

CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE MELÕES TRANSFORMADOS GENETICAMENTE COM CLONES DA ACC OXIDASE ANTISENSE

RIZZOLO, Rafaela Gadret¹; GONÇALVES, Ciane Xavier²; SANTOS, Railson Schreinert³

¹Aluna de Graduação em Engenharia Agrônômica - UFPel; ²Doutoranda em Biotecnologia - UFPel;

³Aluno de Graduação em Engenharia Agrônômica.

ROMBALDI, Cesar Valmor⁴

⁴Professor - Doutor UFPel

1 INTRODUÇÃO

É amplamente conhecido que a maturação de frutos climatéricos, como é o caso de melões do grupo Cantaloupe, é fortemente regulada pelo etileno (Giovannoni, 2004; Ayub et al., 1996; Silva et al., 2004). De modo geral, a redução da produção e/ou ação desse hormônio contribui para o prolongamento da vida de prateleira dos frutos (Giovannoni, 2004). Nesse contexto, vários trabalhos foram conduzidos, através da engenharia genética, modificando a via biossintética de síntese do etileno, de citocininas e de outros hormônios, bem como da síntese de compostos fenólicos, de compostos voláteis, de pigmentos e da hidrólise da parede celular, com o intuito de prolongar a vida de prateleira e/ou incrementar o valor nutricional ou funcional de frutos e hortaliças (AYUB *et al.*, 1996, Hadfield et al., 1998, Chen et al., 2001, Smith et al., 2002; Silva et al., 2004).

Ayub et al. (1996) e Silva et al. (2004) realizaram a transformação genética do meloeiro, ambos utilizando clones antisense da ACC oxidase. Ayub et al. (1996) utilizaram um clone da ACC oxidase do próprio meloeiro (pLEM 1), previamente isolado e caracterizado por Balagué et al. (1993). Já, Silva et al. (2004) utilizaram o clone pAP4, isolado de maçã 'Royal Gala' (AS3). Ao analisarem-se os frutos provenientes desses transformantes, verificou-se que, nos dois casos, houve significativo aumento da vida de prateleira, mas com alterações fenotípicas como, por exemplo, a retenção da coloração esverdeada da casca, a ausência de formação de zona de abscisão peduncular e o aumento do tamanho dos frutos. Além disso, observaram-se alterações marcantes em termos aromáticos, ou seja, os melões provenientes de linhagens transgênicas são menos aromáticos do que os provenientes de plantas não transformadas. Assim, acredita-se que a transformação genética, ao reduzir significativamente a produção de etileno, possa também ter afetado o metabolismo de solubilização da parede celular, de síntese de ácidos orgânicos, aromas e pigmentos. Portanto, espera-se que, com a suplementação com etileno, possa-se restaurar o modelo original, ou seja, obterem-se frutos semelhantes aos do tratamento controle. Neste trabalho, parte dessa hipótese foi testada, estudando-se os efeitos da transformação genética sobre a concentração e a produção de etileno bem como sobre características físico-químicas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados meloeiros Cantaloupe (*Cucumis melo* var. *Cantalupensis*, Naud cv. *Vedrantais*) não transformados (Controle) e transformados com clone pAP4 ACC oxidase de maçã antisense (AS3 - AS07 - AS85) e outro com clone da ACC oxidase de meloeiro (ASFR). Os meloeiros foram cultivados em casa de vegetação

de acordo com as normas de biossegurança estabelecidos pela CTNBio (Brasil) seguindo os padrões de cultivo desse fruto. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 3 repetições por variedade. Nos frutos, antes da colheita, avaliou-se a concentração do etileno, com o uso de câmara de silicone. Nesses frutos, também foram realizadas análises de: 1) massa (balança analítica); 2) coloração - avaliada por meio das variáveis L (luminosidade), coordenadas (a, b) e ângulo Hue; 3) acidez total titulável - determinada por titulometria de neutralização com NaOH 0,1N, utilizando 10 mL de suco diluídos em 90 mL de água destilada, titulando-se até pH 8,1, os resultados foram expressos em % de ácido cítrico; e, 4) sólidos solúveis totais - determinados utilizando-se refratômetro manual, e os resultados expressos em °Brix.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A concentração de etileno, mensurada ao 30^o e 46^o dia após a antese (DAA), aumentou em melões AS3 e ASFR, passando de aproximadamente 0,03 ppm para 0,35 ppm no primeiro caso, e de 0 ppm para 0,5 ppm no segundo caso. Em frutos do tratamento controle, após o expressivo incremento da concentração de etileno entre o 40^o e 46^o DAA, houve redução da concentração desse hidrocarboneto. Frente a essa situação, pode-se observar que a transformação genética contribui para reduzir a concentração de etileno. No período entre o 32^o e o 36^o DAA há início do incremento da concentração, sucedido pelo pico de etileno no 38^o dia, o que corresponde ao estágio em que os frutos estão maduros do ponto de vista comercial, detectando-se amarelecimento da casca e início da formação de zona de abscisão peduncular. Nos frutos oriundos de plantas não transformadas essa tendência não foi detectada (Figura 1).

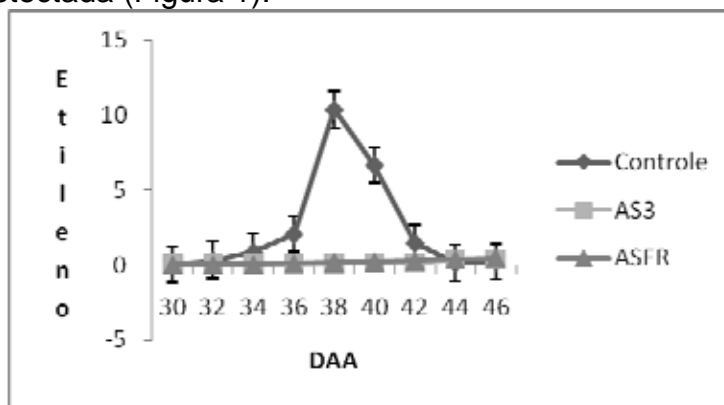


Figura 1. Concentração de etileno nos tecidos de melões das variedades Controle, AS3 e ASFR de 32 a 46 dias após a antese. FAEM/UFPel - 2009.

Ao avaliar-se a massa dos frutos colhidos no estágio maduro, observou-se que os frutos provenientes de plantas não transformadas apresentaram menores valores do que os provenientes de plantas transgênicas, em média, 30% menores (Tabela 1). Isso pode ser explicado pelo fato de que os melões do tratamento controle são colhidos aos 36 a 38 dias após a antese, enquanto aqueles de plantas transgênicas são colhidos aos 42 a 44 dias após a antese. Desse modo, percebe-se que a redução da produção de etileno prolonga o ciclo de crescimento e desenvolvimento, resultando em frutos com maior massa. Esse comportamento é fisiologicamente coerente tendo em vista que a maioria das ações que reduzem a produção e/ou a ação do etileno, prolongam o ciclo vegetativo e/ou de maturação (Flores et al., 2002, Fallik et al., 2001).

Tabela 1. Massa dos frutos provenientes de meloeiros não transformados e transformados geneticamente em diferentes datas de coleta e análise. FAEM/UFPel - 2009.

Variedades	Peso (g) na colheita
Controle	993,96
ASFR	1271,81
AS07	1383,11
AS85	1287,72

Ao se prolongar o ciclo de maturação de frutos antes da colheita, em geral, favorece-se o acúmulo de fotoassimilados, dentre os quais estão os açúcares, contribuindo para a elevação dos teores de sólidos solúveis. De fato isso ocorreu, ou seja, os melões transgênicos apresentaram maiores °Brix do que os do tratamento controle (Tabela 2). Embora essa variável não considerar apenas os açúcares, mas todas as moléculas solúveis em água, pode-se afirmar que os maiores incrementos em sólidos solúveis nos melões transgênicos se devem aos açúcares, tendo em vista que os melões são relativamente pobres em ácidos orgânicos (Tabela 2) e sais minerais. As variações nos teores de acidez total titulável foram significativas entre os genótipos, mas não há uma relação direta com a hipótese testada, ou seja, não há inter-relação com a transformação genética. Independentemente dessa situação, há que se ressaltar que, ao se considerar os valores de acidez total, se pode classificar os melões como frutos pouco ácidos.

No que tange à coloração, os frutos do tratamento controle diferenciaram-se dos demais, indicando uma evolução mais rápida da maturação resultando em maiores valores do ângulo Hue (Tabela 2). Tal comportamento é decorrente da degradação de clorofilas e aumento da síntese e acúmulo de carotenóides, como previamente observado por outros autores (Silva et al., 2004; Bauchot et al., 1998).

Tabela 2. Características físico-químicas de melões Cantaloupe 'Vedrantais'. FAEM/UFPel - 2009.

Tratamento	Casca		Polpa			
	L* (Luminosidade)***	Cor (Hue)	L* (Luminosidade)	Cor (Hue)	ATT (% ac. Cítrico)	SST (°Brix)
AS07 (colheita)	62,34 a**	-68,41 b	61,35 abc	74,83 b	1,6 b	12,06 a
AS85 (colheita)	62,45 a	-77,12 b	55,03 c	73,65 b	1,4 c	11,85 a
ASFR (colheita)	68,73 a	-76,05 b	61,50 abc	75,15 b	1,32 c	11,08 a
ASFR (3 dias)	67,04 a	-80,19 b	57,81 bc	74,96 b	0,85 d	13,26 a
Controle (colheita)	57,95 a	32,94 a	60,24 abc	72,90 b	1,4 c	5,32 b
Controle (3 dias)	61,57 a	-63,43 b	66,50 a	79,53 a	2,3 a	5,20 b

**Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

***L* = 100 = branco, L* = 0 = preto; ângulo Hue ou matiz ($^{\circ}h^* = \text{tang}^{-1} b^*/a^*$).

4 CONCLUSÕES

A redução da concentração de etileno retarda a colheita, proporcionando aumento da massa e do teor de sólidos solúveis de melões, preservando melhor a coloração esverdeada da casca.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo auxílio financeiro e pela concessão de bolsa.

6 REFERÊNCIAS

AYUB, Ricardo; GUIB, Monique; BEM-AMOR, Mohamed; GILLOT, Laurent; ROUSTAN, Jean-Paul; LATCHE, Alain; BOUZAYEN, Mondher; PECH, Jean-Claude, Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. **Nature Biotechnology**, v. 14, n. 7, p. 862-866, 1996.

BALAGUÉ, Claudine, WATSON, Colin F., TURNER, Andrew J., ROUGE, Pierre, PICTON, Steve, PECH, Jean-Claude, GRIERSON, Don.. Isolation of a ripening and wound-induced cDNA from *Cucumis melo* L. encoding a protein with homology to the ethylene-forming enzyme. **European Journal of Biochemistry**. v. 212, n. 1; p. 27–34, 1993.

BAUCHOT, Anne D.; MOTTRAM, Donald S.; DODSON, Andrew T.; JOHN, Philip.. Effect of Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid Oxidase Antisense Gene on the Formation of Volatile Esters in Cantaloupe Charentais Melon (Cv. Vedrandais). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 4787-4792, 1998.

CHEN, Long-Fang O.; HWANG, Jia-Yuan; CHARNG, Yee-Yung; SUN, Chi-Wen; YANG, Shang-Fa.. Transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) with isopentenyltransferase gene via *Agrobacterium tumefaciens* for post-harvest yellowing retardation. **Molecular Breeding**. v. 7, n. 3, p. -257, 2001.

FALLIK, Elazar; ALKALI-TUVIA, Sharon; HOREV, Batia; COPEL, Azika; RODOV, Victor; AHARONI, Yair; ULRICH, Detlef; SCHULZ, Hartwig.. Characterisation of 'Galia' melon aroma by GC and mass spectrometric sensor measurements after prolonged storage. **Postharvest Biology and Technology**. v. 22. n. 1; p. 85-91, 2001.

FLORES, Francisco; EL YAHYAOU, Fikri; DE BILLERBECK, Gustavo; ROMOJARO, Felix; LATCHÉ, Alain; BOUZAYEN, Mondher; PECH, Jean-Claude; AMBID, Christian.. Role of ethylene in the biosynthetic pathway of aliphatic ester aroma volatiles in Charentais Cantaloupe melons, **Journal of Experimental Botany**. v. 53, n. 367, p. 201-206, 2002.

GIOVANNONI, James J.. Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. **The Plant Cell**. v. 16, p. 170-180, 2004.

HADFIELD, Kristen A.; DANG, Tam; GUIB, Monique; PECH, Jean-Claude; BOUZAYEN, Mondher; BENNETT, Alan B.. Characterization of Ripening-Regulated cDNAs and Their Expression in Ethylene-Suppressed Charentais Melon Fruit. **Plant physiology**. v. 122, n. 3, p. 977-983, 2000.

SILVA, Jorge A.; DA COSTA, Tatiane S.; LUCCHETTA, Luciano; MARINI, Leonor J.; ZANUZO, Márcio R.; NORA, Leonardo; NORA, Fabiana R.; TWYMAN, Richard M.; ROMBALDI, Cesar V.. Characterization of ripening behavior in transgenic melons expressing an antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene from apple. **Postharvest Biology and Technology**. v. 32, n. 3, p. 263-268, 2004.

SMITH, Christopher J. S.; WATSON, Colin F.; MORRIS, Peter C.; BIRD, Colin R.; SEYMOUR, Graham B.; GRAY, Julie E.; ARNOLD, Christine; TUCKER, Gregory A.; SCHUCH, Wolfgang; HARDING, Steven; GRIERSON, Donald.. Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. **Plant Molecular Biology**. v. 14, n. 3, p. 369-379, 1990.