $4^{\circ}\text{C}\pm 1$ ,  $90\%\pm 5\%$  UR, 2% de  $\text{O}_2$  e 8% de  $\text{CO}_2$ ) durante 30 dias, seguido de manutenção em TA por 120h, com coleta de amostras a cada 24h.

A extração de RNAs totais foi baseada no protocolo do reagente *PureLink<sup>TM</sup>* (*Plant RNA Reagent – Invitrogen<sup>TM</sup>*). Para a síntese dos cDNAs foi utilizado o kit comercial *SuperScript First-Strand System for RT-PCR* (*Invitrogen<sup>TM</sup>*). Para verificar a qualidade dos cDNAs, realizou-se amplificação por PCR semi-quantitativa. A avaliação por *Real-Time PCR* dos genes Rab 11 e Vap 27-2 (v-SNARE) foi realizada em aparelho *7500 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems<sup>TM</sup>*) e, como corante para detecção da amplificação, utilizou-se *Power SYBR Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems<sup>TM</sup>*). O programa utilizado no aparelho foi:  $50^{\circ}\text{C}/2\text{min}$ ; desnaturação inicial a  $95^{\circ}\text{C}/10\text{min}$ ; desnaturação a  $95^{\circ}\text{C}/30\text{seg}$ ; anelamento a  $57^{\circ}\text{C}/1\text{min}$  e extensão:  $72^{\circ}\text{C}/1\text{min}$ ; e extensão final a  $72^{\circ}\text{C}/5\text{min}$ . Para controle da reação utilizou-se o gene 18S.

Ao final da reação obteve-se a representação gráfica (*Amp Plot*) e numérica (*Ct*, *Cycle Threshold*) do aumento de fluorescência ocorrido durante os ciclos. Os dados foram analisados no programa *7500 System Software*. O cálculo do  $\Delta\Delta\text{Ct}$  foi realizado utilizando-se a expressão  $\text{QR}=2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ , no qual QR representa o nível de expressão gênica, Ct o ciclo de amplificação na qual cada amostra apresenta amplificação exponencial,  $\Delta\text{Ct}$  refere-se à diferença entre o Ct da amostra amplificada para o gene alvo e o Ct da mesma amostra para o gene controle (18S), e o  $\Delta\Delta\text{Ct}$  representa a diferença entre o  $\Delta\text{Ct}$  da amostra de interesse (expressão em determinado tempo) e o  $\Delta\text{Ct}$  da amostra calibradora (verde).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados da Figura 1 representam a expressão dos genes da cultivar Chimarrita nos diferentes armazenamentos.

Quando os frutos permaneceram somente em TA, os genes de tráfego endomembrana Vap 27-2 e Rab11 tiveram aumento de expressão relativa após 120h de armazenamento. Entretanto, quando os frutos foram submetidos à AR e à AC, esses genes apresentaram aumento nos níveis de transcritos mais precocemente, após 72h em TA.

Altos níveis de transcritos para os genes Vap 27-2 e Rab11 indicam que esses não são os principais responsáveis pelo desenvolvimento de lanosidade em pêssegos cultivar Chimarrita.

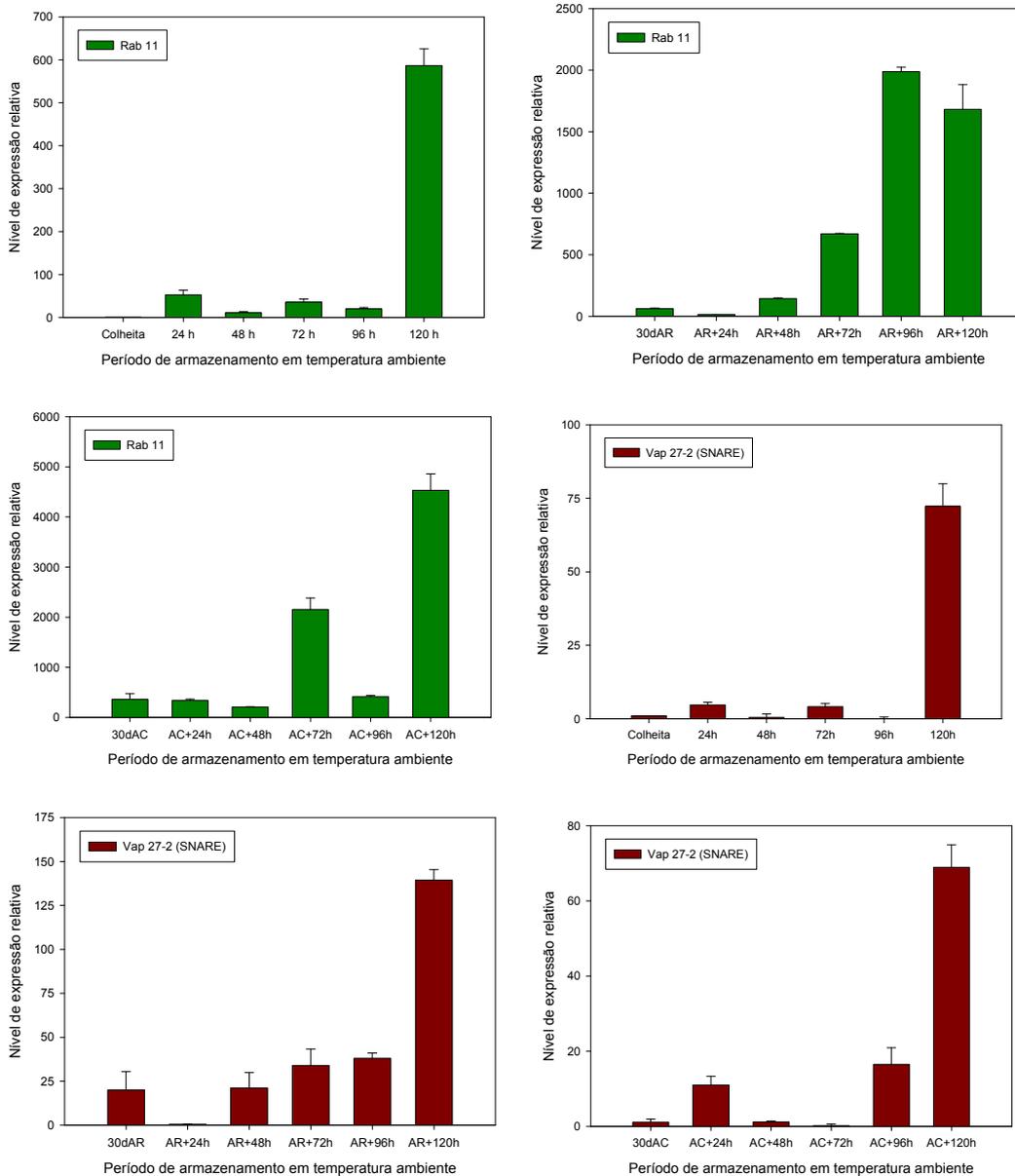


Figura 1. Quantificação relativa da expressão gênica *por Real Time PCR* de Rab 11 e Vap 27-2 em pêssegos cultivar Chimarrita, nos diferentes tratamentos. Para comparação dos dados foram realizados teste de tukey a 5% de significância. Letras distintas indicam diferenças significativas.

#### 4. CONCLUSÕES

A lanosidade em pêssegos ‘Chimarrita’ não é ocasionada pelo baixo acúmulo de transcritos dos genes codificadores por proteínas envolvidas no transporte endocelular.

## 5. AGRADECIMENTOS

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

## 6. REFERÊNCIAS

BEN-ARIE, R.; SONEGO, L. Pectolytic enzyme activity involved in woolly breakdown of stored peaches. **Phytochemistry**, Oxford, v.19, p.2553-2555, 1980.

BRUMMELL, D.A. et al. Cell wall metabolism during the development of chilling injury in cold-stored peach fruit: association of mealiness with arrested disassembly of cell wall pectins. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, p.2041-2052, 2004.

GONZÁLEZ-AGÜERO, 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**, Oxford, v.59, n.8, p.1973-1986, 2008.

INFANTE, R.; MENESES, C.; RUBIO, P.; SEIBERT, E. Quantitative determination of flesh mealiness in peach [*Prunus persica* L.(Batch.)] through paper absorption of free juice. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 5, p.118-121, 2009.

LURIE, S.; CRISOSTO, C.H. Chilling injury in peach and nectarine. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.37, n.2, p.195-208, 2005.

ZHOU, H. W., LURIES, S., LERS, A., KHATCHITSKI, A., SONEGO, L., BENARIE, R. Delayed storage and controlled atmosphere storage of nectarines: two strategies to prevent woolliness. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 18, p.133–141, 2000.