



ASSOCIAÇÃO ENTRE A INDUÇÃO TRANSCRICIONAL DE UMA α -L-ARABINOFURANOSIDASE E ETILENO EM POLPA DE MAÇÃ ‘GALA’ ARMAZENADA SOB REFRIGERAÇÃO

TATIANE TIMM STORCH¹; TACIANE FINATTO²; VERA QUECINI³; CÉSAR VALMOR ROMBALDI⁴; FRANÇOIS LAURENS⁵; CÉSAR LUIS GIRARDI³

INTRODUÇÃO

Alterações na textura de frutos, tais como a farinosidade de polpa em maçãs da variedade ‘Gala’ têm sido relacionadas à ação de enzimas que modificam a parede celular (GOULÃO et al., 2007; NOBILE et al., 2011) sendo que algumas destas têm sua transcrição e atividade influenciadas pelo etileno (BENNETT; LABAVITCH, 2008).

Entre as enzimas que modificam a parede celular, destaca-se a α -L-arabinofuranosidase por apresentar atividade ressaltada em estádios avançados de amadurecimento (GOULÃO et al., 2007). Em maçã, análises filogenéticas da sequência codificadora dos genes de α -L-arabinofuranosidases têm demonstrado que estes são agrupados em duas famílias: a família das Glicosil Hidrolases 51 (GH51), onde está incluído o gene *MdAF1* (GOULÃO et al., 2008), e Glicosil Hidrolases 3 (GH3), onde está agrupado o gene *MdAF3*, cuja transcrição foi demonstrada em associação ao aparecimento da farinosidade de polpa em genótipos de maçã suscetíveis ao distúrbio (NOBILE et al., 2011). Entretanto, estudos adicionais são necessários a fim de avaliar a dependência de *MdAF3* ao etileno.

Assim, o presente trabalho apresenta resultados preliminares que sugerem a influência do etileno sobre a regulação transcricional dos genes *MdAF1* e *MdAF3* que codificam α -L-arabinofuranosidases das famílias GH51 e GH3, respectivamente. Para tal, foi avaliada a transcrição dos dois genes em frutos tratados com etileno exógeno e com o inibidor 1-MCP (1-metilciclopropeno), em comparação ao nível transcricional dos genes *MdACO*, que codifica a enzima ACC oxidase - ácido aminociclopropano carboxílico oxidase, envolvida na biossíntese de etileno - e *MdERF1*, que codifica um fator de transcrição da superfamília APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR, e é relacionado à sinalização mediada pelo etileno.

¹Quím. de Alim., estudante de pós-graduação, Universidade Federal de Pelotas-RS, e-mail: tatistorch86@hotmail.com

²Bióloga, bolsista CAPES/PNPD, Embrapa Uva e Vinho-RS, e-mail: tfinatto@gmail.com

³Eng. Agr., pesquisador Embrapa Uva e Vinho-RS, e-mail: girardi@cnpuv.embrapa.br

⁴Professor, Universidade Federal de Pelotas – Dept. Ciência e Tecnologia Agroindustrial –s/n caixa postal 354, 96010-900, Pelotas, RS – Brasil, e-mail: cesarvrf@ufpel.tche.br

⁵Pesquisador UMR 1259 Génétique et Horticulture (GenHort) Angers, France, e-mail : francois.laurens@angers.inra.fr

MATERIAL E MÉTODOS

A análise transcricional foi realizada empregando maçãs (*Malus domestica Borkh*) do clone Baigent (cv. Gala), colhidas em pomares comerciais do município de Caxias do Sul, na safra 2009. Os frutos foram transportados até a sede da Embrapa Uva e Vinho, onde receberam tratamentos com 10 ppm de etileno ou 625 ppb de 1-MCP (Agro Fresh - 0,14%). Frutos da condição controle não foram tratados. Uma parcela dos frutos tratados e não tratados foi mantida em temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) durante 12 dias, enquanto a outra parcela foi armazenada sob refrigeração (AR) por 6 meses a 0°C e $\pm 95\%$ de umidade relativa.

Neste trabalho, são relatados resultados preliminares, obtidos por RT-qPCR (transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase em tempo real), referentes à transcrição dos genes *MdAF3*, *MdAF1*, *MdACO* e *MdERF1* em frutos mantidos por 9 dias à temperatura ambiente e por 2, 4 e 6 meses sob AR. Para a avaliação do acúmulo de transcritos, extraiu-se o RNA da polpa dos frutos segundo o método modificado de Zeng e Yang, 2002. Em seguida, o DNA genômico foi eliminado por tratamento com DNase I (BioLabs) e a primeira fita de cDNA foi sintetizada utilizando a enzima M-MLV-Reverse Transcriptase (Promega). Finalmente, a análise do acúmulo de transcritos foi feita por PCR em Tempo Real (qPCR) em equipamento StepOne (Applied Biosystems) utilizando-se do kit SYBR[®] Green PCR Master Mix (Life Technologies). A quantificação relativa dos transcritos foi efetuada pelo método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$, sendo o gene *MdACT*, que codifica uma β -actina, utilizado como controle endógeno e o cDNA referente à colheita utilizado como amostra referência. As análises foram conduzidas fazendo-se uso de replicatas técnicas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise transcricional estão exibidos na Figura 1, onde o baixo nível de transcrição do gene *MdACO* demonstra que o tratamento com 1-MCP foi eficiente em reduzir a síntese autocatalítica de etileno, pois os níveis de transcrição desse gene foram menores nos frutos tratados com o inibidor em todos os períodos avaliados. Esse resultado comprova a inibição da ação do etileno pelo 1-MCP na situação experimental utilizada. O composto 1-MCP é um inibidor competitivo do etileno, ocupando seus sítios receptores e impedindo sua ação (BLANKENSHIP; DOLE, 2003).

A transcrição do gene *MdAF3* foi fortemente induzida pelo tratamento com etileno, e reduzida com o uso do 1-MCP. Exceto em 6 meses sob AR, *MdAF3* apresentou um comportamento transcricional bastante semelhante à *MdACO*, como pode ser visualizado na Figura 1. Esses resultados demonstram que o gene é positivamente regulado pelo etileno. Essa regulação positiva pelo etileno e a presença de transcritos até 6 meses de armazenamento, com pico de transcrição aos 2 meses, sugerem o envolvimento da atividade transcricional de *MdAF3* com a farinosidade de

polpa em maçã ‘Gala’, que é observada em frutos desta variedade após o terceiro mês de AR (BRACKMANN, 1992). De forma complementar, está sendo conduzido um trabalho adicional incluindo a análise do comportamento transcricional de *MdAF3* e a atividade enzimática α -L-arabinofuranosidase, a fim de avaliar uma possível resposta bioquímica à transcrição do gene.

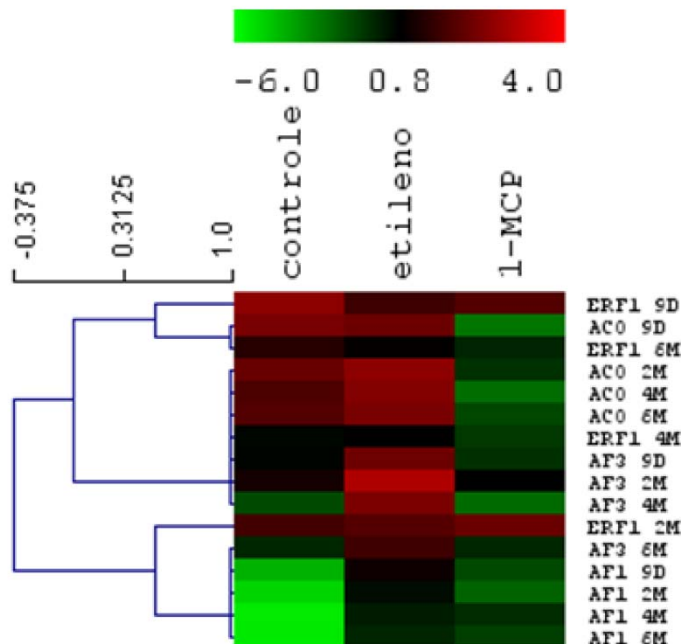


Figura 1 - Agrupamento hierárquico baseado no perfil transcricional de *MdACO*, *MdERF1*, *MdAF3* e *MdAF1* em resposta ao etileno e 1-MCP, em diferentes tempos de armazenamento (9 dias, 2, 4 e 6 meses). O perfil transcricional está representado por escala de cores (*heatmap*), conforme a legenda, onde a cor verde representa os mais baixos acúmulos de transcritos e a cor vermelha os mais altos. Os valores de acúmulo de transcritos estão expressos em log₂.

A transcrição do gene *MdAF1* foi extremamente baixa em frutos controle, o que indica que sua transcrição não tem influência sobre as mudanças na textura de frutos durante o amadurecimento e senescência em maçãs armazenadas sob AR. No presente trabalho, também foi observado que o tratamento com etileno propiciou um aumento considerável nos transcritos *MdAF1* demonstrando que a expressão deste gene é regulada positivamente por etileno. Em relação aos demais genes avaliados, *MdAF1* apresentou um comportamento transcricional único em todos os períodos, apresentando maior similaridade apenas com *MdAF3* em 6 meses sob AR.

O gene *MdERF1*, que codifica uma proteína com um domínio de ligação ao DNA, funcionando como fator de transcrição envolvido em respostas ao etileno (WANG et al 2007), não se mostrou exclusivamente dependente do etileno, já que apresentou alta transcrição nos frutos tratados com 1-MCP, principalmente aos 9 dias em temperatura ambiente e 2 meses sob AR. Esses resultados reforçam a hipótese de que o etileno não é o único regulador transcricional de *MdERF1*.

Porém, aos 4 meses sob AR, o perfil transcricional de *MdERF1* foi semelhante ao de *MdACO*, indicando maior influência do etileno sobre a transcrição deste gene neste período quando o mesmo comportamento foi também observado em *MdAF3*. Ainda assim, não é possível afirmar que a transcrição de *MdERF1* tem relação com o perfil transcricional dos genes codificadores de enzimas de parede celular estudados neste trabalho.

CONCLUSÃO

A transcrição dos genes *MdAF3* e *MdAF1* mostra-se dependente da presença de etileno em todos os períodos avaliados, diferentemente de *MdERF1* que apresenta alto acúmulo de transcritos em frutos tratados com 1-MCP. Houve alta similaridade entre o comportamento transcricional de *MdAF3* e *MdACO*, o que ressalta a influência do etileno sobre o primeiro gene. Com base nestes resultados, pesquisas mais aprofundadas visando esclarecer a função de *MdAF3* na farinosidade de polpa da cultivar “Gala” estão em andamento.

REFERÊNCIAS

- BENNETT, A. B; LABAVITCH, J. M. Ethylene and ripening-regulated expression and function of fruit cell wall modifying proteins. **Plant Science**. v. 175, p. 130-136. 2008.
- BLANKENSHIP, S.M.; DOLE, J.M. 1-Methylcyclopropene: a review. **Postharvest Biology and Technology**. v.28, p.1-25. 2003.
- BRACKMANN, A. Produção de etileno, CO₂ e aroma de cultivares de maçã. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas-BA, v.14, n.1, p.103-108, 1992.
- GOULAO, L.F; SANTOS, J; SOUSA, I; OLIVEIRA, C.M. Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples. **Postharvest Biology and Technology**. v. 43, p. 307-318. 2007.
- GOULAO, L.F; OLIVEIRA, C.M. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. **Trends in Food Science & Technology**. v. 19, p. 4-25. 2008.
- NOBILE, P.M; WATTEBLED, F; QUECINI, V; GIRARDI, C.L; LORMEAU, M; LAURENS, F. Identification of a novel α-L-arabinofuranosidase gene associated with mealiness in apple. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster-UK, 2011.
- ZENG, Y; YANG, T. RNA Isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**. v. 20, p. 417a–417e. 2002.
- WANG, A., TAN, D., TAKAHASHI, A., LI, T.Z., HARADA, T., MdERFs, two ethylene response factors involved in apple fruit ripening **Journal of Experimental Botany**, Lancaster-UK, n,58, p3743–3748. 2007.