

## EFEITO DA RADIAÇÃO UV-C NO ACÚMULO DE TRANSCIS-2-ACETIL-3-METIL-2-OTOLATO DE SINTASE E ACC OXIDASE EM TOMATES

**DIAS, Letícia<sup>1</sup>; TIECHER, Aline<sup>2</sup>; LANCHE, Alain<sup>3</sup>; ROMBALDI, César<sup>4</sup>; VALMOR<sup>4</sup>; SILVA, Jorge Adolfo<sup>5</sup>.**

<sup>1</sup>Graduanda em Agronomia FAEM/UFPEL, Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Departamento de Tecnologia Agroindustrial; <sup>2</sup>Boutoranda em Ciências e Tecnologia Agroindustrial; <sup>3</sup>Pesquisador ENSAT-França; <sup>4</sup>Professor DCTA-FAEM/UFPEL.

e-mail: [leticiawinke@yahoo.com.br](mailto:leticiawinke@yahoo.com.br)

**SILVA, Jorge Adolfo**

<sup>5</sup>Professor Adjunto, Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Departamento de Tecnologia Agroindustrial.

e-mail: [askjorge@brturbo.com.br](mailto:askjorge@brturbo.com.br)

### 1 INTRODUÇÃO

O hormônio vegetal etileno é o principal responsável pelo amadurecimento do fruto de tomate. Sua biossíntese é iniciada a partir da formação de 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) a partir do metionina (SAM). A enzima 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintase (ACC sintase) regula a produção de ACC. No entanto, os genes da ACC sintase e da ACC oxidase são ativados pelo etileno, portanto, os mecanismos de controle da biossíntese de etileno são importantes para alterar a produção de etileno (BLEECKER; KENDE, 2000; ALEXANDER; GRIERSON, 2002).

A radiação UV-C, que vem sendo utilizada para a desinfestação de alimentos (MAHARAJ et al., 1999), também é um estressor abiótico. A radiação UV-C pode induzir a produção de etileno e a biossíntese de ACC. Neste trabalho, buscou-se avaliar o acúmulo de transcritos correspondentes à ACC sintase e à ACC oxidase no mesocarpo e no epicarpo de frutos de tomates submetidos à radiação UV-C.

### 2 MATERIAL E MÉTODOS

Tomates cv. Flavia cultivados em casa de vegetação foram submetidos à radiação UV-C imediatamente após a colheita com auxílio de uma lâmpada de 41 W (Philips 30W), as quais foram acondicionadas em recipientes de 60 cm<sup>3</sup>. A intensidade da radiação foi medida com um medidor de luz ultravioleta digital (RS-232 Modelo MRUR-203, Instrutherm). Os frutos foram submetidos a uma dose de 3,7 kJ m<sup>-2</sup> por 16 minutos, sendo que a cada 4 minutos era feita uma movimentação de 180° para que tivessem a mesma intensidade de radiação. Após este tratamento, os frutos foram acondicionados no escuro a temperatura de 20° a 22 °C por 7 dias para poderem ser avaliados. Os frutos foram submetidos a um tratamento com o 1-metilciclopropeno, (1-MCP), já que a ação do etileno é responsável pelo amadurecimento do fruto.

UV-C at u a na síntese de s s e h o r m ô aplicaram-se os seguintes tratamentos: T1 (controle), T2 (UV-C), T3 (1-MCP) e T4 (1-MCP +UV-C). As coletas para as análises foram realizadas no momento da colheita, um dia e sete dias após os tratamentos.

A extração de RNA's totais foi feita utilizando *PureLink™ Plant Reagent* (Invitrogen), seguiu-se a digestão com *DNAse I™* (Invitrogen). O cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA usando *SuperScript III RT™* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. As reações de qPCR foram realizadas no equipamento 7500 Fast Real Time PCR System (*Applied Biosystems*), a partir de 1 µL do cDNA (diluído 5 vezes) e 2 mM de *primers forward* e *reverse*, usando *SYBR Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*) em um volume total de 20 µL. Os parâmetros de temperatura foram: 95°C por 1 minuto, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 72°C por 1 minuto, com o melting curve para verificar a especificidade dos *primers* utilizados. As sequências de nucleotídeos foram obtidas no *Sol Genomics Network* e *National Center for Biotechnology Information*, usando *Vector™* (Invitrogen, Carlsbad, CA, E.U.A.) para desenhar os *primers* gene-específicos (Tabela 1). A eficiência de amplificação dos *primers* foi calculada a partir da equação  $-1/\text{slope}$ .

Para cada amostra, o valor de Ct (*threshold cycle*) foi obtido e a expressão relativa foi calculada usando a equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001). A expressão foi analisada com o *Multi Experimental Viewer* (MeV), *EASE Expression Analysis Systematic Explorer* Ver. 4.6, e apresentando o diagrama de cor usando frutos do tratamento controle, pós-colheita como calibrador.

Tabela 1. Primers usados para qPCR

Genes	Número de Acesso	Forward	Reverse
ACC sintase	SGN-U567978	GAGCCAGGGTGGTTCCGAGT	GAATCCTCGCGAGCGCAATA
ACC oxidase	SGN-U579104	CGACACCGAGTGATGGCTGAA	GAAATGATGGCCTCACCAGCAG
Actina (ACT)	GI 47105122	GGTCGGAATGGGACAGAAGGAT	ACAGGGTGTTCCTCAGGAGCAA

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve incremento no número de transcritos do gene que codifica para a enzima ACC sintase no epicarpo dos frutos no primeiro dia após a aplicação de UV-C (Fig. 1). Nos frutos do tratamento controle e nos tratados com 1-MCP + UV-C o incremento corresponde ao observado no epicarpo, todos os tratamentos apresentaram incremento e acúmulo de transcritos do gene putativo da ACC sintase no sétimo dia de armazenamento. Nos frutos que foram submetidos ao tratamento com 1-MCP apresentaram elevado nível de transcritos tanto no primeiro dia de armazenamento, indicam uma rápida resposta a moléculas de etileno. A expressão transcricional da ACC oxidase manteve-se baixa no epicarpo e mesocarpo, em todos os tratamentos, exceto nos frutos controle (Fig. 1).

Conforme observado, os tratamentos com 1-MCP e 1-MCP+UV-C resultaram em menor acúmulo de transcritos no primeiro dia após a

tratamentos, confirmando o efeito do 1-MCP como inibidor da ação do etileno (HOEBERICHTS et al. 2002). Já, a radiação UV-C induziu novo aumento dos transcritos da ACC sintase no primeiro dia no epicarpo dos frutos, evidenciando o efeito superficial que esse tipo de radiação opera em decorrência da maior acumulação de etileno no epicarpo do fruto, provavelmente devido ao estresse gerado pelo UV-C, apresentando imediata resposta na expressão de enzimas relacionadas à biossíntese.

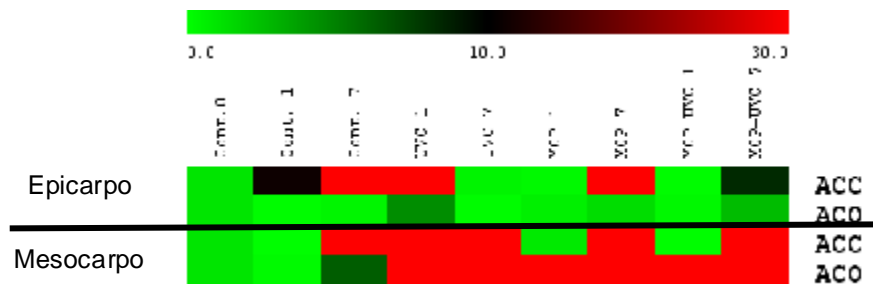


Figura 1. Acúmulo relativo de transcritos de genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese do etileno no epicarpo e mesocarpo de tomates cv. Flavortop® armazenados pelo período de 14 dias após o tratamento. A esta análise, o nível de transcritos em relação ao controle primeiramente no epicarpo e depois no mesocarpo.

#### 4 CONCLUSÃO

A radiação UV-C promoveu resposta imediata na expressão do gene que codifica a enzima ACC sintase no epicarpo dos frutos, confirmando seu poder estressor. Além disso, a 1-MCP foi mais eficaz na indução dos transcritos da ACC sintase do que da ACC oxidase.

#### 5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à FAPESP pelo auxílio à pesquisa e à auxílio e bibliotecas.

#### 6 REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, L.; GRIERSON, D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 2039-2055, 2002.
- 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.
- BLEECKER, Anthony B.; KENDE, Hans. Ethylene: A Gaseous Signal Molecule in Plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, 2000. 16, p. 1-18.
- CHARLES, M. T.; MERCIER, J.; MAKHLOUF, J.; ARUL, J. Physiological basis of UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit I. Role of pre- and- post-challenge accumulation of the phytoalexin-rishitin. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47 p. 10-20, 2008.

HOEBERICHTS, F. A.; VAN DER PLAS, L.H.W.; WOLTERING, E.J. Ethylene perception is required for the expression of tomato ripening-related genes and associated physiological changes even at advanced stages of ripening. **Postharvest Biology and Technology**, v. 26, p. 125–133, 2002.

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*, 25, 402–408, 2001.

MAHARAJ, R.; ARUL, J.; NADEAU, P. Effect of photochemical treatment in the preservation of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Capello) by delaying senescence. **Postharvest Biology and Technology**, v. 15, p. 13-23, 1999.