

## Área: Ciência de Alimentos

# EXPRESSÃO TRANSCRICIONAL DE GENES CODIFICADORES DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM TOMATE TRATADO COM RADIAÇÃO UV-C

Gustavo Zimmer\*, Aline Tiecher, Fábio Clasen Chaves, Cristiane Mariliz Stöcker, Ícaro Borges Tavares, Leticia Winke Dias, Cesar Valmor Rombaldi

*Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Curso de Agronomia, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas*

*\*E-mail: gstzimmer@hotmail.com*

## RESUMO

O uso de radiação UV-C pode resultar em respostas benéficas no que concerne à síntese de compostos bioativos em frutos, além de ativar o sistema antioxidante capaz de proteger as células da ação citotóxica de espécies reativas de oxigênio. Neste contexto, foi avaliado o efeito causado pela aplicação de radiação UV-C na intensidade de 3,7 KJ/m<sup>2</sup> em frutos de tomate cv. Flavortop sobre a expressão transcricional de genes relacionados com enzimas antioxidantes. Observou-se que os genes que codificam para as enzimas envolvidas com o sistema antioxidante apresentaram acúmulo de transcritos inicialmente no epicarpo e posteriormente no mesocarpo dos frutos submetidos à radiação UV-C. Desse modo, conclui-se que as respostas moleculares à aplicação da radiação UV-C iniciam no epicarpo e, em seguida, ocorrem no mesocarpo. Isso se deve, provavelmente, ao fato de que a radiação UV-C tem baixo poder de penetração.

**Palavras-chave:** sistema antioxidante, espécies reativas de oxigênio, transcritos.

## 1 INTRODUÇÃO

Como é amplamente conhecido, frutos submetidos a situações de estresse térmico, salino e/ou hídrico moderado, ataque por patógenos e/ou radiação ultravioleta-C (UV-C), podem desenvolver mecanismos de defesa como a síntese de metabólitos antioxidantes, redutores de espécies reativas de oxigênio (ROS) e/ou a ativação da síntese de enzimas antioxidantes que regulam o metabolismo celular. Dentre essas enzimas, as principais são

superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), deidroascorbato redutase (DHAR), glutathione redutase (GR) e monodeidroascorbato redutase (MDHAR) (Foyer et al. 1994). Desse modo, além da ação de desinfecção, a radiação UV-C pode resultar em alterações na expressão gênica e no metabolismo dos frutos.

Frente ao exposto, acredita-se que a radiação UV-C, aplicada em tomate, possa atuar na indução de resistência às podridões, pelo incremento de compostos bioativos e pela indução de enzimas antioxidantes (Barka, 2001; Charles et al., 2008; Liu et al, 2009). Dessa forma, no presente trabalho se teve como objetivo avaliar o acúmulo de transcritos correspondentes a enzimas antioxidantes no epicarpo e no mesocarpo de frutos de tomate frente à ação da radiação UV-C, partindo-se da hipótese de que a radiação UV-C atua na indução de mecanismos de defesa do fruto, ativando enzimas antioxidantes.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 MATERIAL E MÉTODOS

Tomates (*Solanum lycopersicum* Mill.) cultivar Flavortop produzidos através de sistema hidropônico em casas de vegetação no Campus do Capão do Leão da UFPel, foram coletados quando sua coloração apresentava os primeiros sinais de pigmentação amarelada na porção distal do fruto. Imediatamente após a colheita, os frutos foram submetidos à radiação UV-C. Para isso utilizou-se um equipamento com quatro lâmpadas germicidas (*Phillips*<sup>®</sup> 30W), as quais ficaram a distância de 60 cm dos frutos. A intensidade da radiação emitida foi determinada com um medidor de luz ultravioleta digital (RS-232 Modelo MRUR-203, *Instrutherm*). Os frutos foram expostos a uma dose de 3,7 kJ m<sup>-2</sup> por 16 minutos, sendo que a cada quatro minutos os tomates foram trocados de posição para que os frutos recebessem a radiação de forma uniforme em toda superfície. Depois de tratados, os frutos foram acondicionados em bandejas plásticas e mantidos no escuro em temperatura de 20-22°C por sete dias.

A extração de RNAs totais foi realizada utilizando o reagente *Concert*<sup>™</sup> (*Plant RNA Reagent*) seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, as amostras de RNAs foram submetidas à separação por eletroforese em gel de agarose (1% m/v), onde se verificou

a presença e a integridade das bandas de RNAs ribossomais. Com o objetivo de eliminar DNA genômico residual nas amostras de RNAs, foi realizada digestão com DNase e realizou-se reação de PCR para confirmar a eliminação de DNA residual. Após a digestão, as amostras foram submetidas à síntese de cDNAs, com o uso do kit comercial *SuperScript™ First-Strand System for RT-PCR (Invitrogen®)*. A partir dos cDNAs realizaram-se reações de *Real-time PCR*, utilizando os *primers* específicos, apresentados na Tabela 1. Utilizou-se o sistema *SYBR® Green (Applied Biosystems®)* e aparelho ABI 7500 (*Applied Biosystems®*). Cada reação foi feita em triplicata utilizando placas com capacidade de 96 reações. A expressão relativa (R) dos genes em estudo foi calculada baseada na eficiência (E) e no valor do Ct (*threshold cycle*) da amostra descontando-se o nível transcricional do gene controle 18S (Pfaffl, 2001). Equações:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})}$$

$$R = \frac{(E_{alvo})^{\Delta CT_{alvo}(\text{controle-amostra})}}{(E_{ref})^{\Delta CT_{ref}(\text{controle-amostra})}}$$

Os dados foram analisados através de ferramentas do programa *Mult Experiment Viewer (MeV)*, *EASE Expression Analysis Systematic Explorer* versão 4.6 e apresentados em forma de diagramas de cor.

**Tabela 1.** *Primers* específicos usados para Real-time PCR.

Gene*	Acesso	Forward	Reverse
APX	SGN-U578449	TGGACCGCCAATCCCCTTA	GGCATCTTCATCCGCAGCAT
CAT	SGN-U578839	GCCACGCGACCAAGGATCTT	CCTCGGGGTCCATTGTTTTGG
SOD	SGN-U581590	AGGCCGTCGCCGTCCTTA	CCAAGGGCATGGACATGGAA
18S	GI 18448	TGTGAAACTGCGAATGGCTCATTA	AAGTCGGGATTTGTTGCACGTATT

\*APX: ascorbato peroxidase; CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase.

## 2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao se avaliar o acúmulo de transcritos de genes que codificam para as enzimas antioxidantes nenhuma variação significativa foi observada nos frutos controle (Figuras 1 e 2). Quando se aplicou radiação UV-C verificou-se que, 24h após o tratamento, ocorreu maior acúmulo de transcritos no epicarpo dos frutos (Figura 1). No mesocarpo, por sua vez, o maior acúmulo de mRNAs de genes que codificam para enzimas antioxidantes ocorreu no sétimo dia após aplicação de UV-C (Figura 2). Isto pode ser explicado pelo fato de a radiação UV-C ter pouco poder de penetração, agindo mais superficialmente, acarretando inicialmente maior expressão no epicarpo e, na sequência, no mesocarpo. Esse comportamento biológico sugere que a radiação UV-C age inicialmente nas camadas celulares superficiais e, em seguida, transmite o sinal para o mesocarpo do tomate. O mecanismo de como isso ocorre não foi estudado, mas lança-se a hipótese de que possa ocorrer a partir da sinalização por peróxidos gerados pela ação do UV-C.

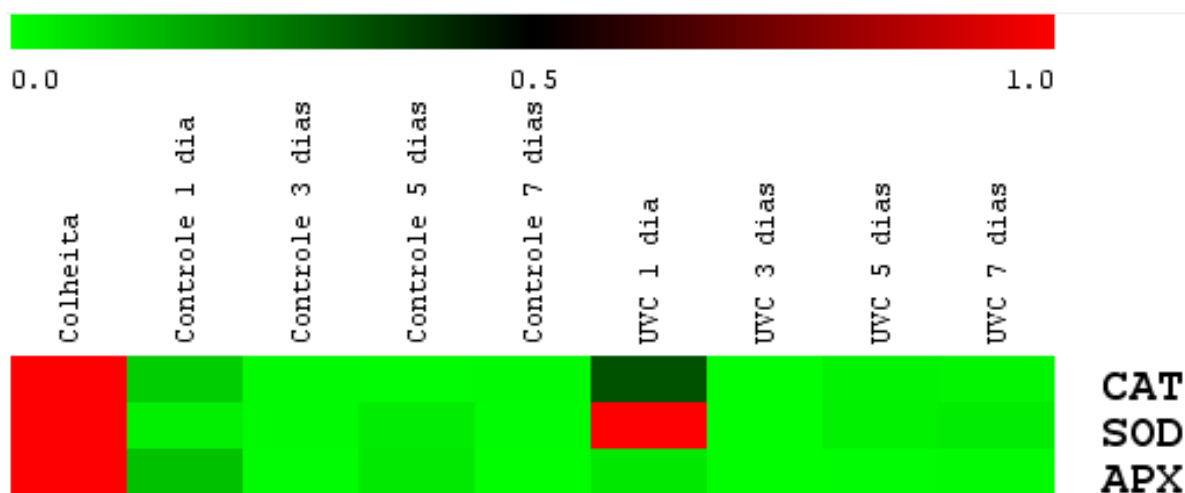


Figura 1. Expressão relativa de enzimas antioxidantes no epicarpo de tomate.

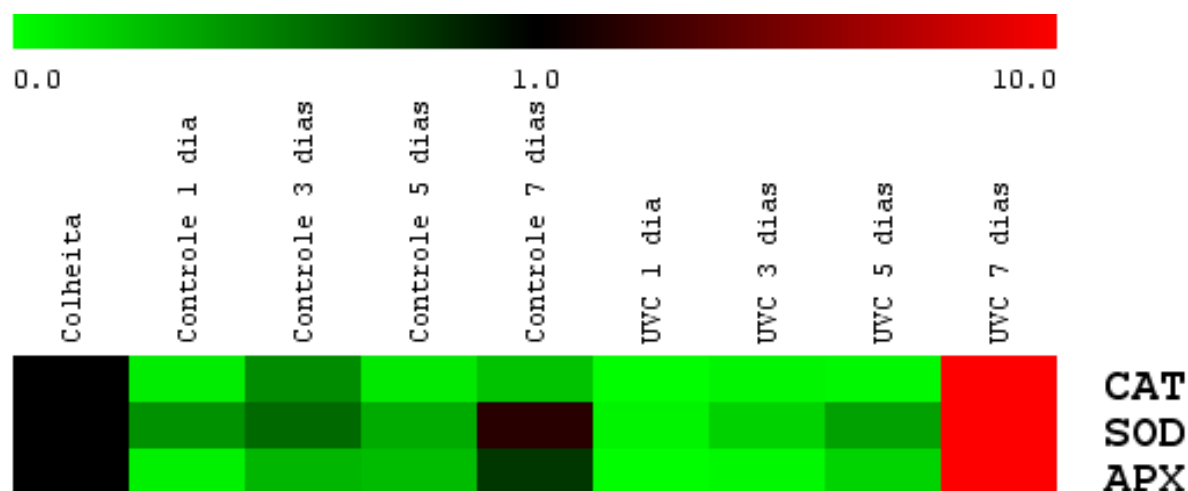


Figura 2. Expressão relativa de enzimas antioxidantes no mesocarpo de tomate.

### 3 CONCLUSÃO

As respostas transcricionais à aplicação de radiação UV-C ocorreram inicialmente no epicarpo e em seguida o mesocarpo, indicando que trata-se de um tratamento com efeito sistêmico.

### 4 AGRADECIMENTOS

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

### REFERÊNCIAS

B BARKA, E. A.; KALANTARI, S.; AKHLOUF, J.; ARUL, J. Impact of UV-C irradiation on the cell wall-degrading enzymes on ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 667-671, 2000.

CHARLES, M. T.; BENHAMOU, N.; ARUL, J. Physiological basis of UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit III. Ultrastructural modifications and their impact on fungal colonization. *Postharvest Biology and Technology*, v. 47 p. 27-40, 2008.

FOYER, C.; LEIANDAI, M.; KUNERT, K. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*, v. 92, p. 696-717, 1994.

LIU, L. H.; ZABARAS, D.; BENNETT, L. E.; AGUAS, P.; WOONTON, B. W. Effects of UV-C, red light and sun light on the carotenoid content and physical qualities of tomatoes during post-harvest storage. *Food Chemistry*, v. 115, p. 495-500, 2009.

PFAFFL, M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 29, p. 2002-2007, 2001.