

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia  
Agroindustrial



Dissertação

**EXTRAÇÃO DE RNAs E PERFIL  
TRANSCRICIONAL DE ENZIMAS QUE  
PARTICIPAM DA DEGRADAÇÃO DE PAREDE  
CELULAR EM PÊSSEGOS CV. CHIRIPÁ APÓS  
ARMAZENAMENTO**

**Miriane Lucas Azevedo**



Extração de RNAs e perfil transcricional de enzimas que participam da degradação de parede celular em pêssegos cv. Chiripá após armazenamento

**Miriane Lucas Azevedo**

**2008**

Pelotas, 2008

## 1. Introdução geral

O Rio Grande do Sul é um dos maiores produtores de pêssegos do Brasil. Nos pomares do Estado, a cultivar que mais se destaca é a “Chiripá” por produzir frutas de tamanho médio a grande, com cerca de 190g, polpa branca, alto potencial de acúmulo de açúcares, caroço aderente e epiderme com coloração de superfície avermelhada e cor de fundo esverdeada (ROMBALDI et al., 2002).

A crescente expansão do cultivo de pêssegos para consumo *in natura* vem aumentando significativamente a oferta do produto. O “Chiripá” é uma cultivar de maturação tardia, o que a torna bastante apta para o armazenamento, visando ao abastecimento do mercado por um período maior (NAVA & BRACKMANN, 2002). Na maioria das regiões, a colheita desta cultivar é realizada no período de 15 de dezembro a 15 de janeiro (MEDEIROS & RASEIRA, 1998).

O armazenamento refrigerado é o principal método utilizado para conservação de pêssegos, diminuindo o metabolismo e evitando a rápida deterioração. Porém, em armazenamentos mais prolongados, a acentuada perda de firmeza de polpa, a ocorrência de distúrbios fisiológicos e a incidência de podridões são os principais problemas que ocorrem durante a frigoconservação (BRACKMANN et al., 2003).

O armazenamento em atmosfera controlada é muito utilizado comercialmente no Brasil para o armazenamento de maçãs e kiwi. Na Europa e nos EUA, a atmosfera controlada é a técnica mais comumente utilizada no armazenamento de frutas de caroço (BRACKMANN et al., 2003). Porém, em muitos casos, limitações econômicas e falta de reprodutibilidade dos resultados dos tratamentos, são as

principais dificuldades para estabelecer o melhor armazenamento para pêssegos. NAVA & BRACKMANN (2002) citando outros autores em seu trabalho, concluem que a redução dos níveis de O<sub>2</sub> e/ou elevação dos níveis de CO<sub>2</sub> retarda(m) o amadurecimento dos frutos (LANA & FINGER, 2000), diminui(em) o metabolismo de pigmentos, de compostos fenólicos e voláteis (BEAUDRY, 1999), reduz(em) a síntese e a ação do etileno sobre o metabolismo dos frutos e a ocorrência de podridões (BRACKMANN & CHITARRA, 1998). Segundo Lana & Finger (2000), os níveis mínimos de O<sub>2</sub> e máximos de CO<sub>2</sub> são limitados pela sensibilidade dos tecidos à indução de respiração anaeróbica e à injúria por CO<sub>2</sub>, respectivamente.

As substâncias pécticas são os principais componentes químicos dos tecidos responsáveis pelas mudanças de textura das frutas. Essas transformações ocorrem não somente durante o amadurecimento, como também no armazenamento de frutas (CHITARRA & CHITARRA, 1990). A degradação de polissacarídeos pectínicos é uma das principais causas do processo de amaciamento dos frutos. Estão envolvidos na modificação da textura de frutas dois principais processos enzimáticos, cuja ação é devida a poligalacturonase (PG) e a pectinametilesterase (PME) (ANTON et al., 2002). Afora estas, diversos estudos sugerem que a expressão de proteínas e mRNAs para expansina são correlacionadas com o crescimento e/ou desorganização da parede celular em vários tecidos. A relevância das expansinas no amaciamento de frutos está bem demonstrada pelo uso de plantas transgênicas e em estudos com diferentes cultivares da mesma espécie (BRUMMELL et al., 1999; HAYAMA et al., 2003; SALENTIJN et al., 2003; DOTTO et al., 2006).

Com a descoberta de vários genes de vital importância nos processos de maturação do pêssego e de modificações na parede celular durante seu armazenamento, estudos com a intenção de desenvolver conhecimento e tecnologia para o prolongamento de sua oferta ao mercado têm cada vez mais utilizado ferramentas da Biologia Molecular para mostrar o comportamento de enzimas e de proteínas durante os vários estádios do fruto, através da extração de RNAs de alta qualidade, e, a partir destes, estudos moleculares de fisiologia de fruto.

Os objetivos do presente trabalho foram: a) calibrar um método para a extração de RNAs totais com alta qualidade e livre de moléculas contaminantes; b) mostrar o perfil molecular dos mRNAs amplificados pelos oligonucleotídeos referentes as enzimas poligalacturonases (PG), pectinametilesterases (PME) e expansinas (Exp),

que participam da degradação da parede celular em pêssegos “Chiripá” após o armazenamento refrigerado.

Através destes objetivos se pretende testar as hipóteses de que: a) os estudos de expressão de genes em pêssegos estão condicionados à utilização de método adequado de extração de RNAs totais com alta qualidade e livre de contaminações; e, b) é possível obter um perfil de expressão gênica das principais enzimas que participam da degradação da parede celular em pêssego “Chiripá” após o armazenamento refrigerado.

## 2. O Estado da Arte

### 2.1. A planta e o fruto

A família *Rosaceae* inclui frutos de importância alimentar e econômica, dentre os quais a maçã (gênero *Malus*), a pêra (gênero *Pyrus*), a framboesa e a amora (gênero *Rubus*), o morango (gênero *Fragaria*), e outros frutos ditos “de caroço” como o pêssego e (*Prunus persica*), nectarina (*Prunus persica*, var. nectarina), a ameixa (*Prunus domestica*), a cereja (sub-gênero *Cerasus*), a amêndoa (*Prunus dulcis*) e o damasco (*Prunus armeniaca*) (MEISEL et al., 2005).

O pêssego é um típico fruto climatérico, que exhibe um aumento drástico na produção de etileno e na taxa de respiração, associados com mudanças na textura e *flavor* durante a maturação (LIU et al., 2005).

O climatérico pode ser compreendido como um período na ontogenia de certas frutas, durante o qual uma série de mudanças bioquímicas, que são geralmente iniciadas devido à produção autocatalítica de etileno, define a transição entre o desenvolvimento e a senescência e envolve um aumento na respiração, conduzindo ao amadurecimento. Acredita-se que o climatérico seja uma resposta auto-reguladora da mitocôndria, numa tentativa de compensar e reparar decomposições celulares, atribuindo ao aumento do metabolismo respiratório uma forma da fruta continuar o processo de maturação e, ao mesmo tempo, manter a integridade celular. Desde que colhidas no seu estágio ideal, as frutas climatéricas são capazes de completar o seu amadurecimento quando destacadas da planta (KLUGE et al., 2002).

O fruto amolece rapidamente após a colheita, levando à perdas na cadeia de comercialização por danos mecânicos e pelo excesso de maturação (LIGUORI et al., 2004). Pêssegos são frutos perecíveis que amadurecem e senescem rapidamente à temperatura ambiente e que requerem um cuidadoso e rápido manuseio após a colheita para evitar sérias perdas (LIU et al., 2005).

## 2.2. Etileno

Segundo Liguori et al. (2004) o etileno ( $C_2H_4$ ) é um fitormônio considerado indutor de maturação e senescência. Mas, em verdade, o etileno atua em fases diversas, como no crescimento, no desenvolvimento e na senescência e, principalmente, no amadurecimento das frutas climatéricas. Tem como precursor primário o aminoácido metionina, como intermediário S-adenosilmetionina (SAM) e como precursor imediato o ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) (BRADFORD & YANG, 1980).

Nos frutos climatéricos como maçãs, bananas, pêssegos, nectarinas, ameixas e tomates, observa-se um pico na taxa respiratória, que antecede ou sucede um drástico incremento na síntese de etileno (YANG & HOFFMAN, 1984; KENDE, 1993; LELIÈVRE et al., 1997). A produção de etileno é reduzida na fase pré-climatérica, elevando-se até o máximo no climatérico para posteriormente declinar. Normalmente, a aplicação exógena do etileno nestas frutas antecipa uma única vez o pico climatérico quando aplicado na fase pré-climatérica. Em fases posteriores, a aplicação de etileno produz pouco efeito (KLUGE et al., 2002).

O envolvimento do etileno no processo de amadurecimento tem sido comprovado pelo estudo de plantas transformadas, nas quais a inibição da síntese de etileno reduz ou inibe o amadurecimento (PICTON et al., 1993; AYUB et al., 1996; SILVA et al., 2004). Em tempo, o amaciamento dos frutos é particularmente controlado pelo etileno, a aplicação exógena do etileno ou propileno causa um amaciamento mais rápido do fruto (ABDI et al., 1997). Além disso, plantas com mutações, que comprometem a síntese normal de etileno, apresentam padrões anormais de amadurecimento (STEPANOVA & ECKER, 2000). Apesar do efeito evidente do etileno na regulação da maturação de frutos climatéricos, acredita-se

que mecanismos reguladores moleculares dependentes e independentes de etileno coexistam nesses frutos (LELIÈVRE et al., 1997; ALEXANDER & GRIERSON, 2002), o que torna esse processo, como um todo, ainda mais complexo.

### **2.2.1. Inibidores da ação do etileno**

O etileno é conhecido por desencadear muitos, embora não todos, os aspectos do amadurecimento de frutos (LELIÈVRE et al., 1997). Os diversos efeitos provocados pelo etileno nos tecidos vegetais podem ser controlados por meio da regulação da sua síntese ou da sua ação (FENG et al., 2000). Dessa forma, o uso de inibidores da ação do etileno tem se tornado uma alternativa interessante, pois são compostos que protegem os frutos da ação do etileno, tanto endógeno, quanto do exógeno.

Neste contexto, um composto vem sendo muito estudado: o 1-metilciclopropeno (1-MCP), o qual inibe a maturação por ocupar irreversivelmente os sítios de ligação do etileno, assim o etileno é incapaz de ligar-se e suprimir subseqüentes transcrição e tradução dos sinais (SEREK et al., 1994; LIU et al., 2005). A afinidade do 1-MCP aos receptores de etileno supera a do próprio etileno em cerca de 10 vezes (BLANKENSHIP & DOLE, 2003), porém, a longevidade da ação do 1-MCP é dependente da espécie, cultivar, tecido e modo de indução da produção de etileno (SISLER & SEREK, 1997). O 1-MCP possui um modo de ação não-tóxico e é ativo mesmo em baixas concentrações (SISLER & SEREK, 1997).

O amadurecimento pode ser iniciado pela evolução natural do etileno endógeno ou pela aplicação exógena comercial de etileno (LIU et al., 2005). A ação inibidora do etileno pelo 1-MCP foi constatada por atrasar o amadurecimento e melhorar a qualidade pós-colheita dos frutos climatérios (ABDI et al., 1998; FAN et al., 1999; LIGUORI et al., 2004). Fan et al. (2002) constataram que o 1-MCP atrasa o amolecimento de pêssegos, porém, também foi verificado que este tratamento pode afetar negativamente a qualidade da polpa.

### **2.3. Armazenamento**

As perdas na qualidade pós-colheita de pêssegos armazenados são causadas predominantemente por alterações metabólicas, danos mecânicos, redução da firmeza da polpa, distúrbios fisiológicos e outros processos deteriorativos. Essas perdas são influenciadas por características varietais, etapa de amadurecimento na colheita, manuseio, colheita e condições de armazenamento e pelo sistema de armazenamento (LILL et al., 1989; LELIÈVRE et al., 1997; CRISOSTO et al., 1999; ROMBALDI et al., 2002). Na tentativa de reduzir essas perdas, pesquisas têm procurado novos genótipos e têm examinado as condições pré-colheita, procedimentos de colheita, frio, armazenamento em atmosfera controlada e a utilização de sistemas que controlam a produção e/ou a ação de etileno (ZHOU et al., 2000b; DONG et al., 2001; GIRARDI et al., 2005).

### **2.3.1. Armazenamento refrigerado (AR)**

A deterioração é um importante fator que limita a duração de pêssego após a colheita e resulta em apreciáveis perdas no comércio atacadista, varejista e em nível de consumidor (LIU et al., 2005). Em razão disto, o armazenamento desses frutos em baixas temperaturas tem sido utilizado, tanto para reduzir o metabolismo, quanto para restringir o desenvolvimento de podridões (LURIE & CRISOSTO, 2005). O armazenamento de pêssegos “Chiripá” é bastante comum, pois essa é a última cultivar de mesa a ser colhida, tornando seu armazenamento interessante do ponto de vista econômico. Grande parte do pêssego produzido no Brasil é armazenada, somente sob refrigeração, e, nesse sistema, são controladas apenas a temperatura e a umidade relativa do ar.

A velocidade dos processos metabólicos é muito dependente da temperatura, logo, a redução da temperatura do ar pode ser usada para ampliar o período de conservação de frutos, especialmente por reduzir a respiração celular (STEFFENS et al., 2006). No caso de pêssegos, o amadurecimento é extremamente reduzido a 1°C, enquanto a 5°C esse processo continua (VALERO et al., 1997). Nesse intuito, a temperatura mais adequada, para o armazenamento de pêssegos, inclusive da cultivar Chiripá, tem sido apontada como -0,5°C (NAVA & BRACKMANN, 2002). Porém, o armazenamento de pêssegos a baixas temperaturas por período

prolongado pode induzir a formação de injúrias pelo frio (*chilling injury*), especialmente as chamadas de lanosidade (*mealiness/wolliness*), caracterizadas por uma falta de suculência e textura farinhenta (LILL et al., 1989). Nos estágios mais avançados, a polpa também apresenta separação dos tecidos e evidente descoloração, assim como escurecimento (BRUMMELL et al., 2004).

### **2.3.2. Atmosfera controlada (AC)**

Afora o uso de refrigeração, também têm-se tornado relevantes os estudos dos efeitos da modificação das pressões parciais de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, como uma maneira de incrementar o efeito preservativo do frio na qualidade dos frutos, prolongando seu armazenamento. Essas condições de armazenamento reduzem a biossíntese e a ação do etileno e o metabolismo respiratório (KERBEL et al., 1988; LIU et al., 2004).

Apesar do sucesso da preservação de pêssegos “Chiripá” sob condições de AC, este sistema ainda não é amplamente utilizado para produção comercial de pêssegos no Brasil, devido às dificuldades operacionais e limitações econômicas (GIRARDI et al., 2005).

#### **2.3.2.1. Efeito sobre a ação do etileno**

Níveis elevados de CO<sub>2</sub> (5-20%) inibem a produção de etileno em frutos climatéricos, devido à inibição da atividade da ACC sintase e da ACC oxidase (DE WILD et al., 1999; MATHOOKO et al., 2001; DE WILD et al., 2005). Uma das hipóteses em relação ao efeito inibitório do CO<sub>2</sub> sobre vários processos dependentes de etileno considerava que esse gás competia pelo sítio de ligação do etileno, inibindo sua biossíntese e ação (BURG & BURG, 1967). No entanto, recentemente novos estudos têm demonstrado que o local de ação do CO<sub>2</sub>, na via de biossíntese de etileno, situa-se antes da transformação de ACC em etileno (DE WILD et al., 1999; MATHOOKO et al., 2001; DE WILD et al., 2005). Afora isso, esses mesmos estudos indicam que o CO<sub>2</sub> não afeta a ligação do etileno aos seus receptores, como postulado anteriormente. De acordo com Nakajima et al. (1990), o CO<sub>2</sub> inibe a

atividade da ACC sintase por meio de inibição transcricional. Em pêsegos, foi demonstrada uma inibição da atividade da ACC sintase pelo CO<sub>2</sub> (MATHOOKO et al., 2001).

Além dos efeitos do CO<sub>2</sub> sobre a rota de síntese de etileno, a exposição de frutos e vegetais frescos a níveis de O<sub>2</sub> inferiores a 8% reduzem significativamente a biossíntese de etileno (KADER, 1986). Devido ao O<sub>2</sub> ser substrato na reação catalisada pela ACC oxidase, sob condições de anaerobiose a conversão de ACC a etileno pode ser completamente inibida (KENDE, 1993). O armazenamento de maçãs sob 0,25% de O<sub>2</sub> reduziu a atividade da ACC oxidase e a síntese de ACC sintase, bem como, o armazenamento de maçãs em 0,25% de O<sub>2</sub> foi mais eficiente em reduzir a biossíntese de etileno do que o armazenamento em ar + 20% de CO<sub>2</sub> (GORNÝ & KADER, 1996).

### **2.3.2.2. Efeito sobre a atividade respiratória**

De acordo com Ke et al. (1993), um pequeno estresse por baixo O<sub>2</sub> e/ou elevado CO<sub>2</sub> não induz metabolismo fermentativo. Nestas condições, a taxa de respiração e o consumo de reservas são reduzidos, mantendo a qualidade dos produtos, além de prolongar o período de armazenamento. O CO<sub>2</sub> pode atuar, tanto como um indutor, quanto um supressor da respiração durante e após o armazenamento, dependendo da sua concentração, da concentração de O<sub>2</sub>, da espécie e da temperatura (KADER, 1986). Todavia, é difícil discriminar exatamente quais eventos são afetados pelas altas concentrações de CO<sub>2</sub> e quais pelos baixos níveis de O<sub>2</sub> (MATHOOKO, 1996).

Segundo Liu et al. (2004), o CO<sub>2</sub> inibe a atividade da isocitrato desidrogenase (IDH), enzima que catalisa a conversão de isocitrato à 2-oxoglutarato. Afora isso, outras enzimas desta rota podem ser inibidas, porém em menor extensão. Da mesma maneira, a exposição de frutos à elevados níveis de CO<sub>2</sub> poderia resultar na inibição de determinadas enzimas da via glicolítica. Corroborando estes estudos, foi observada uma redução significativa na respiração de peras expostas ao alto CO<sub>2</sub> devido à inibição da síntese e/ou da atividade das fosfofrutoquinases ATP-

dependentes (PFK) e das fosfofrutoquinases PPI-dependentes (PFP) (KERBEL et al., 1988).

#### **2.4. Parede Celular**

A parede celular é uma estrutura essencial para muitos processos no crescimento, desenvolvimento, manutenção e reprodução da planta. A diversidade de funções da parede celular vegetal exige uma estrutura diversa e complexa. As paredes celulares possuem uma arquitetura variada composta basicamente por parede primária, parede secundária, lamela média e plasmodesmas. A parede primária é composta de microfibrilas de celulose inseridas em uma matriz de polissacarídeos altamente hidratada. A matriz consiste em dois grupos principais de polissacarídeos, em geral chamados de hemiceluloses e pectina, mais uma quantidade de proteínas estruturais (TAIZ & ZEIGER, 2004).

As pectinas formam uma fase gel hidratada na qual está implantada a rede celulose-hemicelulose. Elas atuam como preenchimento hidrofílico, impedindo a agregação e o colapso da rede de celulose (TAIZ & ZEIGER, 2004), e também formam uma rede, mantida por ligações éster entre as moléculas de pectina e por interligações mediadas por  $\text{Ca}^{2+}$  entre homogalacturonanos desmetilesterificados (BRUMMELL & HARPSTER, 2001). A estrutura, como um todo, é unida por ligações covalentes entre algumas moléculas de xiloglucano e pectinas (THOMPSON & FRY, 2000). Moléculas de pectina executam várias funções, incluindo a determinação da porosidade da parede celular, o fornecimento da carga das superfícies que modulam a parede celular através do pH e do equilíbrio iônico, bem como a regulação da adesão celular na lamela média (CARPITA & MCCANN, 2000). O elevado grau de complexidade estrutural e heterogeneidade da matriz péctica são produzidos tanto durante a biossíntese do sistema endomembranar, bem como é resultado da ação de um leque de enzimas de modificação péctica na base da parede celular (WILLATS et al., 2001; MANGANARIS et al., 2005).

As paredes celulares dos frutos carnosos são ricas em pectinas, que podem constituir mais de 50% da composição das paredes, com variações consideráveis entre as espécies (BRUMMELL & HARPSTER, 2001). As pectinas compreendem um grupo de heteropolissacarídeos ácidos com domínios estruturais distintos, sendo

sujeitas à ação de proteínas de biossíntese e de enzimas modificadoras da parede celular (WILLATS et al., 2001). As pectinas são ricas em ácido galacturônico, o qual participa da formação da estrutura fundamental dos três principais polissacarídeos pécticos: o homogalacturonano ou ácido poligalacturônico (HGA), o ramnogalacturonano-I (RG-I) e o ramnogalacturonano-II (RG-II). O homogalacturonano é um homopolímero linear, contendo de 100 a 200 resíduos de ácido galacturônico com ligações  $\alpha$  1→4 (ZHAN et al., 1998). Ele é sintetizado no complexo de Golgi e transportado às paredes celulares numa forma altamente metilesterificada (70-80%) nas carboxilas C-6 (PERRIN et al., 2001). Uma vez que a pectina é secretada para a parede, os grupos éster podem ser removidos por pectinas estearases encontradas na parede (TAIZ & ZEIGER, 2004).

#### **2.4.1. Alterações na parede celular dos frutos durante o amadurecimento**

A parede da célula vegetal é uma estrutura dinâmica, que apresenta muitas mudanças durante a diferenciação e desenvolvimento dos diferentes órgãos e tecidos. O amolecimento, que ocorre durante a maturação dos frutos carnosos, tem sido amplamente associado à degradação dos diferentes componentes da parede celular (BRUMMELL & HARPESTER, 2001; VILLARREAL et al., 2007). A degradação da protopectina na lamela média e da parede celular primária, o aumento da pectina solúvel e a perda de açúcares neutros não celulósicos, relatados durante o amadurecimento dos frutos, têm sido sugerido como causas principais da perda de textura (ANTUNES et al., 2006).

Vários fatores do amadurecimento relacionados com modificações da parede celular, como a solubilização ou despolimerização de pectina ou outros componentes da parede celular, são observados em alguns frutos. No entanto, a extensão e o momento dessas modificações variam (BRUMMELL, 2006). Como a maior parte das desorganizações ou das modificações dos polissacarídeos da parede celular durante a maturação é devido às ações de um leque de enzimas modificadoras da parede celular, as atividades destas enzimas também diferem muito entre espécies (ORR & BRADY, 1993). Em pêssego, a atividade de várias enzimas apresenta um aumento durante o amaciamento, conforme já demonstrado por alguns autores: exo-poligalacturonase (exo-PG, EC 3.2.1.67), endo-poligalacturonase (endo-PG, EC 3.2.1.15), endo-1,4-manase (EC 3.2.1.78),  $\alpha$ -L-

arabnofuranosidase (ARF, EC 3.2.1.55) e  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23) (PRESSEY & AVANTS, 1973; BRUMMEL et al., 2004; HAYAMA et al., 2006).

Algumas alterações na parede celular, relacionadas ao amadurecimento de frutos, são comuns a várias espécies, como a despolimerização dos glicanos da matriz (BRUMMELL et al., 2004). As pectinas são gradativamente despolimerizadas e solubilizadas durante o amadurecimento (FISCHER & BENNETT, 1991; BRUMMELL & HARPSTER, 2001; BRUMMELL et al., 2004). Entretanto, nem todos os poliuronídeos tornam-se solúveis, pois, mesmo que sejam despolimerizados, muitos permanecem associados por meio de ligações iônicas a outras moléculas de pectinas insolúveis.

Em pêssegos, o início do processo de redução da firmeza da polpa é acompanhado pelo incremento no conteúdo de pectinas frouxamente ligadas por ligações iônicas (extraídas por quelante), mas sem a ocorrência de extensiva despolimerização (BRUMMELL et al., 2004). No entanto, no período subsequente de redução drástica de firmeza (estádio fundente), ocorre uma elevada despolimerização e solubilização dessas pectinas. Esse processo é acompanhado por uma redução gradual no nível de metilesterificação das pectinas. Além dos processos de degradação da parede celular serem acompanhados pela modificação da atividade de várias enzimas hidrolíticas (BRUMMELL et al., 2004), ocorre, também, síntese limitada de polissacarídeos e uma elevada atividade de síntese de proteínas estruturais, que possivelmente auxiliam na manutenção da integridade das paredes celulares durante o processo de amolecimento (TRAINOTTI et al., 2003).

## **2.4.2. Enzimas mediadoras da hidrólise e da degradação da parede celular**

### **2.4.2.1. Poligalacturonase (PG)**

A PG é a enzima mais abundante e mais extensivamente estudada das enzimas de degradação das pectinas (HADFIELD & BENNETT, 1998). Poligalacturonases (PGs, poli(1 $\rightarrow$ 4- $\alpha$ -D-galactorunídeo)glicanohidrolase) são enzimas encontradas na maioria dos frutos, que catalisam a hidrólise das ligações  $\beta$  1,4 entre resíduos de ácido galacturônico no interior da cadeia de pectina. Esta enzima é classificada em dois grupos com base na sua ação sobre o substrato: uma, com típico rompimento aleatório das ligações glicosídicas, chamadas *endo*-PG, e outra, com rompimento no terminal não-redutor, que remove somente uma unidade

de ácido galacturônico, *exo*-PG (EVANGELISTA et al., 2000; BRUMMELL & HARPSTER, 2001; ANTUNES et al., 2006).

Os substratos para PG na parede celular são principalmente as homogalacturonas, que são secretadas na parede celular altamente metilesterificados e devem ser desesterificadas antes de poderem tornar-se um substrato para PG (JAVIS, 1984; CARPITA & GIBEAUT, 1993; BRUMMELL & HARPSTER, 2001). Por isto a atuação da PME desmetilando as pectinas se faz necessária, vez que a PG se torna incapaz de atuar na presença de grupos metílicos (ANTUNES et al., 2006).

Na maioria dos frutos, a atividade da PG aumenta durante o amadurecimento concomitantemente com um aumento na maciez do fruto e a solubilização de poliuronídeos da parede (HOBSON, 1981; KNEE & BARTHEY, 1981; HUBER, 1993; BICALHO et al., 2000; ANTUNES et al., 2006). Porém, enzimas de degradação da parede celular responsáveis pelo amaciamento de frutos não são as mesmas de uma espécie para outra. No amadurecimento, abacate, tomate e pêssigo possuem relativamente altos níveis de atividade da poligalacturonase nos frutos, enquanto esta tem sido relatada estar ausente em outras espécies como morango, maçã e melão (BRUMMELL & HARSPTER, 2001).

Pêssegos das variedades que perdem rapidamente firmeza da polpa, durante o amadurecimento (polpa fundente), apresentam, além da atividade das *exo*-PGs, um aumento drástico na atividade das *endo*-PGs. Entretanto, em pêssegos com caroço preso e que não apresentam essa redução acentuada da firmeza da polpa (polpa não fundente) é detectada somente a atividade da *exo*-PG (PRESSEY & AVANTS, 1978), o que se pretende, explica parcialmente a redução mais limitada da firmeza da polpa de pêssegos com o caroço preso à polpa.

As PGs são expressas a partir de grandes famílias multigênicas, porém, durante o amadurecimento, apenas poucos genes são expressos nos frutos (DELLA PENNA et al., 1986). O etileno está envolvido com a regulação desse processo em vários frutos (SITRIT & BENNETT, 1998; ZANUZO, 2004).

#### **2.4.2.2. Pectinametilesterase (PME)**

Poligalacturonas são secretadas da parede celular em formas altamente metilesterificadas e são desesterificadas durante o desenvolvimento da célula. Isto é cumprido pela pectinametilesterase (PME, EC 3.1.1.11), que desesterifica os

poliuronídeos pela remoção dos grupos metilésteres da posição C-6 dos resíduos de ácido galacturônico das pectinas de alto peso molecular, formando pectinas com menor grau de metilação e metanol. A desmetilação da pectina, com a perda dos grupos carboxílicos, altera o pH e carrega a parede celular, permitindo a ligação do cálcio numa estrutura gel agregada de poliuronídeos, tornando os poliuronídeos sensíveis à degradação pela PG (PRESSEY & AVANTS, 1982; JARVIS, 1984; KOCH & NEVINS, 1989; FISCHER & BENNETT, 1991; CARPITA & GIBEAUT, 1993; BRUMMELL & HARPSTER, 2001). A atividade da PME deve preceder a atividade da PG, no sentido de facilitar a atividade desta última, pela desmetilação dos poliuronídeos. Assim, a PG teria maior afinidade pelo substrato linear, desmetilando, após a atuação da PME (ANTHON et al., 2000; ANTUNES et al., 2006).

PME é a enzima chave no controle da organização e desorganização das redes de pectina (WILLATS et al., 2001), determinando a integridade dos tecidos durante a senescência dos frutos, talvez, por regular as ligações dos cátions com a parede celular (MANGANARIS et al., 2005).

A atividade das PMEs é detectada durante todas as fases do desenvolvimento dos frutos, sendo que picos de atividade são observados quando os frutos são ainda pequenos e imaturos e logo no início do processo de amadurecimento (HARRIMAN et al., 1991). No entanto, esses picos são alcançados após um declínio considerável na acumulação de mRNAs para PME.

Não se sabe quais fatores controlam a expressão do gene da PME no desenvolvimento do fruto (BRUMMELL & HARPSTER, 2001), pois, aparentemente, o etileno não participa deste processo (ALEXANDER & GRIERSON, 2002).

A atividade da PME, portanto, desempenha papel pequeno no amolecimento dos frutos durante o amadurecimento, mas afeta substancialmente a integridade dos tecidos durante a senescência e na transformação característica dos frutos (BRUMMELL & HARPSTER, 2001).

#### **2.4.2.3. Expansinas (Exp)**

Nem todas as enzimas modificadoras da parede celular agem por clivagem da ligação covalente glicosídica ou ligações éster. As expansinas são proteínas que estão localizadas na parede celular, que foram inicialmente identificadas pela sua capacidade de causar afrouxamento da parede celular nos ensaios *in vitro* (MCQUEEN-MASSON et al., 1992; BRUMMELL & HARPSTER, 2001).

Desde que a expansina tem sido postulada a estar envolvida no controle da despolimerização dos poliuronídeos (BRUMMELL et al., 1999), compreende-se possível que uma inibição do acúmulo de expansinas na fruta possa influenciar a desordem da expressão, limitando a capacidade da PG para degradar pectina (OBERLAND et al., 2003).

Essas proteínas têm sido detectadas em vários frutos, como tomates (ROSE et al., 1997), morangos (CIVELLO et al., 1999; DOTTO et al., 2006) e pêssegos (HAYAMA et al., 2003). Em tomates, o amolecimento parece estar envolvido com a atividade de expansinas relacionadas com o amadurecimento, pois, redução ou incremento da quantidade de expansinas no início da maturação diminui ou aumenta, respectivamente, o amolecimento dos frutos (BRUMMELL et al., 1999; BRUMMELL et al., 2004; VILLARREAL et al., 2007). Três genes, que codificam para expansinas em pêssegos, são expressos especificamente nos frutos. Destes, *PpExp2* possivelmente exerça um papel no processo de expansão dos frutos, enquanto *PpExp1* e *PpExp3* são expressos especialmente durante o amadurecimento (HAYAMA et al., 2003).

Hayama et al. (2003) em seu trabalho, indicam que enzimas hidrolíticas, como as PGs, podem atuar cooperativamente com as expansinas, reduzindo a firmeza da polpa dos frutos. A expressão das expansinas relacionadas ao amadurecimento de frutos é regulada pelo etileno (ROSE et al., 1997; OBERLAND et al., 2003).

## **2.5. Análise da expressão gênica através da técnica de RT-PCR**

A identificação de genes relacionados à degradação da parede celular em frutos que estão intimamente relacionados com o amaciamento, perdas no período de pós-colheita e com a diminuição do período de oferta ao mercado consumidor, é de vital importância, no sentido de elucidar os mecanismos que estão envolvidos nestes processos. Para isso, se tem lançado mão das ferramentas da Biologia Molecular, para tentar identificar a presença destes genes e seu padrão de expressão, especialmente através da análise de seus mRNAs.

Dentre as técnicas de caracterização e/ou quantificação da transcrição gênica, a técnica de RT-PCR destaca-se pela alta sensibilidade, o que possibilita o estudo de genes com baixas taxas de expressão e a utilização de pequenas quantidades de amostra. A técnica de RT-PCR consiste na conjugação das técnicas

de síntese de cDNA (uso da enzima transcriptase reversa) e de PCR (uso da enzima *Taq* DNA polimerase). Também se destaca pela praticidade, já que permite obter resultados com extrações de RNAs totais, executáveis em tempo curto, quando comparada com outras metodologias. A técnica dispensa o uso de sondas radioativas para a visualização dos resultados.

Porém, para o sucesso desta técnica é indispensável que se tenha extratos de RNAs de boa qualidade. A habilidade em isolar RNAs de boa qualidade, livre de proteínas, de DNA genômico e de contaminações por metabólitos secundários é crucial para a construção de bibliotecas de cDNA e outras análises moleculares, dentre elas, reações de transcriptase reversa – reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (LIU et al., 1998).

## Capítulo I

### 1. Adaptação de método para extração de RNA total em Pêssego

#### 1.1. Introdução

O pêssego é um típico fruto climatérico que exhibe um aumento drástico na produção de etileno e da taxa de respiração, associadas a mudanças na textura e no flavor durante a maturação (LIU et al., 2005), dois dos mais importantes atributos comerciais dos frutos. Associado a estes atributos, o pêssego é um interessante modelo no estudo de biologia molecular devido a suas características fisiológicas e bioquímicas. Segundo Meisel et al. (2005), o pêssego se destaca como modelo genômico por ter uma polinização própria, um genoma pequeno - de aproximadamente 300Mb (aproximadamente apenas o dobro do tamanho do genoma de *Arabidopsis*) e um relativo curto estágio de produção.

Com a identificação e caracterização de vários genes de importância envolvidos nos processos de maturação do pêssego, os pesquisadores vêm enfrentando um grande desafio em obter extratos de RNAs de alta qualidade e em quantidade suficiente, fator limitante nos experimentos que envolvem estudos de expressão gênica em nível molecular. A habilidade de isolar RNA de boa qualidade, livre de proteínas, de DNA genômico e de contaminações por metabólitos secundários é fator preponderante para a construção de bibliotecas de cDNA, análises moleculares através, por exemplo, de *RT-PCR* (*reverse transcriptase – polymerase chain reaction* - transcriptase reversa – reação em cadeia da polimerase) (LIU et al., 1998).

O estudo da expressão gênica em plantas frutíferas pode ser tecnicamente difícil devido a grande quantidade de polissacarídeos, de polifenóis e de outros

metabólitos secundários que se acumulam durante o amadurecimento do fruto e/ou em resposta a estímulos do ambiente (MEISEL et al., 2005). Estes compostos possuem tendência a co-precipitarem com RNAs devido a propriedades físico-químicas similares, afetando a qualidade e a quantidade das amostras (ASIF et al., 2000). Além disso, as ribonucleases (RNases) endógenas reduzem drasticamente a integridade do RNA, particularmente quando sua quantidade é aumentada, tal como ocorre na senescência, em razão de injúrias e por ataque de patógenos (AZEVEDO et al., 2003).

A extração de RNAs requer o rompimento das células, fazendo com que material compartimentalizado extravase das organelas citoplasmáticas, ação que irreversivelmente permite a reação destes compostos com ácido nucléicos, ao tempo em que polissacarídeos e polifenóis podem interagir com os ácidos nucléicos formando complexos insolúveis (LIU et al., 1998), restringindo a qualidade final da extração.

Pêssegos são frutos que possuem alto conteúdo de polissacarídeos e de polifenóis, bem como RNases endógenas. Os compostos fenólicos são rapidamente oxidados e, a partir de ligações covalentes, formam quinonas que se ligam facilmente aos ácidos nucléicos (LOOMIS, 1974). Além dos compostos fenólicos e de outros metabólitos secundários, a contaminação por polissacarídeos impede a ressuspensão do RNA precipitado, interfere na quantificação baseada em absorvância, inibe reações enzimáticas, inibe a RNA poli (A)<sup>+</sup> e interfere na migração eletroforética (WILKINS & SMART, 1996), fatores que dificultam uma boa extração de RNAs e manipulações subseqüentes. Pêssegos, assim como nectarinas, possuem elevado conteúdo de pectinas solúveis que formam géis no decorrer da maturação e senescência (BRUMMEL et al., 2004,). Estes géis, uma vez formados, podem encapsular algumas moléculas como proteínas e ácidos nucléicos, o que também reduz a qualidade das extrações de RNA.

Faz-se, portanto, necessário o desenvolvimento e/ou a adaptação de um método de extração de RNAs para este tipo de fruto. Neste trabalho, foram avaliados quatro diferentes métodos de extração de RNA total de frutos de pêssego, cv. Chiripá: o primeiro método foi o do reagente *Trizol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen)*, o segundo foi o método descrito por Chang et al. (1993), o terceiro, o método descrito por Meisel et al. (2005) e o quarto, o do reagente *Concert<sup>™</sup> Plant RNA Reagent (Invitrogen)*.

## 1.2. Material e métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos (Biotecnal) - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA) da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” (FAEM), Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

### 1.2.1. Material vegetal

Foram utilizados pêssegos (*Prunus persica* L.), cv. Chiripá, em estágio de maturação comercial, provenientes do mercado local. Destes frutos foi retirada polpa com auxílio de um bisturi estéril, que foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e armazenada à temperatura de -86°C até o momento das extrações.

### 1.2.2. Avaliações

As variáveis estudadas foram a pureza e a integridade dos RNAs extraídos pelos quatro diferentes métodos, por intermédio de leitura espectrofotométrica e eletroforese em gel de agarose. Como controle foram utilizados extratos da fração 18S, gene ribossomal constitutivo.

#### 1.2.2.1. Extrações de RNAs totais

##### A. Método *Trizol*<sup>®</sup> *Reagent* (*Invitrogen*<sup>®</sup>)

Para cada extração de RNAs, foram pesados 100 mg de amostra (polpa de pêssego), previamente macerada em nitrogênio líquido com auxílio de gral e pistilo, em microtubo estéril tipo *Eppendorf*<sup>®</sup> de 1,5 mL. Após foram adicionados 800 µL de *Trizol*<sup>®</sup> *Reagent* (*Invitrogen*<sup>®</sup>), à temperatura de 4°C, misturando-se brevemente em aparelho vórtex até ressuspensão completa da amostra. O material foi incubado nos

microtubos, à temperatura ambiente, por cinco minutos. A seguir, foram adicionados 140 µL de clorofórmio, homogeneizando-se por inversão. Os microtubos foram mantidos à temperatura ambiente por três minutos. Transcorrido esse tempo, os microtubos foram centrifugados a 4°C por treze minutos a 12000 x g. Após o sobrenadante (fase aquosa - aproximadamente 400 µL) foi transferido para novo microtubo estéril. Foram adicionados, então, 400 µL de isopropanol gelado e mantidos os microtubos durante dez minutos a temperatura ambiente. Os microtubos foram centrifugados à 4°C, durante dez minutos, a 12000 x g. Após, foi descartado o sobrenadante cuidadosamente, e o pellet foi ressuspenso com 800 µL de etanol 75% (mesmo volume de *Trizol*<sup>®</sup> utilizado anteriormente). Novamente os tubos foram centrifugados à 4°C, durante cinco minutos, a 7500 x g. O sobrenadante foi eliminado e os microtubos foram mantidos a 35°C, em capela, durante cinco minutos. Ao *pellet* final foram adicionados 30 µL de *RNase free water treated with DEPC (Invitrogen*<sup>®</sup>) para dissolver os RNAs.

#### **B. Método de extração de RNAs com cloreto de lítio – adaptado de Chang et al. (1993)**

Para cada extração, foram pesados, em microtubo estéril tipo *Eppendorf*<sup>®</sup> de 1,5 mL, 250 mg de amostra (polpa de pêsego) gelada, previamente macerada em nitrogênio líquido com auxílio de gral e pistilo. Logo após, foram adicionados 500 µL de tampão CTAB (2% CTAB; 2% PVP; EDTA a 25 mM; NaCl a 2M; Tris-HCl – pH 8,0 a 100 mM; 0,2% β-mercaptoetanol), pré-aquecido a 65°C em banho-maria. Os microtubos foram mantidos em banho-maria a 65°C durante trinta minutos, efetuando-se agitações a cada dez minutos. A seguir, foi adicionado a cada microtubo um (1) volume (500 µL) de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), mantendo-se sob agitação, à temperatura ambiente por dez minutos. A seguir, foi realizada centrifugação durante dez minutos a 8000 x g. O sobrenadante foi então transferido para novo microtubo estéril, ao qual foram adicionados 400 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Seguiu-se agitação por dois minutos por inversão e centrifugação durante dez minutos a 8000 x g. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo estéril e foi adicionado LiCl (10M) na razão de ¼ do volume. O material foi deixado *overnight* à 4°C. No dia seguinte, os microtubos foram centrifugados à 4°C durante quarenta e cinco minutos a 8000 x g. Após, o sobrenadante foi descartado por inversão uma única vez dos microtubos e com cuidado, pois o *pellet* é muito

gelatinoso e pode se desprender com facilidade. Os microtubos foram lavados duas vezes por dez minutos com etanol 70% (300  $\mu$ L) e centrifugados após cada lavagem a 4°C, durante dez minutos, a 8000 x g. O sobrenadante foi descartado e os microtubos mantidos invertidos sobre folha de papel absorvente por trinta minutos. O *pellet* resultante foi dissolvido em 30  $\mu$ L de *RNase free water treated with DEPC* (*Invitrogen*<sup>®</sup>).

### **C. Método para extração de RNA em pêssigo – adaptado de Meisel et al. (2005)**

Este protocolo é uma modificação do protocolo descrito anteriormente (CHANG et al., 1993), idealizado para otimizar a extração de RNAs em pêssigos, considerando-se possuírem alto teor de polissacarídeos e de compostos fenólicos. Para cada extração de RNAs foram pesados, em microtubo estéril tipo *Eppendorf*<sup>®</sup> de 2,0 mL, 400 mg de amostra (polpa de pêssigo) gelada, previamente macerada em nitrogênio líquido com auxílio de gral e pistilo. Logo, foram adicionados 700  $\mu$ L de tampão de extração (2% CTAB; 2% PVP – 30; Tris-HCl – pH 8,0 a 100 mM; EDTA a 25 mM; NaCl a 2M; 0,05% *spermidine trihydrochloride*; 2%  $\beta$ -mercaptoetanol – adicionado somente antes do uso), pré-aquecido em banho-maria a 65°C. As amostras foram mantidas em banho-maria durante quinze minutos a 65°C, misturando-se com aparelho vórtex três vezes, a cada cinco minutos, durante a incubação. Transcorrido este período, foi adicionado igual volume (700  $\mu$ L) de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e homogeneizado vigorosamente com auxílio de aparelho vórtex. Após, foi realizada centrifugação durante vinte minutos a 12000 x g (separação de fases). Logo a seguir, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo estéril. Uma re-extração desta amostra foi realizada, adicionando-se igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) ao microtubo. Após, foi realizada nova centrifugação durante vinte minutos a 12000 x g. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo estéril, evitando-se a interfase. Se, por ventura, não há boa separação, recomenda o método centrifugar novamente. Ao volume de sobrenadante, foi adicionado 0,25 volume de LiCl 10M. Após homogeneização por inversão dos microtubos, estes foram incubados a 4°C *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 4°C, durante trinta e cinco minutos, a 12000 x g. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 500  $\mu$ L de SSTE (NaCl a 1M; 0,5% de SDS; Tris-HCl – pH 8,0 a 10 mM; EDTA – pH 8,0 a 1 mM). Uma segunda extração, com igual volume (500  $\mu$ L) de clorofórmio:álcool

isoamílico (24:1), foi conduzida para reduzir contaminação, seguindo-se homogeneização com auxílio de aparelho vórtex e centrifugação a 4°C, durante dez minutos, a 12000 x g. A fase aquosa foi recolhida em novo microtubo estéril. Neste último, foram adicionados dois volumes de etanol absoluto após o que, foi levado, para precipitar à -80°C durante trinta minutos. Transcorrido este tempo, as amostras foram centrifugadas à 4°C durante, vinte minutos, a 12000 x g. Então, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* resultante foi lavado com 1 mL de etanol 75%. Novamente, os microtubos foram centrifugados à 4°C durante, vinte minutos a 12000 x g, o sobrenadante foi descartado e foi deixado o *pellet* secando a temperatura ambiente. Ao *pellet* final, foram adicionados 30 µL de *RNase free water – treated with DEPC (Invitrogen®)* para dissolver o RNA.

#### **D. Método com reagente *Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen®)***

Para cada extração de RNA total, foram pesadas 100 mg de amostra (polpa de pêssgo), previamente macerada em nitrogênio líquido com auxílio de gral e pistilo, em um microtubo estéril tipo *Eppendorf®*, de 1,5 mL. Após, foram adicionados 500 µL de *Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen®)*, a uma temperatura de 4°C, misturou-se brevemente em aparelho vórtex até a re-suspensão da amostra. Os microtubos foram incubados a temperatura ambiente por cinco minutos. Passado este tempo, foi feita a clarificação da solução através de centrifugação, durante dois minutos, a 12000 x g na microcentrífuga *Eppendorf®*, a temperatura ambiente. Logo em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo estéril, de 1,5 mL, foi adicionado 100 µL de NaCl 5M, para clarificar o extrato. Os tubos foram tampados e foram brevemente homogeneizados manualmente e foram acrescentados 300 µL de clorofórmio, novamente os tubos foram tampados e foram homogeneizados minuciosamente por inversão. Então, foi feita nova centrifugação da amostra, a 4°C, durante dez minutos, a 12000 x g, para separar as fases. Em seguida, a fase superior (aquosa) foi transferida para um novo microtubo estéril, de 1,5 mL, onde foi adicionado igual volume de álcool isopropílico (aproximadamente 400 µL), foi misturado manualmente e mantido em repouso à temperatura ambiente, durante dez minutos. Tão logo transcorrido este tempo, foi feita nova centrifugação da amostra a 4°C, durante dez minutos, a 12000 x g. Após, o sobrenadante foi descartado, com muito cuidado, pois o *pellet* é de difícil visualização, e foi adicionado 1,0 mL de etanol (75%) ao *pellet*. Foi feita

centrifugação a temperatura ambiente, durante um minuto, a 12000 x g. Novamente o sobrenadante foi descartado cuidadosamente e coletado o líquido remanescente com o auxílio de uma micropipeta. Ao *pellet* final foram adicionados 30 µL de *RNase free water treated with DEPC (Invitrogen®)* para dissolver os RNAs.

#### **1.2.2.2. Quantificação e verificação de qualidade dos extratos de RNAs**

A quantidade de RNAs totais foi estimada através de espectrofotômetro (*Ultrospect® 2000 Pharmacia*) por análise da absorbância a 260nm, utilizando como padrão 1 unidade  $A_{260} = 40 \mu\text{g}$  de RNA.mL<sup>-1</sup>.

A pureza do RNA extraído foi avaliada através do cálculo da razão (*ratio*)  $A_{260}/A_{280}$ , que indica possíveis contaminações da amostra por proteínas e compostos fenólicos. Também foi avaliada a integridade das moléculas de RNA total em gel de agarose a 1,2% corado a brometo de etídeo e visualizado em transiluminador-UV. Foi utilizado como referência o marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (*Invitrogen®*).

#### **1.2.2.3. RT-PCR (*Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*)**

A técnica de RT-PCR consiste na conjugação das técnicas de síntese de cDNA (uso da enzima transcriptase reversa) e de PCR (uso da enzima *Taq* DNA polimerase).

##### **A. Digestão com DNase I**

Com o objetivo de eliminar DNA genômico residual das amostras de RNAs totais, foi realizada digestão com *Deoxyribonuclease I Amplification Grade (Invitrogen®)*. Foram utilizados 2µg de RNAs totais na digestão. A reação foi executada segundo as recomendações do fabricante. O volume final da reação foi de 10µL, os quais foram utilizados para a reação de síntese de cDNA.

##### **B. Síntese de cDNA**

Para a síntese de cDNA (fita simples) foi utilizado o *kit* comercial *SuperScript™ First-Strand System for RT-PCR (Invitrogen®)*. A reação foi realizada no aparelho termociclador *MJ Research PTC-100™*.

Em microtubo de 200  $\mu\text{L}$  estéril, onde já havia sido realizada a digestão com DNase, foram adicionados 1  $\mu\text{L}$  de Oligo(DT)<sub>12-16</sub> (0,5  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) e 1  $\mu\text{L}$  de 10mM dNTPs mix, e a mistura foi incubada à 65°C durante cinco minutos. Logo após foram adicionados 9  $\mu\text{L}$  de uma solução matriz, composta por: 2  $\mu\text{L}$  de tampão 10X RT, 4  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 2  $\mu\text{L}$  de DTT 0,1M e 1  $\mu\text{L}$  de *RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor (Recombinant) (Invitrogen®)* e mantida incubação à 42°C por dois minutos. A seguir, foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  (50 unidades) de *SuperScript II RT (Invitrogen®)*, para a reação de síntese e o material foi mantido a 42°C durante sessenta minutos. A reação foi finalizada com incubação à 70°C durante quinze minutos.

Posteriormente, foi feita a digestão com RNase H, através da adição de 1  $\mu\text{L}$  da solução contendo a enzima e incubação à 37°C durante vinte minutos.

O produto das reações de síntese de cDNA foram utilizados nas reações subsequentes de PCR.

### C. PCR

As reações de PCR foram executadas e otimizadas com base nos parâmetros propostos por Sambrook et al. (1989) e adaptadas no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos da FAEM/UFPel. Os componentes das reações estão apresentados na Tab.1.

**Tabela 1.** Composição do meio de reação para PCR

Componentes	Volume ( $\mu\text{L}$ )
Tampão 10X PCR ( <i>Invitrogen®</i> )	2,5
$\text{MgCl}_2$ (50 mM)	1,5
dNTP mix (10mM cada) ( <i>Invitrogen®</i> )	1,0
<i>RNase free water treated with DEPC (Invitrogen®)</i>	16,7
Primer 18S forward 5' TGACGGAGAATTAGGGTTCG 3'	1,0
Primer 18S reverse 5' GACTTGCCCTCCAATGGATC 3'	1,0
cDNA (2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	1,0
<i>Taq DNA Polymerase (3 U) (Invitrogen®)</i>	0,3
<b>Volume final</b>	<b>25,0</b>

As amplificações foram realizadas no termociclador *MJ Research PTC-100™*, em presença dos oligonucleotídeos para amplificação de fragmento do 18S de pêssego, correspondente ao gene ribossomal constitutivo, segundo a seguinte programação: desnaturação inicial à 95°C por um minuto e trinta segundos, seguida de 32 ciclos desnaturação à 95°C por um minuto e dez segundos, anelamento à 53°C por um minuto, e, extensão à 72°C por um minuto e quarenta e cinco segundos, e por uma etapa para a extensão final à 72°C por cinco minutos.

O resultado das amplificações foi visualizado em gel de agarose a 1,2%, corado a brometo de etídeo, em transiluminador-UV utilizando-se como marcador 100bp DNA *Ladder* (*Invitrogen®*).

### 1.3. Resultados e discussão

Os resultados das extrações de RNA total apresentados na Tab. 2 permitem verificar que os métodos apresentam resultados distintos com relação à pureza dos extratos resultantes. A quantidade (massa) e a qualidade de extratos de ácidos nucléicos pode ser estimada, através de leituras de absorvância nos comprimentos de onda de 260nm e de 280nm em espectrofotômetro. As leituras são confiáveis a partir de 0,15 unidades. Soluções de RNAs de boa pureza em água apresentam valores entre 1,8 e 2,0 para a relação  $A_{260}/A_{280}$ . Neste aspecto, o resultado do extrato proveniente do método *Concert<sup>TM</sup>*, apresenta destaque, vez que apresentou razão igual a 2,0, na maioria das repetições. As amostras provenientes dos demais métodos apresentaram razões entre 1,0 e 3,0. Segundo Brasileiro & Carneiro (1998), razão menor significa contaminação com proteínas e razão maior indica contaminação com fenol.

**Tabela 2.** Resultados da quantificação da concentração de extratos de RNAs totais extraídos por quatro métodos, através de absorvância por análise espectrofotométrica.

Protocolos	$A_{260}$	$A_{280}$	RNA ( $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )	Razão* ( $A_{260}/A_{280}$ )
<i>Trizol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen<sup>®</sup>)</i>	0,373	0,162	15,0	2,302
Chang	0,003	0,001	0,1	3,000
Meisel	0,011	0,011	0,4	1,000
<i>Concert<sup>TM</sup> Plant RNA Reagent (Invitrogen<sup>®</sup>)</i>	0,027	0,014	1,0	2,000

\* Melhor resultado obtido a partir de três extrações.

Resultados não ideais, em especial no pêssego, são atribuídos à presença de proteínas, compostos fenólicos e/ou carboidratos nas amostras. Segundo Meisel et al. (2005), estudar a expressão gênica em frutíferas pode ser tecnicamente complexo, devido a grande quantidade de polissacarídeos e compostos fenólicos que se acumulam durante a maturação e/ou em resposta a estímulos do ambiente.

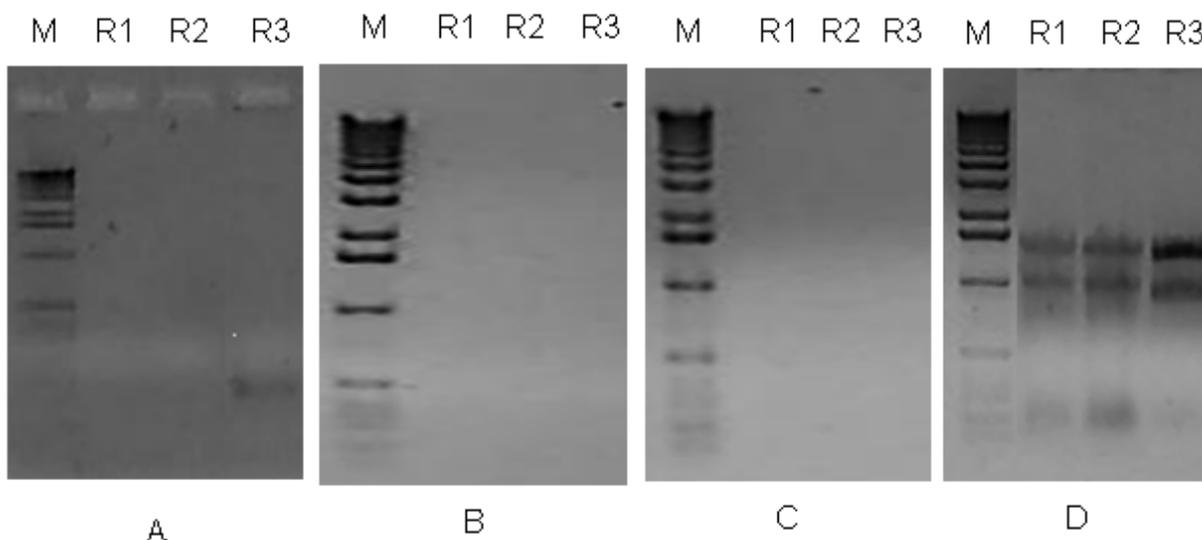
Vários autores, nos últimos anos, têm descrito métodos e ferramentas para minimizar problemas relacionados a contaminações por carboidratos e compostos secundários (CHANG et al., 1993; SALZMAN et al., 1999; ASIF et al., 2000; TAO et al., 2004; MEISEL et al., 2005), porém, a maioria deles trata especificamente de um ou outro fruto e/ou tecido.

Isolar RNAs puros a partir de tecidos ricos em polissacarídeos e polifenóis é tarefa difícil. A presença destas substâncias pode afetar a qualidade e/ou a quantidade do RNA isolado (ASIF et al., 2000). Esses compostos interferem na leitura espectrofotométrica e isso talvez possa explicar o porquê de a quantificação de RNA no método *Trizol*<sup>®</sup> ter apresentado resultados tão altos, se comparado com os outros métodos propostos (tab. 2).

A qualidade dos extratos ainda pode ser confirmada por visualização em gel de agarose corado a brometo de etídeo. Contudo, somente a performance dos extratos de ácidos nucléicos em procedimentos, como em reações de PCR ou de RT-PCR, poderá melhor demonstrar a qualidade esperada.

Neste estudo, o gel (Fig. 1-D) permitiu demonstrar a integridade das moléculas de RNAs extraídos pelo método *Concert*<sup>™</sup> e a ausência de outras moléculas de ácidos nucléicos contaminantes. Estes extratos foram os únicos a promover resultados positivos em reações RT-PCR (Fig. 2 e 3).

Os extratos provenientes das extrações pelo método descrito por Chang et al. (1993) e pelo descrito por Meisel et al. (2005), não apresentaram RNAs extraídos, não sendo possível visualizar vestígios de bandas nos géis produzidos (Fig. 1-B e 1-C). Estes acontecimentos podem ter sido ocasionados devido à especificidade dos métodos, com relação ao tecido vegetal proposto à extração.



**Figura 1.** Perfil de RNAs obtidos por diferentes métodos, em triplicata, em pêssegos cv. Chiripá; A – Reagente *Trizol*<sup>®</sup>; B – Método Chang et al. (1993); C - Método Meisel et al. (1995); D – Reagente *Concert*<sup>™</sup>; M – Marcador *1kb DNA Ladder*.

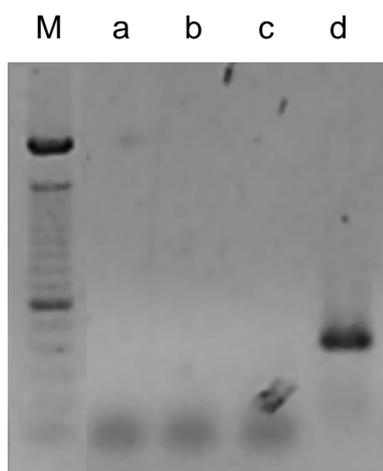
O método de extração de RNAs por cloreto de lítio, descrito por Chang et al. (1993), fora adequado à extração de RNAs em tecidos provenientes de árvores de cinamomo e estas possuem um alto teor de celulose, que é um polissacarídeo insolúvel. Já o pêssogo durante sua maturação, converte o amido insolúvel em polissacarídeo solúvel, que possui propriedades físico-químicas similares a dos RNAs. Eles podem co-precipitar com o RNA durante a extração, afetando a quantidade e qualidade do mesmo (ASIF et al., 2000; LOGEMANN et al., 1987).

O método descrito por Meisel et al. (2005), para pêssegos, faz referência a ser um método modificado, a partir do método descrito por Chang et al. (1993), porém, os autores salientam que ele possui uma segunda extração com tampão SSTE, além de duas precipitações, passos que fariam diferença na retirada daqueles contaminantes da amostra. Como no método anterior, também não se obteve sucesso com estes procedimentos. Um fator limitante pode ter sido a diferença da escala de extração utilizada.

No gel de agarose dos extratos provenientes do método *Trizol*<sup>®</sup> (Fig. 1-A), se pode observar que uma das repetições apresentou uma banda de menor intensidade, com possível baixa concentração de RNAs, porém não houve repetibilidade do resultado. Este protocolo foi seguido segundo as recomendações

do fabricante, e é baseado na extração mediante guanidina ácida e tiocianato-fenol-clorofórmio, método originalmente descrito por Chomczynski & Sacchi (1987). Tal método é descrito pela fabricante como adequado para uso em diversos tecidos e células, como animal, vegetal e bacteriana e também assegura que o RNA oriundo desta extração é completamente livre de contaminação por proteínas. Porém, não faz referência a ser adequado para vegetais ricos em polissacarídeos e fenóis que, ao que se sabe, são as maiores contaminações que ocorrem em extrações de RNAs de pêssegos. Meisel et al. (2005) obtiveram resultados semelhantes em seu estudo com pêssegos.

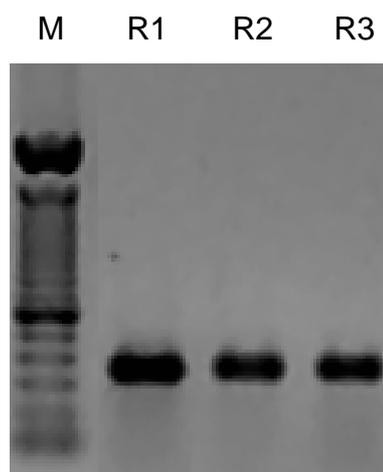
Em tempo, nos extratos provenientes do método *Concert*<sup>TM</sup> (Fig. 1-D), todas as repetições mostraram a total integridade dos fragmentos de RNAs, com clareza na delimitação das bandas referentes aos RNAs mensageiros e ribossomais. O fabricante não descreve a composição química do produto, apenas referindo a presença de  $\beta$ -mercaptoetanol, possivelmente atuando como antioxidante, porém, descreve ser o produto eficiente na extração de RNAs a partir de pequena quantidade de tecido, bem como, na extração de tecidos ricos em compostos fenólicos e polissacarídeos, o que foi evidentemente comprovado nos testes realizados, com frutos de pêssego.



**Figura 2.** Amplificações por RT-PCR do 18S nos extratos de RNAs com melhor razão de leituras espectrofotométricas ( $A_{260}/A_{280}$ ). M – marcador *100bp DNA Ladder*; a – extrato pelo reagente *Trizol*<sup>®</sup>; b – extrato pelo método Chang; c – extrato pelo método Meisel; d – extrato pelo reagente *Concert*<sup>TM</sup>.

Por fim, como teste decisivo, no intuito de comprovar a presença e qualidade dos extratos RNAs pelo método *Concert<sup>TM</sup> Plant RNA Reagent (Invitrogen)* frente aos demais métodos testados, foram realizadas reações de RT-PCR utilizando oligonucleotídeos para amplificação do 18S ribossomal (correspondente ao gene constitutivo). Foram testados os extratos que apresentaram melhor razão  $A_{260}/A_{280}$  entre os exemplares das triplicatas, oriundos de todos os métodos. Como pode ser observado na Fig. 2 (gel de agarose), somente o extrato oriundo do método *Concert<sup>TM</sup>* mostrou resultado positivo quando submetido à RT-PCR. Os demais extratos, inclusive o oriundo do método *Trizol<sup>®</sup>*, que havia apresentado uma banda de pouca intensidade no gel dos extratos de RNA, não permitiram sucesso nas reações.

Outro fator importante em trabalhos envolvendo estudos moleculares, diz respeito à reprodutibilidade e à repetibilidade dos resultados. Para certificação, foram realizadas novas reações de RT-PCR, utilizando somente os extratos provenientes de extração com o método *Concert<sup>TM</sup>*, fazendo uso de oligonucleotídeos para 18S (Fig. 3). Novamente foi demonstrada a eficiência do método para a extração de RNAs de alta pureza em pêssegos, que é um tecido rico em compostos fenólicos e carboidratos.



**Figura 3.** Amplificação por RT-PCR utilizando oligonucleotídeos para 18S dos três extratos de RNAs totais de pêssego, obtidos através do método *Concert<sup>TM</sup>*. M – Marcador 100bp DNA Ladder; R1, R2, R3 – repetições.

#### 1.4. Conclusão

A extração de RNAs totais com o reagente *Concert™ Plant RNA Reagent* (*Invitrogen®*) é o método mais adequado, dentre os testados, para obtenção de extratos de RNAs totais de frutos de pêssegos cv. Chiripá, pois apresenta reprodutibilidade e repetibilidade de resultados, extratos com pureza e integridade superior, permitindo sua posterior utilização em RT-PCR.

## Capítulo II

### 2. Perfil transcricional de enzimas que participam da degradação da parede celular em pêssego “Chiripá” após o armazenamento

#### 2.1. Introdução

O pêssego é uma fruta que vem apresentando grande crescimento em produção nos últimos anos. Este aumento, associado ao curto período de safra, exige o armazenamento de parte da produção, fazendo com que o período de oferta seja prolongado. Além disso, o consumidor exige que as frutas apresentem, além de boa aparência, sabor, suculência, aroma e maior durabilidade.

Pêssegos são frutos perecíveis que amadurecem e senescem rapidamente à temperatura ambiente e requerem um cuidadoso e rápido manuseio após a colheita para evitar sérias perdas (LIU et al., 2005). O ar refrigerado é utilizado para diminuir a velocidade desses processos e o desenvolvimento de podridões. No entanto, injúrias causadas pelo frio limitam o tempo de armazenamento em potencial dessas frutas, já que reduzem a aceitabilidade do consumidor (LURIE & CRISOSTO, 2005). Em armazenamentos mais prolongados, a acentuada perda de firmeza de polpa, a ocorrência de distúrbios fisiológicos como a lanosidade e a incidência de podridões são os principais problemas que ocorrem durante a frigoconservação (BRACKMANN et al., 2003).

No Brasil, o sistema mais empregado para a conservação de pêssegos *in natura* é o armazenamento em ar refrigerado. Nesse sistema, o período seguro de estocagem de pêssegos varia de 5 a 40 dias, dependendo da cultivar, do ponto de colheita, da região de cultivo e da qualidade das câmaras frias, conforme observações feitas por Meredith et al. (1989), Taylor et al. (1994). A perda de

firmeza da polpa (BEN-ARIE & SONEGO, 1980; MANESS et al., 1993; SONEGO et al., 1994), a ocorrência de distúrbios fisiológicos, especialmente lanosidade e escurecimento interno (ROBERTSON et al., 1992; LURIE, 1993; LUCHSINGER et al., 1996) e podridões (GOTTINARI et al., 1998; CERETA, 1999) têm sido relatadas como as principais alterações indesejáveis durante o armazenamento em ar. Várias tecnologias de armazenamento disponíveis para retardar o amadurecimento dos frutos vêm sendo utilizadas. Dentre as alternativas de armazenamento, o emprego de atmosferas controladas (ROMBALDI et al., 2002), atmosferas modificadas (LURIE, 1993), aquecimentos intermitentes e choques de CO<sub>2</sub> (TONUTTI et al., 1998), têm sido testados para reduzir estes problemas. Os resultados são variados, indicando, em alguns casos, limitações econômicas e falta de reprodutibilidade conforme MITCHELL & CRISOSTO (1995).

A parede celular primária é composta por numerosos polímeros que variam pouco em estrutura entre as espécies, mas oito componentes poliméricos (celulose, três matrizes glicanas compostas por açúcares naturais, três pectinas ricas em ácido D-galacturônico e proteínas estruturais) estão sempre presentes. A desorganização da parede celular é responsável pelo amaciamento e por mudanças na textura durante a maturação, mas o papel preciso, em particular das alterações da parede celular e o que as enzimas de alteração da parede celular realizam não é conhecido (BRUMMELL & HARPSTER, 2001). Essas alterações de textura têm sido associadas à ação de diferentes enzimas hidrolíticas, entre as quais as poligalacturonases (PGs) e as pectinametilerases (PMEs) que agem sobre as pectinas, despolimerizando e solubilizando-as. Além destas, ainda existe informação de que a expressão de mRNA de expansina e proteína resultante, estão correlacionadas com o crescimento e/ou com a desorganização da parede celular de muitos tecidos vegetais (DOTTO et al., 2006).

A eficiência da AC está ligada diretamente ao controle da ação do etileno e, conseqüentemente, na regulação de genes relacionados ao amadurecimento. Entre esses genes, aqueles das enzimas poligalacturonases e pectinametilerases, responsáveis pela hidrólise de pectinas, são os que mais contribuem para a perda de firmeza de polpa e para a formação da lanosidade (ZHOU et al., 2000a). Resultados obtidos por Hayama et al. (2006) confirmam o papel do etileno como indutor de PG, mas não consideravelmente da atividade da PME.

Trabalhos relacionados com a expressão de genes da poligalacturonase e da pectinametilesterase em pêssego foram relatados por ZHOU et al. (2000b). Neles os autores demonstraram que a AC é capaz de inibir a expressão do gene da poligalacturonase e reduzir a expressão do gene da pectinametilesterase durante o armazenamento. Porém, quando os frutos foram expostos à temperatura ambiente o acúmulo de expressão de mRNAs desses genes aumentou drasticamente.

No intuito de avaliar o perfil transcricional de enzimas que participam da degradação da parede celular em pêssego “Chiripá” após o armazenamento, foi feita extração de RNAs de pêssegos e um estudo da expressão transcricional em presença dos oligonucleotídeos da PGAC1 (AY262754), PME (X95991) e ExpPP1 (AB029083).

## 2.2. Material e métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos (Biotecnal) - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA) da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” (FAEM), Universidade Federal de Pelotas (UFPEl).

### 2.2.1. Material vegetal

Foram utilizados pêssegos (*Prunus persica* L.), cv. Chiripá, provenientes de pomar comercial da cidade de Farroupilha – RS, safra 2006-2007. Neste, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo quatro tratamentos com duas repetições cada: T1 – ar refrigerado (-0,5°C, durante quatro semanas); T2 – atmosfera controlada (2,0kPa O<sub>2</sub> e 8,0kPa CO<sub>2</sub> durante 7 semanas a -0,5°C); T3 – atmosfera controlada (aplicação de 100 mg.L<sup>-1</sup> de etileno durante 24 horas, após o armazenamento) e T4 – atmosfera controlada (aplicação de 1-Metilciclopropeno (1-MCP) durante 24 horas antes do armazenamento), todos os tratamentos foram mantidos sob umidade relativa em torno de 95 e 97%. De cada tratamento foram coletadas amostras no dia da retirada da câmara e quatro dias após, sendo tais frutos mantidos, neste intervalo, à temperatura ambiente (22°C), simulando a comercialização.

### 2.2.2. Avaliações

A variável estudada foi a expressão transcricional correspondente às enzimas poligalacturonase (PG), pectinametilesterase (PME) e expansinas (Exp) pela técnica RT-PCR.

### 2.2.2.1. Expressão transcricional

#### A. Extração de RNAs

Para cada extração de RNA total, foram pesados 100 mg de amostra (polpa de pêsego), previamente macerada em nitrogênio líquido com auxílio de gral e pistilo, em um microtubo tipo *Eppendorf*<sup>®</sup> com capacidade para 1,5 mL. Após, foram adicionados 500µL de *Concert<sup>TM</sup> Plant RNA Reagent (Invitrogen)*, à temperatura de 4°C e misturando-se brevemente em vórtex até a completa ressuspensão da amostra. Os tubos permaneceram à temperatura ambiente por cinco minutos. Passado este tempo, foi feita centrifugação da solução por dois minutos, à temperatura ambiente, a 12000 x g, em microcentrífuga *Eppendorf*<sup>®</sup>. Logo em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo estéril, de 1,5 mL, foi adicionado 100 µL de NaCl 5M e misturou-se brevemente. Após a homogeneização, foram acrescentados 300 µL de clorofórmio e promovida homogeneização por inversão do tubo. Seguiu-se nova centrifugação, à 4°C, por dez minutos a 12000 x g, para separar as fases. Em seguida, foi transferida a fase superior (aquosa) para um novo microtubo estéril, adicionando-se igual volume de álcool isopropílico (400 µL), e feita homogeneização, mantendo-se em repouso à temperatura ambiente por dez minutos. Tão logo transcorrido este tempo, centrifugou-se novamente a amostra à 4°C durante dez minutos a 12000 x g. Após, foi descartado o sobrenadante, com cuidado, pois o *pellet* é de difícil visualização, e foi adicionado 1,0 mL de etanol (75%) ao *pellet*. Centrifugou-se à temperatura ambiente durante um minuto a 12000 x g. Novamente o sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o líquido remanescente foi coletado com o auxílio de micropipeta. Ao *pellet* final (RNA), foram adicionados 30 µL de *RNase free water treated with DEPC (Invitrogen*<sup>®</sup>) para dissolver o *pellet* de RNA.

#### B. Quantificação e controle de qualidade do RNA

A quantidade do RNA total foi estimada através de espectrofotômetro (*Ultrospect<sup>®</sup> 2000 Pharmacia*) por análise da absorbância a 260nm, utilizando como padrão  $A_{260nm} = 40 \mu\text{g de RNA.mL}^{-1}$ .

A qualidade do RNA extraído foi avaliada através do cálculo da razão  $A_{260nm}/A_{280nm}$  que detecta possíveis contaminações da amostra por DNA ou por proteínas e compostos fenólicos. Também a qualidade, quanto à integridade de

fragmentos, foi avaliada em gel de agarose a 1,2% corado a brometo de etídeo e visualizado em transiluminador-UV, utilizando-se como marcador 100bp DNA *Ladder* (*Invitrogen*<sup>®</sup>).

### **C. RT-PCR (Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction)**

A técnica *RT-PCR* consiste na conjugação das técnicas de síntese de cDNA (uso da enzima transcriptase reversa) e de *PCR* (uso da enzima *Taq* DNA polimerase).

Dentre as técnicas de caracterização e/ou quantificação da transcrição gênica, a técnica de *RT-PCR* destaca-se pela alta sensibilidade, o que possibilita o estudo de genes com baixas taxas de expressão e a utilização de pequenas quantidades de amostra. Também se destaca pela praticidade, já que permite obter resultados com extrações de RNA total e executável em curto tempo, quando comparada com outras metodologias. A técnica dispensa o uso de sondas radioativas para a visualização dos resultados. Para o controle da técnica em pêssegos utilizou-se a fração 18S rRNA, gene ribossomal constitutivo.

### **D. Digestão com DNase I**

Com o objetivo de eliminar DNA genômico residual das amostras de RNAs totais, foi realizada a digestão com *Desoxyribonuclease I Amplification Grade* (*Invitrogen*<sup>®</sup>). Utilizou-se 2 µg de RNA total para a digestão. A reação foi executada segundo as recomendações do fabricante do *kit* (*Invitrogen*<sup>®</sup>). O volume final da reação, de 10 µL, foi utilizado para a reação de síntese de cDNA.

### **E. Síntese de cDNA**

Para a síntese de cDNA (fita simples) foi utilizado o *kit* comercial *SuperScript™ First-Strand System for RT-PCR* (*Invitrogen*<sup>®</sup>). A reação foi realizada no aparelho termociclador *MJ Research PTC-100™*.

Em microtubo de 200 µL estéril, onde já havia sido realizada a digestão com DNase, foram adicionados 1 µL de Oligo(DT)<sub>12-16</sub> (0,5 µg.µL<sup>-1</sup>) e 1 µL de dNTPs mix a 10 mM, e incubados a 65°C durante cinco minutos. Logo foram adicionados 9 µL de uma solução matriz, composta por 2 µL de tampão 10X RT, 4 µL de MgCl<sub>2</sub>, 2 µL

de 0,1M de DTT e 1  $\mu$ L de *RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor (Recombinant) (Invitrogen<sup>®</sup>)* e foi feita incubação à 42°C durante dois minutos. A seguir, foi adicionado 1  $\mu$ L (50 unidades) de *SuperScript II RT<sup>®</sup>*, para a reação de síntese, sendo o material mantido à 42°C durante sessenta minutos. A reação foi finalizada, incubando-se a amostra à 70°C durante quinze minutos.

Posteriormente, foi feita a digestão dos RNAs com RNase H, adicionando-se 1  $\mu$ L de solução contendo a enzima e incubando-se à 37°C por vinte minutos.

O produto das reações de síntese de cDNAs foram utilizados nas reações de PCR.

## F. PCR

As reações de PCR foram executadas e otimizadas baseando-se nos parâmetros propostos por Sambrook et al. (1989) e adaptadas pelo laboratório de Biotecnologia de Alimentos. Os componentes das reações constam na tab. 3.

**Tabela 3.** Composição do meio de reação para PCR

Componentes	Volume ( $\mu$ L)
Tampão 10X PCR ( <i>Invitrogen<sup>®</sup></i> )	2,5
MgCl <sub>2</sub> (50mM) ( <i>Invitrogen<sup>®</sup></i> )	1,5
dNTP mix (10mM cada) ( <i>Invitrogen<sup>®</sup></i> )	1,0
<i>RNase free water Treated with DEPC (Invitrogen<sup>®</sup>)</i>	16,7
Primer 5'	1,0
Primer 3'	1,0
cDNA	1,0
<i>Taq DNA Polymerase (Invitrogen<sup>®</sup>)</i>	0,3
<b>Volume final</b>	<b>25,0</b>

As amplificações foram realizadas no termociclador *MJ Research PTC-100<sup>TM</sup>*, em presença dos oligonucleotídeos para PME, PGAC1, ExpPP1 e 18S constitutivo (utilizado como controle positivo), segundo a seguinte programação: desnaturação inicial à 95°C por um minuto e trinta segundos, seguida por: desnaturação à 95°C por um minuto e dez segundos, anelamento à 53°C por um minuto, extensão à 72°C por um minuto e quarenta e cinco segundos e complementadas por extensão final à

72°C por cinco minutos. Para todos os pares de oligonucleotídeos utilizaram-se os mesmos tempos e temperaturas programadas, porém, para amplificar a PME, foi utilizada programação de trinta e seis ciclos e, para PG1 e Exp1, trinta e dois ciclos. As seqüências dos oligonucleotídeos encontram-se na tab. 4.

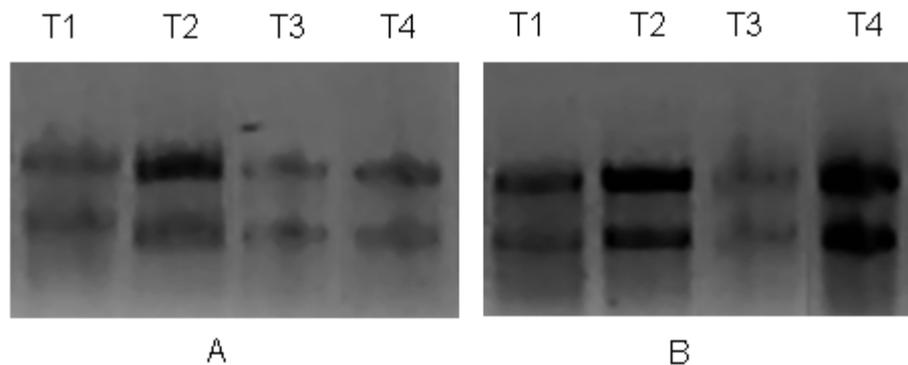
**Tabela 4.** Seqüências dos *primers* (oligonucleotídeos).

<i>Primers</i>	Seqüências de nucleotídeos	
	<i>Sense</i>	<i>Anti-sense</i>
PGAC1	5'GCCAATTGAGACACAATCGT3'	5'AGATGGCAAGACTGACTCCA3'
PME	5'CATAATCCATTGCCTGCTGG3'	5'CCAGTGCCATCTTGAGCTACA3'
ExpPP1	5'GGCTTTTACCTCACACTTAGC3'	5'AGAGTTGCTCTGCCAGTTCT3'
18S	5'TGACGGAGAATTAGGGTTCG3'	5'GACTTGCCCTCCAATGGATC3'

Os resultados das reações de amplificação foram visualizados em gel de agarose a 1,2% corado a brometo de etídeo em transiluminador-UV, utilizando-se como marcador 100bp DNA *Ladder* (*Invitrogen*<sup>®</sup>).

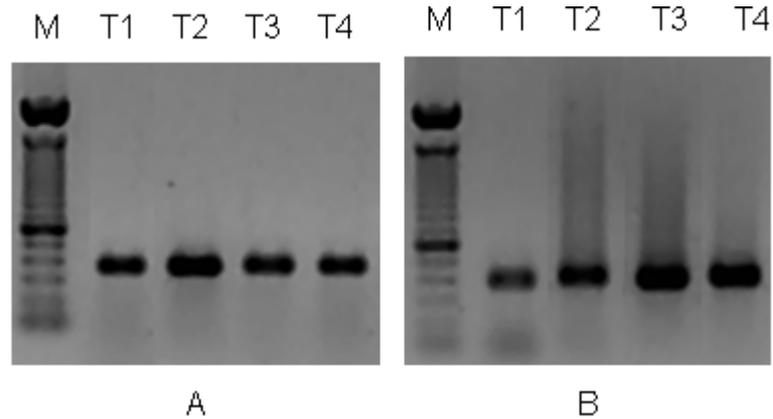
### 2.3. Resultados e discussão

Os RNAs extraídos dos frutos de pêsego apresentaram uma boa integridade e qualidade, uma vez que estes apresentaram bandas bem delimitadas em gel de agarose a 1,2% corado a brometo de etídeo, bem como os valores de razão (*ratio*)  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  apresentaram resultados sempre entre 1,87 e 2,00. Todas as amostras apresentaram dois fragmentos visíveis (Fig. 4).



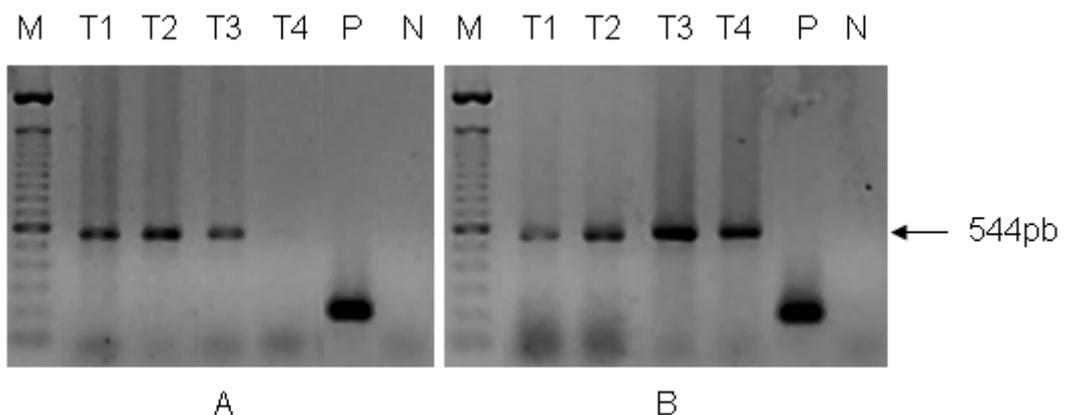
**Figura 4.** RNAs obtidos em amostras de frutos dos quatro tratamentos (T1, T2, T3, T4); A – 0 dia após saída da câmara; B – 4 dias após saída da câmara.

Porém, mesmo apresentando alguma degradação, quando amplificados os cDNAs, obtidos a partir dos RNAs extraídos, em presença dos oligonucleotídeos para 18S (gene constitutivo) todos amplificaram (Fig. 5). Este fato mais uma vez demonstra que os RNAs foram extraídos com boa qualidade.



**Figura 5.** Amplificações por PCR utilizando oligonucleotídeos para 18S, dos cDNAs obtidos de RNAs totais (RT-PCR) para os quatro tratamentos (T1, T2, T3, T4) de pêssgo “Chiripá”. M – Marcador *100bp DNA Ladder*, A – 0 dia após saída da câmara, B – 4 dias após saída da câmara.

A Fig. 6 apresenta os perfis de amplificação dos cDNAs, obtidos a partir de RNAs extraídos, em presença dos oligonucleotídeos para a PGAC1, com fragmentos de 544pb. A poligalacturonase é uma enzima conhecida por contribuir para o amolecimento de frutas, tal pensamento era associado à ação intercelular em pectinas da parede celular. Recentes experimentos de transformação vieram estabelecer que, em tomates, no entanto, não existe uma relação simples entre a ação da endo-PG e a firmeza das frutas (LESTER et al., 1994).



**Figura 6.** Amplificações por PCR utilizando oligonucleotídeos para PGAC1, dos cDNAs obtidos de RNAs totais (RT-PCR) para os quatro tratamentos (T1, T2, T3, T4) de pêssgo “Chiripá”. A – 0 dia após saída da câmara, B – 4 dias após saída da câmara; M – Marcador *100bp DNA Ladder*, P – controle positivo (18S); N – controle negativo.

Segundo o que se observa na Fig. 6 dos géis de agarose, com relação a PG, o amplificado do tratamento T1, referente a ar refrigerado, apresentou uma expressão maior no dia 0 (zero), ou seja no momento de saída da câmara, do que no 4º dia após a saída. No amplificado do tratamento T2, referente à atmosfera controlada, ocorreu o mesmo comportamento em ambos os géis, porém a queda da expressão no 4º dia foi bem inferior, comparando com o observado para T1. Já no amplificado do tratamento T3, referente à atmosfera controlada com aplicação de 100 mg.L<sup>-1</sup> de etileno durante um dia após o armazenamento, o comportamento foi diferenciado, pois a expressão do amplificado para PG no dia 0 foi ligeiramente inferior a amplificação dos dois primeiros tratamentos, bem como foi bem inferior ao resultado do 4º dia após saída da câmara, que neste tratamento também apresentou amplificação com a maior intensidade de banda de todos os tratamentos para o 4º dia. O amplificado do tratamento T4, referente à atmosfera controlada com aplicação de 1-MCP durante 24 horas antes do armazenamento, foi o que apresentou maior diferença, pois no 0 dia a expressão do amplificado para PG foi mínima, praticamente imperceptível, enquanto no 4º dia, a expressão foi muito superior.

Segundo Girardi et al. (2005), em termos de atividade enzimática foi observado que somente o uso de ar refrigerado tem um controle com efeito mais pronunciado para a atividade de endo-PG e exo-PG, do que para a atividade da PME e que, em contraste, o tratamento com atmosfera controlada (1,5 kPa de O<sub>2</sub> e 5 kPa de CO<sub>2</sub>) reduz a atividade das três enzimas, o qual, segundo os autores, é o tratamento mais adequado para melhorar a qualidade pós-colheita de pêssegos “Chiripá”.

O acúmulo de mRNAs de PG é regulado pelo etileno. Baixos níveis de etileno são suficientes para indução e acúmulo de moléculas de seu mRNA e este é crescente com a exposição ao etileno (SITRIT & BENNETT, 1998). Isto comprova o porquê de, no 4º dia após a saída da câmara, a concentração de mRNAs para PG ser tão superior ao verificado no 0 dia.

Zilotto et al. (2003), mostraram que o acúmulo de PG mRNAs, que é um processo regulado pelo etileno, não diferiu entre o controle e nectarinas pós-tratamento com 1-MCP. Estes dados poderiam apoiar a hipótese de um efeito limitado de 1-MCP sobre genes etileno-dependentes no amadurecimento de frutos de pessegueiro. O comportamento dos pêssegos parece nitidamente diferente de maçãs, confirmando que a habilidade do 1-MCP em atrasar amadurecimento é

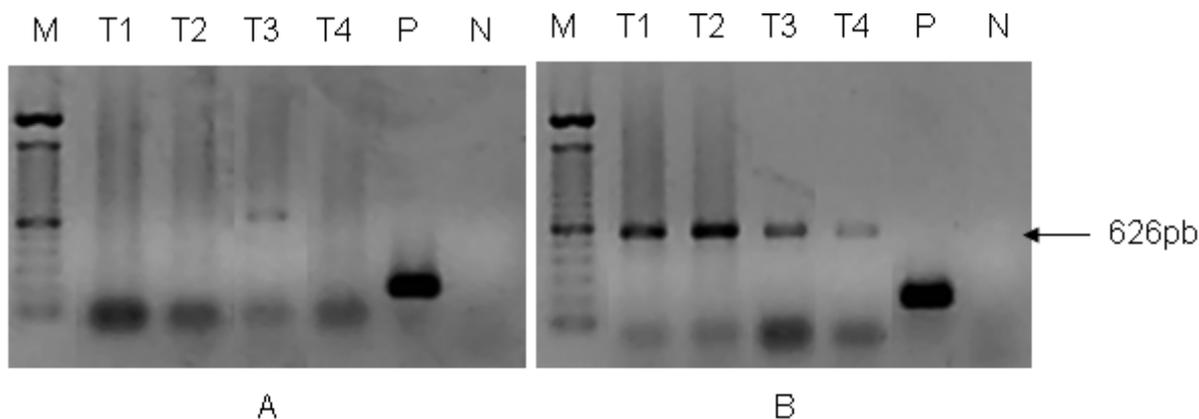
restrito a poucas horas após o tratamento (DAL CIN et al., 2006). Isso pode explicar o porquê do comportamento muito semelhante, em especial no 4º dia, com os outros tratamentos em relação à concentração de mRNAs expressos em PG.

A extensão da despolimerização dos poliuronídeos no não-amolecimento dos frutos transgênicos também foi semelhante à da variedade não transformada (DELLA PENNA et al., 1990). Experimentos como este, mostram que a PG é um componente responsável, em grande parte, pela solubilização e despolimerização de poliuronídeos durante a maturação, mas demonstra que a PG não é necessária, nem suficiente, para o amolecimento dos frutos (BRUMMELL & HARPSTER, 2001).

Globalmente, os dados mostram que a atividade da PG é responsável pela despolimerização e solubilização da poliuronídeos durante o amadurecimento, mas que isso apenas contribui para um pequeno amolecimento dos frutos. O papel da PG na maturação dos frutos pode, assim, ser principalmente ocupado com mudanças texturais e nas propriedades de qualidade dos frutos, e, em última análise, na sua deterioração, permitindo a dispersão de sementes (BRUMMELL & HARPSTER, 2001).

Durante o amadurecimento de pimentão (*Capiscum annuum*), Priya Shethu et al. (1996) observaram que a firmeza do fruto diminui concomitantemente com o aumento da atividade da poligalacturonase e com a diminuição da atividade da pectinametilesterase.

Os perfis eletroforéticos das amplificações dos cDNAs, obtidos a partir de RNAs extraídos dos frutos, em presença dos oligonucleotídeos da PME apresentaram fragmentos 626pb, como esperado (Fig. 7). A pectinametilesterase é uma enzima que hidrolisa a pectina da parede celular através dos metil-ésteres, que podem contribuir realizando ligações cruzadas de resíduos de galacturona com a pectina via íons de cálcio ( $Ca_2^+$ ), e também podem fazer a pectina tornar-se suscetível à degradação por PG (BRUMMELL & HARPSTER, 2001).



**Figura 7.** Amplificações por PCR utilizando oligonucleotídeos para PME, dos cDNAs obtidos de RNAs totais (RT-PCR) para os quatro tratamentos (T1, T2, T3, T4) de pêssgo “Chiripá”. A – 0 dia após saída da câmara, B – 4 dias após saída da câmara; M – Marcador *100bp DNA Ladder*; P – controle positivo (18S); N – controle negativo.

Verificando-se nos géis de agarose (Fig. 7), com relação à expressão da PME, todas as amplificações dos cDNAs, a partir de RNAs extraídos dos frutos oriundos dos tratamentos apresentaram intensidade de bandas semelhantes. Em se tratando do amplificado do tratamento T1, houve um incremento na expressão de RNAs amplificados para PME nos extratos de 0 dia, que não apresentou fragmentos nítidos, nos extratos do 4º dia. Da mesma maneira se comportou o amplificado de T2, no qual houve aumento da expressão ao 0 dia, que de forma semelhante ao T1 não apresentou fragmentos visíveis, no 4º dia. Já na amplificação de T3 houve uma leve banda, com baixa intensidade no 0 dia e esta teve um pequeno aumento até o 4º dia. Por fim, na amplificação de T4, como em T1 e T2 no dia 0 não apresentou fragmentos visíveis e no 4º dia houve um aumento na expressão de amplificados para PME muito pequeno. Este foi o tratamento em que a concentração de amplificados foi menor no 4º dia.

Acredita-se que grupos metil-ésteres estejam presentes na parede em forma de homogalacturonas (pectinas), com um alto grau de metilesterificação que diminui durante o desenvolvimento (VINKEN et al., 2003). Brummell et al. (2004), verificaram que imediatamente após a armazenagem, paredes celulares de tecidos secos, que posteriormente se tornaram suculentos, tinham um baixo nível de metilesterificação, semelhantes às paredes de frutos suculentos maduros. Frutos que se tornaram farinhentos tinham um nível mais elevado de PME, que diminuiu durante posterior

amadurecimento quando o tempo de frio foi curto e, conseqüentemente, o grau de lanosidade foi baixa. O aumento do tempo de armazenamento diminuiu o suco livre e foi correlacionado com os níveis mais altos de metilesterificação (BRUMMELL et al., 2004).

A firmeza dos frutos diminui lentamente durante o armazenamento a frio prolongado (VON MOLLENDORFF et al., 1992), e o desenvolvimento dos sintomas de lanosidade são acompanhados pela redução das taxas de respiração e da evolução muito baixa do etileno (ZHOU et al., 2001). As sínteses de algumas enzimas de modificação da parede celular, incluindo endo-PG e endo-1,4- $\beta$ -glucanase, são reguladas pelo etileno, enquanto o acúmulo de outras, como as PMEs, podem ser controladas por diferentes fatores (BRUMMELL & HARPSTER, 2001). Talvez por este motivo, a presença desta enzima no dia 0 após a saída da câmara, tenha se apresentado de maneira praticamente nula, pois diferentes fatores poderiam estar contribuindo para esta ausência.

Diferentemente do que foi demonstrado no atual trabalho, com relação à amplificação dos cDNAs obtidos a partir de mRNAs extraídos dos frutos (em especial com a PME, que nos diferentes tratamentos demonstrou nenhuma ou baixa concentração destes no 0 dia) a atividade da PME continua durante o armazenamento a frio, enquanto a atividade da PG diminui. Foi o que demonstraram Zhou et al. (2000) em seus estudos com pêssegos, pois a atividade da PME é muito estável a baixas temperaturas e em frutos armazenados os níveis basais desta atividade também foram mantidos (BEM-AIRE & SONEGO, 1980). A este desequilíbrio das enzimas é que é atribuída a presença de distúrbios fisiológicos comuns em frutos de caroços, como a lanosidade.

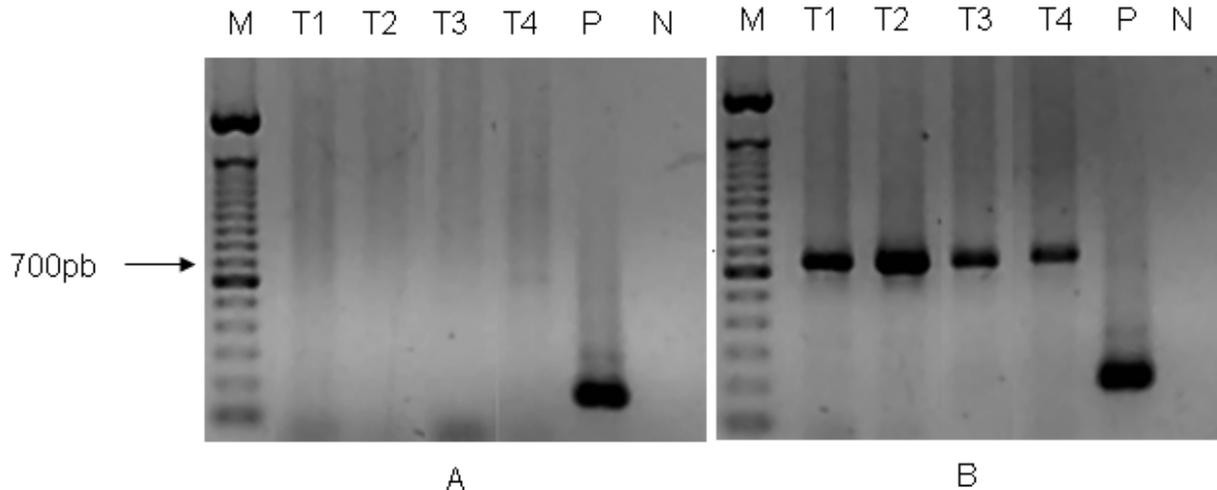
Brummell e colaboradores (2004) fizeram uma coleta de frutos de pêssego antes do período de amadurecimento e demonstraram que, com exceção de PME e de endo-1,4- $\beta$ -mananase, o aumento da atividade enzimática ocorreu entre uma e duas semanas de frio nos frutos que tornaram-se suculentos após amadurecimento, mas que este aumento esteve ausente nos frutos que tornaram-se farináceos. Após posterior amadurecimento, frutos suculentos acumularam elevados níveis de atividade de todas as enzimas estudadas, exceto de PME.

Em trabalho realizado com caqui, Luo (2007) observou que a atividade da PME em frutos tratados com 1-MCP foi quase totalmente suprimida nos primeiros

oito dias, aumentando depois e atingindo um pico no 12<sup>o</sup> dia. Posteriormente, a atividade da PME diminuiu rapidamente.

O amaciamento de frutos é usualmente considerado como sendo o resultado da degradação da protopectina. Foi observado que o aumento da solubilização das pectinas, em frutos de pêssegos, foi inibido pela aplicação de 1-MCP, ocorrendo junto a inibição do amolecimento dos frutos (LIU et al., 2005). Isto leva a crer que o tratamento retarda a maturação do fruto e, desta maneira, se poderia explicar por que o tratamento T4 (aplicação de 1-MCP) obteve menor expressão quando comparado ao T3 (tratamento com etileno - fitormônio considerado indutor de maturação e senescência (LIGUORI et al., 2004)), no caso da expressão transcricional da PME.

A expressão dos transcritos de ExpPP1 apresentaram fragmentos de aproximadamente 680pb (Fig. 8). A expansina é uma proteína presente em paredes celulares de plantas e foi descoberta primeiramente por causa de sua habilidade em induzir a extensão da parede celular *in vitro* (MCQUEEN-MASON et al., 1992). A expressão de mRNAs e a atividade das expansinas são correlacionadas com o crescimento e/ou desordem da parede celular em várias plantas e tecidos. A relevância das expansinas no amaciamento de frutos foi demonstrada pelo uso de plantas transgênicas. A supressão de LeEXP1 constitutivo em tomates manteve os frutos mais firmes, enquanto que a superexpressão do gene causou maior amolecimento dos frutos, mesmo em fases não maduras do fruto (BRUMMELL et al., 1999). Além disso, variedades de pêssego que diferem em firmeza mostraram diferentes quantidades totais do mesmo mRNA de expansina em diferentes cultivares (HAYAMA et al., 2003).



**Figura 8.** Amplificações por PCR utilizando oligonucleotídeos para ExpPP1, dos cDNAs obtidos de RNAs totais (RT-PCR) para os quatro tratamentos (T1, T2, T3, T4) de pêssogo “Chiripá”. A – 0 dia após saída da câmara, B – 4 dias após saída da câmara; M – Marcador *100bp DNA Ladder*; P – controle positivo (18S); N – controle negativo.

Através dos géis de agarose (Fig. 8) foi possível verificar a expressão dos amplificados para expansina, em todos os tratamentos teve um aumento considerável da expressão dos mesmos do 0 ao 4º dia após saída do armazenamento a frio. Somente a amplificação do T4 apresenta uma banda de cDNA amplificado para expansina, mas com baixa intensidade no dia 0; nos outros tratamentos não é possível visualizar alguma amplificação neste período. No 4º dia depois da saída do armazenamento a frio, todas as amplificações de cDNAs de todos os tratamentos apresentaram uma expressão acentuada para expansina, com destaque para as amplificações de T2 que apresentou a maior concentração entre todos os tratamentos.

As expansinas não foram detectadas em pêssogos não maduros, mas foram detectadas no início e ao longo amadurecimento dos frutos, sugerindo a existência de um papel para a expansina no amolecimento de frutos (OBENLAND et al., 2003).

Hayama et al. (2003) em seu trabalho sobre a perda de firmeza em pêssogos, estudaram a expressão de três tipos diferentes de mRNAs para expansinas e constataram: que PpExp2 está mais ligado ao processo de expansão da célula; que a expressão de PpExp1 é insuficiente para mediar o amolecimento dos frutos; e que estudos mais elaborados associam PpExp3 ao amadurecimento dos frutos, vez que,

com o aumento de concentração de seu mRNA, houve decréscimo da firmeza em uma das cultivares de pêssegos estudada. Isso pode perfeitamente explicar o porquê de a expressão de mRNAs amplificados para expansina aumentarem do 0 dia até o 4º dia após a saída do armazenamento a frio. Ainda segundo os autores, os resultados sugerem que PpExp3 sozinho não consegue controlar a redução da firmeza dos frutos, mas outras enzimas, como a PG, podem agir cooperativamente com a expansina para diminuir a firmeza de pêssegos.

A análise da expressão da expansina demonstrou ser ela regulada pelo etileno (HAYAMA et al., 2000; ROSE et al. 1997). Muitos trabalhos têm mostrado a possível existência de ligação entre as atividades da PG e da PME e o desenvolvimento de lanosidade. Outros estudos têm mostrado uma relação entre a expansina e a lanosidade, indicando que PG e PME podem não ser as únicas proteínas envolvidas. Postula-se que a expansina esteja envolvida no controle da despolimerização de cadeias poliurônicas (BRUMMELL et al., 1999). Se isso for verdadeiro, é possível que uma redução no acúmulo de expansina na fruta possa influenciar o padrão da desordem, pela limitação (então imposta) da capacidade de PG em degradar pectina (OBERLAND et al., 2003).

Se o acúmulo precoce de um conjunto de expansinas enfraquece a interação entre diferentes componentes da parede celular (ROSE et al., 1997) ou se a ação indireta daquela facilita a ação das hidrolases da parede celular no desenrolar da maturação, pode-se emitir a hipótese de que a expansina participa no amaciamento do fruto (DOTTO et al., 2006).

Estudos prévios revelam que o amaciamento de frutos durante o armazenamento é um processo complexo, onde a ação de enzimas e de outras proteínas modifica a estrutura da parede celular e, conseqüentemente, a textura dos frutos, implicando no seu amaciamento (BILLY et al., 2008).

## 2.4. Conclusões

Com relação aos pêssegos do tratamento T1 (ar refrigerado – 0,5°C, durante quatro semanas), foi verificado que a expressão do gene da poligalacturonase diminuiu do 0 dia para o 4º dia após saída da câmara e que as expressões dos genes da pectinametilesterase e da expansina aumentaram neste mesmo período.

Com relação aos pêssegos do tratamento T2 (atmosfera controlada – 2,0 kPa O<sub>2</sub> e 8,0 kPa CO<sub>2</sub> durante 7 semanas a -0,5°C), foi constatado que a expressão do gene da poligalacturonase diminuiu levemente do 0 dia para o 4º dia após saída da câmara e que as expressões dos genes da pectinametilesterase e da expansina aumentaram no mesmo período.

Com relação aos pêssegos do tratamento T3 (atmosfera controlada – aplicação de 100 mg.L<sup>-1</sup> de etileno durante um dia, após o armazenamento), foi verificado que as expressões dos genes da poligalacturonase, da pectinametilesterase e da expansina aumentaram do 0 dia para o 4º dia após saída da câmara.

Com relação aos pêssegos do tratamento T4 (atmosfera controlada – aplicação de 1-MCP durante 24 horas antes do armazenamento), foi constatado que as expressões dos genes da poligalacturonase, da pectinametilesterase e da expansina aumentaram do 0 dia para o 4º dia após saída da câmara.

### 3. Referências bibliográficas

ABDI, N.; MCGLASSON, P.; MIZRAHI, W.B.; et al. Ripening behavior and responses to propylene in four cultivars of Japanese type plums. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.12, p.21-24, 1997.

ALEXANDER, L.; GRIERSON, D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.53, p.2039-2055, 2002.

ANTON, G.E.; SEKINE, Y.; WATANABE, N.; et al. Thermal inactivation of pectin methylesterase, poligalacturonase and peroxidase in tomato juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.50, p.6153-6159, 2002.

ANTUNES, L.E.C.; GONÇALVES, E.D.; TREVISAN, R. Alterações da atividade da poligalacturonase e pectinametilesterase em amora-preta (*Rubus spp.*) durante o armazenamento. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, v.12, n.1, p.63-66, 2006.

ASIF, M.H.; DHAWAN, P.; NATH, P. A sample procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. **Plant Molecular Biology Reporter**, Canada, v.18, p.109-115, 2000.

AYUB, R. et al. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. **Nature Biotechnology**, New York, v.14, p.862-866, 1996.

AZEVEDO, H.; LINO-NETO, T.; TAVARES, R.M. Na improved method for high-quality RNA isolation from needles of adult maritime pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, Canada, v.21, p.333-338, 2003.

BARRY, C.S. et al. Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. **Plant Journal**, Oxford, v.9, p.525-535, 1996.

BARRY, C.S.; LLOP-TOUS, M.I.; GRIERSON, D. The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v.123, p.979-986, 2000.

BEAUDRY, R.M. Effect of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> partial pressure on selected phenomena affecting fruit and vegetable quality. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.15, p.293-303, 1999.

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

BENNETT, A. Biochemical and genetic determinants of cell wall disassembly in ripening fruit: a general model. **HortScience**, Alexandria, v.37, p.447-450, 2002.

BLANKENSHIP, S.M.; DOLE, J.M. 1-Methylcyclopropene: a review. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.28, p.1-25, 2003.

BRAFORD, K.J.; YANG, S.F. Xylem Transport of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid, an Ethylene Precursor, in Waterlogged Tomato Plants. **Plant Physiology**, Rockville, 65: 322-326, 1980.

BRACKMANN, A. et al. Utilização da atmosfera controlada para o armazenamento de pêsegos 'Eldorado' colhidos em dois estádios de maturação. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v.30, n.2, p. 209-214, 2005.

BRACKMANN, A.; CHITARRA, A.B. **Atmosfera controlada e atmosfera modificada. In: Armazenamento e processamento de produtos agrícolas.** Lavras : UFLA/SBEA, 1998. p.133-170.

BRACKMANN, A.; STEFFENS, C.A.; GIEHL, R.F.H.R. Armazenamento de pêsego 'Chimarrita' em atmosfera controlada e sob absorção de etileno. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.3, p.431-435, 2003.

BRADY, C.J. Stone fruit. In: SEYMOUR, G.B.; TAYLOR, J.E.; TUCKER, G.A. **Biochemistry of fruit ripening.** London: Chapman & Hall, 1993, Cap.13, p.379-404.

BRUMMELL, D.A.; HARPSTER, M.; CIVELLO, P.M.; PALYS, J.M.; BENNETT, A.B. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. **Plant cell**, Rockville, v.11, p.2203-2216, 1999.

BRUMMELL, D.A.; HARPSTER, M. Cell wall metabolism in fruit softening and quality members during growth and ripening of tomato fruit. **Plant Molecular Biology**, New York, v.39, p.311-340, 2001.

BRUMMELL, D.A.; DAL CIN, V.; LURIE, S.; CRISOSTO, C.H.; LABAVITCH, J.M. Cell wall metabolism during the development of chilling injury in cold-storage peach fruit: association of mealiness with arrested disassembly of cell wall pectins. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.55, p.2041-2052, 2004.

BRUMMELL, D.A. Cell wall disassembly in ripening fruit. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v.33, p.103-119, 2006.

BURG, S.P.; BURG, E.A. Molecular requirements for the biological activity of ethylene. **Plant Physiology**, Rockville, v.42, p.144-152, 1967.

BILLY, L.; MEHINAGIC, E.; ROYER, G.; et al. Relationship between texture and pectin composition of two apple cultivars during storage. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.47, p.315-324, 2008.

CALLAHAN, A.M.; SCORZA, R.; BASSETT, C.; NICKERSON, M.; ABELES, F.B. Deletions in an endopolygalacturonase gene cluster correlate with non-melting flesh texture in peach. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v.31, p.159-168, 2004.

CANDAN, A.P.; GRAELL, J.; LARRIGAUDIÈRE, C. Roles of climacteric ethylene in the development of chilling injury in plums. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.47, p.107-112, 2008.

CARPITA, N.C.; GIBEAUT, D.M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**, Oxford, v.3, p.1-30, 1993.

CARPITA, N.C.; MCCANN, M. The functions of cell wall polysaccharides in composition and architecture revealed through mutations. **Plant Soil**, New York, 274, 71-80, 2002.

CERETA, M. **Qualidade do pêssego, cv. Eldorado, armazenado em atmosfera controlada**. 1999. 46p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, Canadá, v.11, p.113-116, 1993.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL/FAEPE, 1990. 320P.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Simple-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochemical** v.162, p.156-159, 1987.

CIVELLO, P.M. et al. An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. **Plant Physiology**, Rockville, v.121, p.1273-1279, 1999.

COSGROVE, D.J. Cell wall loosening by expansins. **Plant Physiology**, Rockville, v.118, p.333-339, 1998.

CRISOSTO, C.H. et al. Orchard factors affecting postharvest stone fruit quality. **HortScience**, Alexandria, v.32, p.820-823, 1997.

CRISOSTO, C.H. Stone fruit maturity indices: a descriptive review. **Postharvest News and Information**, Oxford, v.5, n.6, p.65-68, 1994.

CRISOSTO, C.H.; LABAVITCH, J.M. Developing a quantitative method to evaluate peach (*Prunus persica*) flesh mealiness. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.25, p.151-158, 2002.

CRISOSTO, C.H.; MITCHELL, F.G.; JU, Z. Susceptibility to chilling injury of peach, nectarine, and plum cultivars grown in California. **HortScience**, Alexandria, v.34, p.1116-1118, 1999.

DE WILD, H.P.J. et al. The action site of carbon dioxide in relation to inhibition of ethylene production in tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.36, p.273-280, 2005.

DE WILD, H.P.J.; WOLTERING, E.J.; PEPPELENBOS, H.W. Carbon dioxide and 1-MCP inhibit ethylene production and respiration of pear fruit by different mechanisms. **Journal Experimental of Botany**, Lancaster, v.50, n.335, p.837-844, 1999.

DELLA PENNA, D.; ALEXANDER, D.C.; BENNETT, A.B. Molecular cloning of tomato fruit polygalacturonase: analysis of polygalacturonase mRNA levels during ripening. **Proceedings of the National Academy Sciences USA**, Washington, v.83, p.6420-6424, 1986.

DONG, J.G.; FERNÁNDEZ-MACULET, J.C.; YANG, S.F. Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from apple fruit. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.89, p.9789-9793, 1992.

DONG, L. et al. Ethylene involvement in the cold storage disorder of 'Flavortop' nectarine. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.23, p.105-115, 2001.

DONG, L.; LURIE, S.; ZHOU, H.-W. Effect of 1-methylcyclopropene on ripening of 'Canino' apricots and 'Royal Zee' plums. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.24, n.1, p.135-145, 2002.

DOTTO, M.C.; MARTINEZ, G.A.; CIVELLO, P.M. Expression of expansin genes in strawberry varieties with contrasting fruit firmness. **Plant Molecular and Biology Reporter**, Amsterdam, v.44, p.301-307, 2006.

EVANGELISTA, R.M.; CHITARRA, A.B.; CHITARRA, M.I.F. Influência da aplicação pré-colheita de cálcio na textura e na atividade da enzima PG, PME e  $\beta$ -galactosidase de mangas 'Tommy Atkins' armazenadas sob refrigeração. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, p.174-181, 2000.

FAN, X.; ARGENTA, L.; MATTHEIS, J.P. Interactive effects of 1-MCP and temperature on 'Elberta' peach quality. **HortScience**, Alexandria, v.37, p. 134-138, 2002.

FAN, X.; BLANKENSHIP, S.M.; MATTHEIS, J.P. 1-methylcyclopropene inhibits apple ripening. **Journal American Society for Horticultural Science**, Stanford, v.124, p.690-695, 1999.

FENG, X. et al. Control of ethylene responses in avocado fruit with 1-aminocyclopropene. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam v.20, p.143-150, 2000.

FISCHER, R.L.; BENNETT, A.B. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Rockville, v.42, p.675-703, 1991.

GIOVANNONI, J. Molecular biology of fruit maturation and ripening. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Rockville, v.52, p.725-749, 2001.

GIRARDI, C. L.; CORRENT, A. R.; LUCCHETTA, L.; ZANUZO, M. R.; DA COSTA, T. S.; BRACKMANN, A. .; TWYMAN, R. M.; NORA, F. R.; NORA, L.; SILVA, J. A.; ROMBALDI, C. V. Effect of ethylene, intermittent warming and controlled atmosphere on postharvest quality and the occurrence of woolliness in peach (*Prunus persica* cv. 'Chiripa') during cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.38, p.25-33, 2005.

GORNY, J.R.; KADER, A.A. Regulation of ethylene biosynthesis in climacteric apple fruit by elevated CO<sub>2</sub> and reduced O<sub>2</sub> atmospheres. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.9, p.311-323, 1996.

HARRIMAN, R.W. et al. Molecular cloning of tomato pectin methylesterase gene and its expression in Rutgers, ripening inhibitor, non ripening, and Never Ripe tomato fruits. **Plant Physiology**, Rockville, v.97, p.80-87, 1991.

HAYAMA, H.; ITO, A.; MORIGUCHI, T.; KASHIMURA, Y. Identification of a new expansin gene closely associated with peach fruit softening. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.29, p.1-10, 2003.

HAYAMA, H.; SHIMADA, T.; FUJJI, H.; ITO, A.; KASHIMURA, Y. Ethylene-regulation of fruit softening-related genes in peach. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.57, n. 15, p. 4071-4077, 2006.

JARVIS, M.C. Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v.7, p.153-164, 1984.

KADER, A.A. Biochemical and physiological basis for the effect of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. **Food Technology**, Chicago, v.40, n.5, p.99-105, 1986.

KADER, A.A.; CHORDAS, A. Evaluating the browning potential of peaches. **California Agriculture**, California, v.38, n.1, p.14-15, 1984.

KE, D.; RODRIGUEZ-SINOBAS, L.; KADER, A.A. Physiology and prediction of fruit tolerance to low-oxygen atmospheres. **Journal American Society for Horticultural Science**, Stanford, v.116, n.2, p.253-260, 1991.

KENDE, H. Ethylene biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Rockville, v.44, p.238-307, 1993.

KERBEL, E.L.; KADER, A.A.; ROMANI, R.J. Effect of elevated CO<sub>2</sub> concentrations on glycolysis in intact 'Bartlett' pear fruit. **Plant Physiology**, Rockville, v.86, p.1205-1209, 1988.

KLUGE, R.A.; NACHTIGAL, J.C.; BILHALVA, A.B. **Fisiologia e manejo pós-colheita de frutas de clima temperado**. 2.ed. Pelotas: UFPel, 2002. 163p.

KOCH, J.L.; NEVINS, D.J. Tomato fruit cell wall. 1. Use of purified tomato polygalacturonase and pectinmethylesterase to identify developmental changes in pectins. **Plant Physiology**, Rockville, v.91, p.816-822, 1989.

LANA, M.M.; FINGER, F.L. **Atmosfera modificada e controlada. Aplicação na conservação de produtos hortícolas**. Brasília : Embrapa Hortaliças, 2000. 34p.

LELIÈVRE, J.-M. et al. Ethylene and fruit ripening. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.101, p.727-739, 1997.

LESTER, D.; SPEIRS, J.; ORR, G.; BRADY, C.J. Peach (*Prunus persica*) endopolygalacturonase cDNA isolation and mRNA analysis in melting and nonmelting peach cultivars. **Plant Physiology**, Rockville, v.105(1), p.225-231, 1999.

LIGUORI, G. et al. Effect of 1-methylcyclopropene on ripening of melting flesh peaches and nectarines. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.31, p.263-268, 2004.

LILL, R.E.; VAN DER MESPEL, G.J. A method for measuring the juice content of mealy nectarines. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.36, p.267-271, 1988.

LIU, H.; JIANG, W.; ZHOU, L.; et al. The effects of 1-methylcyclopropene on peach fruit (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) ripening and disease resistance. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 40, p.1-7, 2005.

LIU, S. et al. Effects of CO<sub>2</sub> on respiratory metabolism in ripening banana fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.33, n.1, p.27-34, 2004.

LIU, J.; GOH, C.; LOH, C.; LIU, P.; PUA, E. A method for isolation of total RNA from fruit tissues of banana. **Plant Molecular Biology Reporter**, Amsterdam, v.16, p.1-6, 1998.

LOGEMAN, J.; SCHELL, J.; WILLMIZER, L. Improved method for isolation of RNA from plant tissues. **Anal Biochemical**, v.163, p16-20, 1987.

LOOMINS, W.D. Overcoming problems of phenolics and quinines in the isolation of plant enzymes and organelles. **Methods Enzymology**, Cambridge, v.31, p. 528-545, 1974.

LURIE, S. Modified atmosphere storage of peaches and nectarines to reduce storage disorders. **Journal of Food Quality**, Oxford, v.16, p.56-65, 1993.

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

LUO, Z. Effect of 1-methylcyclopropene on ripening of postharvest persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruit. **LWT**, Amsterdam, v.40, p.285-291, 2007.

MANGANAI, G.A.; VASILAKAKIS, M.; DIAMANTIDIS, G.; MIGNANI, I. Cell wall cation composition and distribution in chilling-injured nectarine fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.37, p.72-80, 2005.

MATHOOKO, F.M. Regulation of respiratory metabolism in fruits and vegetables by carbon dioxide. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.9, p.247-264, 1996.

MCQUEEN-MASON, S.; DURACHKO, D.M.; COSGROVE, D.J. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. **Plant cell**, Lancaster, v.4, p.1425-1433, 1992.

MEDEIROS, C.A.B.; RASEIRA, M.C.B. **A cultura do pessegueiro**. Brasilia : EMBRAPA-SPI; Pelotas : EMBRAPA-CPACT, 1998. 251p.

MEISEL, L.; FONSECA, B.; GONZÁLEZ, S.; et al. A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus persica*) for functional genomics analyses. **Biology Research**, Glasgow, v. 38, p.83-88, 2005.

MEREDITH, I.I.; ROBERTSON, A.J.; HORVAT, R. Changes in physical and chemical parameters associated with quality and postharvest ripening of harvested peaches. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.37, p.1210-1214, 1989.

NAM, Y.; TICHIT, L.; LEPELIER, M.; CUERQ, B.; MARTY, I.; LELIÈVRE, J. Isolation and characterization of mRNAs differentially expressed during ripening of wild strawberry (*Fragaria vesca* L.) fruits. **Plant Molecular Biology**, Amsterdam, v.39, p. 629-636, 1999.

NAVA, G.A.; BRACKMANN, A. Armazenamento de pêssegos (*Prunus persica* (L.) Batsch), cv. Chiripá, em atmosfera controlada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.2, p.328-332, 2002.

OBENLAND, D.M.; CRISOSTO, C.H.; ROSE, J.K.C. Expansin protein levels decline with the development of mealiness in peaches. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.29, n.1, p.11-18, 2003.

ORR, G.; BRANDY, C. Relationship of endopolygalacturonase activity to fruit softening in a freestone peach. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.3, p.121-130, 1993.

- PERRIN, R.; WILKERSON, C.; KEEGSTRA, K. Golgi enzymes that synthesize plant cell wall polysaccharides: finding and evaluating candidates in the genomic era. **Plant Molecular Biology**, Amsterdam, v.47, p.115-130, 2001.
- PICTON, S. et al. Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene. **Plant Journal**, New York, v.3, p.469-481, 1993.
- PRESSEY, R.; AVANTS, J.K. Separation and characterization of endopolygalacturonase and exopolygalacturonase from peaches. **Plant Physiology**, Lancaster, v.52, p.252-256, 1973.
- ROMBALDI, C.V., SILVA, J.A., MACHADO, L.B., PARUSSOLO, A., LUCCHETTA, L., ZANUZO, M.R., GIRARDI, C.L., CANTILLANO, R.F. Storage of 'Chiripa' peach in controlled atmosphere. **Cientifica Rural**, Bagé, v.31, p.43-47, 2002.
- ROSE, J.; LEE, H.; BENNETT, A. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.94, p.5955-5960, 1997.
- SALENTIJN, E.M.J.; AHARONI, A.; SCHAART, J.G.; BOONE, M.J.; KRENS, F.A. Differential gene expression analysis of strawberry cultivars that differ in fruit-firmness. **Plant Physiology**, Stanford, v.118, p.571-578, 2003.
- SALZMAN, R.A.; FUJITA, T.; ZHU-SALZMAN, K.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. **Plant Molecular Biology Reporter**, Canada, v.17, p. 11-17, 1999.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, 1989.
- SEREK, M.; SISLER, E.C.; DUNCAN, C.D. Novel gaseous ethylene binding inhibitor prevents ethylene effects in potted flowering plants. **Journal American Society for Horticulture Science**, Stanford, v.119, p. 1230-1233, 1994.
- SILVA, J.A. et al. Characterization of ripening behavior in transgenic melons expressing an antisense 1-aminocyclopropene-1-carboxylate (ACC) oxidase gene from apple. **Postharvest Biology Technology**, Amsterdam, v.32, p.263-268, 2004.
- SISLER, E.C.; SEREK, M. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: recent developments. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.100, p.577-582, 1997.
- SITRIT, Y.; BENNETT, A.B. Regulation of tomato fruit polygalacturonase mRNA accumulation by ethylene: a re-examination. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 116, p. 1145-1150, 1998.

STEFFENS, C.A. et al. Escurecimento da polpa e respiração de pêsegos em função das condições de armazenamento. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.12, n.1, p.71-75, 2006.

STEPANOVA, A.N.; ECKER, J.R. Ethylene signaling: from mutants to molecules. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.3, p.353-360, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal** – 3<sup>o</sup> ed. – Porto Alegre: Artmed, 2006. 719 p.

TAO, N.; CHENG, Y.; XU, J.; XU, Q.; DENG, X. An effective protocol for the isolation of RNA from the pulp of ripening citrus fruits. **Plant Molecular Biology Reporter**, Canada, v.22, p.305a-305f, 2004.

TAYLOR, M.A.; RABE, E.; GOOD, M.C. Effect of storage regimes on pectolytic enzymes, pectic substances, internal conductivity and gel breakdown in cold storage of sungold plums. **Journal Horticultural Science**, Warwick, v.69, p.527-534, 1994.

THOMPSON, J.E.; FRY, S.C. Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. **Planta**, Berlin, v.211, p.275-286, 2000.

TONUTTI, P.; BONGHI, C.; VIDRICH, R. Molecular and biochemical effects of anoxia, hypoxia and CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere on springcrest peaches. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.2, n.465, p.439-446, 1998.

TRAINOTTI, L.; ZANIN, D.; CASADORO, G. A cell wall-oriented genomic approach reveals a new and unexpected complexity of the softening in peaches. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.54, n.389, p.1821-1832, 2003.

VALERO, D. Polyamines, ethylene, and physicochemical changes in low-temperature-stored peach (*Prunus persica* L. Cv. Maycrest). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.45, p.3406-3410, 1997.

VILLARREAL, N.M.; ROSLI, H.G.; MARTÍNEZ, G.A.; CIVELLO, P.M. Polygalacturonase activity and expression of related genes during ripening of strawberry cultivars with contrasting fruit firmness. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 47, p. 141-150, 2008.

VON MOLLENDORFF, L.J., de et al. Molecular characteristics of pectic constituents in relation to firmness, extractable juice and woolliness in nectarines. **Journal American Society for Horticultural Science**, Stanford, v.118, p.77-80, 1993.

WILLATS, W.G.T. et al. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Molecular Biology**, New York, v.47, p.9-27, 2001.

WILKINS, W.D.; SMART, L.W. **Isolation of RNA from plant tissue**. In: KRIEG PA. A laboratory guide to RNA: isolation, analysis and synthesis, p. 21-42, Wiley-Liss, New York, 1996.

YANG, S.F.; HOFFMAN, N.E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Rockville, v.35, p.155-189, 1984.

ZANUZO, M.R. **Etileno na transcrição de poligalacturonases em melões transformados geneticamente com o clone pAP4 antisense**. 2004. 53p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindústria, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

ZHAN, D.; JANSSEN, P.; MORT, A.J. Scarcity or complete lack of single rhamnose residues interspersed within the homogalacturonan regions of citrus pectin. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.308, p.373-380, 1998.

ZHOU, H.W.; BEN-ARIE, R.; LURIE, S. Pectin esterase, polygalacturonase and gel formation in peach pectin fractions. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.55, p.191–195, 2000a.

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

ZHOU, H.W.; DONG, L.; BEN-ARIE, R.; LURIE, S. The role of ethylene in the prevention of chilling injury in nectarines. **Journal Plant Physiology**, Amsterdam, v.158, p.55–61, 2001.