UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Análise da expressão gênica durante o amadurecimento do mamão
papaia e identificação de genes relacionados com a qualidade pós-
colheita do fruto

João Paulo Fabi

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. João Roberto Oliveira do
Nascimento

São Paulo
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Análise da expressão gênica durante o amadurecimento do mamão
papaia e identificação de genes relacionados com a qualidade pós-
colheita do fruto

João Paulo Fabi

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. João Roberto Oliveira do
Nascimento

São Paulo
2007

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

F118a	<p>Fabi, João Paulo</p> <p>Análise da expressão gênica durante o amadurecimento do mamão papaia e identificação de genes relacionados com a qualidade pós-colheita do fruto / João Paulo Fabi. -- São Paulo, 2007. 191p.</p> <p>Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental Orientador: Nascimento, João Roberto Oliveira do</p> <p>1. Bromatologia. 2. Carica papaya : Bioquímica dos alimentos. 3. Expressão gênica. I. T. II. Nascimento, João Roberto Oliveira do, orientador.</p> <p>641 CDD</p>
-------	--

RESUMO

Durante o amadurecimento ocorrem profundas alterações na composição química dos frutos e a expressão gênica desempenha papel fundamental no controle desse processo. Apesar da importância comercial do mamão, as informações a respeito da expressão gênica durante o amadurecimento são limitadas. Assim, nessa tese, técnicas de estabelecimento de perfis de RNA mensageiro, como *Differential Display-PCR*, *cDNA-AFLP* e *Cross-Species Microarray*, foram aplicadas para a identificação de genes com expressão alterada. Alguns genes ligados ao metabolismo e transporte de açúcares, de lipídeos e carotenóides, à degradação de parede celular e *stress*, e fatores de transcrição dependentes e independentes de hormônios vegetais pareceram apresentar diferenças de expressão durante o amadurecimento do mamão papaia. O isolamento dos genes diferencialmente expressos permitiu traçar um panorama da expressão gênica do fruto e, dessa maneira, a relação das funções dos genes com o amadurecimento do mamão contribuiu para o aumento do entendimento acerca da qualidade pós-colheita do fruto.

Palavras-chave: Amadurecimento de frutos. Expressão gênica. Mamão papaia. Qualidade pós-colheita. Biologia molecular.

ABSTRACT

Ripening affects the quality of fleshy fruits by changing the chemical composition, and gene expression regulates most part of these transformations. Although papaya fruit is an important Brazilian crop, there are restricted studies concerning its ripening and gene expression. In this work, it is described the use of some RNA profiling techniques, such as Differential Display-PCR, cDNA-AFLP and Cross-Species Microarray, to identify ripening-related genes in papaya fruit. Using these techniques, some differentially expressed genes during papaya fruit ripening were isolated. Their functions were associated with metabolism and transport of sugars, lipids and carotenoids, cell wall disassembly, stress and transcription factors dependent and independent of plant hormones. In this way, it was proposed a pattern of gene expression during papaya fruit ripening, at least for those isolated genes, and the assemblage of these data with other authors' data can locate fruit handling to a better level, minimizing postharvest losses and increasing papaya fruit shelf-life.

Key-words: Fruit ripening. Gene expression. Papaya fruit. Postharvest quality. Molecular biology.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, fonte de inspiração eterna, guia na busca por novos reptos e Pai encorajador do Amor e da fé.

À Jesus Cristo, antes de tudo um grande líder, e acima de tudo, um exemplo a ser seguido. Amor, humildade, fé e respeito: atributos necessários para a convivência pacífica dos seres humanos.

Aos meus pais, entidade de iluminação divina e eternos ídolos, muito obrigado pelos exemplos gerados e pelos castigos aplicados.

Aos meus irmãos, três pessoas iluminadas, cada qual com sua personalidade as quais me aperfeiçoaram em todos esses anos de convivência.

Aos meus avôs e avós, batalhadores de tempos difíceis, que carregando e perpetuando os sentimentos de amor e humildade, tão escassos na vida moderna, concretizaram a criação de uma família crédula e coesa.

A minha namorada, Juliana. Nobre em sentimento. Biosa no relacionamento.

A toda minha família.

À FAPESP, instituição que financiou a minha bolsa de doutorado (processo de número 03/00932-9) e o projeto temático ao qual meu projeto de doutorado esteve vinculado (processo número 02/12452-9).

Ao Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento, meu orientador na essência da palavra, ensinando-me um espírito científico e empreendedor culminando por agora na ostentação de uma virtude que poucos têm: o foco.

À Prof. Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi, pelos ensinamentos claros e intensos por ela transmitidos e por mim adquiridos, os quais em um reduzido espaço de tempo altearam o meu esforço.

Ao Prof. Dr. Graham B. Seymour, que cumpriu com a sua parte no acordo do trabalho em conjunto com a Universidade de Nottingham, ensinando-me um estilo peculiar de se pesquisar novos assuntos.

Ao Prof. Dr. Eduardo Purgatto, pelo seu entusiasmo e paciência em lecionar que a existência laboratorial apenas é plausível doravante o trabalho em conjunto dos pesquisadores.

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio Gioielli e ao Dr. Chiu Ming, ambos do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutico (FCF-USP), por gentilmente permitirem a utilização do texturômetro.

Aos técnicos do laboratório, Tânia, Lúcia, Márcia e Marcelo, não só pela ajuda laboratorial, mas pelos momentos de descontração e amizade.

Aos estagiários de iniciação científica, Grazi, Alê e Luana, que tiveram os seus projetos vinculados ao projeto de doutorado e, por conseguinte, ajudaram-me em diversas ocasiões. Obrigado pela ajuda e pela amizade, e eu espero que os meus ensinamentos lhes sirvam em um futuro bem próximo.

Aos colegas de laboratório, todos os que já trabalharam, se encontram trabalhando e ainda emanarão no trabalho. Obrigado pelas discussões, amizades, dicas e situações inesperadas aplicados a todo o momento. Peço-lhes que vinculem esse espírito aos novos membros, acreditando e aprendendo com os orientadores e com os resultados já alcançados pelo laboratório.

A todos os meus amigos que acreditaram no meu sonho da vida acadêmica, muito obrigado pelo apoio.

Aos meus colegas de faculdade, pela amizade e pelos jogos, triunfos e ossos escavacados no *rugby*, pelos folguedos e fanfarras durante a graduação, muito foi aprendido, muito será lecionado.

A todos os meus amigos que não acreditaram no meu sonho, fiquem tranquilos, pois ainda os considero meus amigos.

E, por fim, a todos os meus inimigos. Pressintam a oração diária que fundo a vocês. A minha clemência está afiançada eternamente. As suas contas não serão julgadas junto a mim, e sim junto ao Pai.

OBJETIVOS

Os objetivos da presente tese foram o isolamento e a identificação de genes com expressão alterada durante o amadurecimento do mamão papaia (*Carica papaya*) visando o estabelecimento da relação entre a função dos genes isolados com a alteração da qualidade pós-colheita do fruto.

SUMÁRIO

ORGANIZAÇÃO DOS CAPÍTULOS.....	1
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1. Amadurecimento de frutos.....	3
1.2. O amadurecimento e os hormônios vegetais.....	4
1.3. Importância do etileno no amadurecimento dos frutos.....	5
1.4. Expressão gênica e amadurecimento.....	8
1.5. Mamão papaia.....	12
1.6. Bioquímica estrutural da polpa do mamão.....	13
1.7. Estudos sobre o mamão.....	16
1.8. REFERÊNCIAS.....	18
CAPÍTULO 2. AMADURECIMENTO DO MAMÃO PAPAIA: RESPOSTA AO ETILENO E 1-MCP.....	24
2.1. RESUMO.....	24
2.2. INTRODUÇÃO.....	25
2.3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
<i>Frutos.....</i>	26
<i>Amostragem I.....</i>	27
<i>Amostragem II.....</i>	27
<i>Tratamento dos frutos com etileno.....</i>	28
<i>Tratamento dos frutos com 1-MCP.....</i>	28
<i>Medidas de respiração e etileno.....</i>	29
<i>Medida da firmeza da polpa.....</i>	29
<i>Medida dos açúcares solúveis.....</i>	30
2.4. RESULTADOS.....	30
<i>Frutos.....</i>	30
<i>Amostragem I.....</i>	31
<i>Amostragem II.....</i>	33
2.5. DISCUSSÃO.....	37
<i>Amostragem I.....</i>	37
<i>Amostragem II.....</i>	39
2.6. CONCLUSÃO.....	41
2.7. AGRADECIMENTOS.....	42
2.8. REFERÊNCIAS.....	42
CAPÍTULO 3. ANÁLISE DIFERENCIAL DA EXPRESSÃO GÊNICA DURANTE O AMADURECIMENTO DO MAMÃO PAPAIA UTILIZANDO DIFFERENTIAL DISPLAY-PCR.....	44
3.1. RESUMO.....	44
3.2. INTRODUÇÃO.....	45
3.3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
<i>Amostras.....</i>	46

<i>Primers</i>	47
<i>Extração de RNA total</i>	47
<i>Quantificação de ácidos nucleicos</i>	48
<i>Análise da qualidade e integridade de ácidos nucleicos</i>	48
<i>Síntese do cDNA fita simples</i>	49
<i>Amplificação seletiva dos genes</i>	49
<i>Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida</i>	49
<i>Isolamento e reamplificação das bandas diferencialmente expressas...</i>	50
<i>Northern Blot Reverso</i>	51
<i>Clonagem</i>	53
<i>Seqüenciamento</i>	54
<i>Análise das seqüências</i>	54
3.4. RESULTADOS	55
3.5. DISCUSSÃO	61
3.6. CONCLUSÃO	65
3.7. REFERÊNCIAS	66

CAPÍTULO 4. ANÁLISE DIFERENCIAL DA EXPRESSÃO GÊNICA DURANTE O AMADURECIMENTO DO MAMÃO PAPAIA UTILIZANDO cDNA-AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM.....

4.1. RESUMO	69
4.2. INTRODUÇÃO	70
4.3. MATERIAIS E MÉTODOS	71
<i>Amostras</i>	71
<i>Primers</i>	72
<i>Extração de RNA total</i>	73
<i>Purificação do RNA mensageiro</i>	73
<i>Quantificação de ácidos nucleicos</i>	73
<i>Análise da qualidade e integridade de ácidos nucleicos</i>	74
<i>Síntese do cDNA fita simples</i>	74
<i>Otimização do método de síntese de cDNA fita simples</i>	74
<i>Síntese do cDNA fita dupla</i>	75
<i>Otimização do método de síntese de cDNA fita dupla</i>	76
<i>Digestão do cDNA fita dupla com enzimas de restrição</i>	76
<i>Preparação e ligação dos adaptadores</i>	77
<i>Otimização e execução da pré-amplificação</i>	78
<i>Marcação radioativa dos primers e reação de PCR</i>	78
<i>Otimização da amplificação seletiva quanto ao uso do cDNA ligado aos adaptadores</i>	79
<i>Otimização da amplificação seletiva quanto ao uso das reações de pré-amplificação</i>	79
<i>Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida</i>	79
<i>Isolamento e reamplificação das bandas diferencialmente expressas...</i>	80
<i>Clonagem</i>	80
<i>Seqüenciamento e análise das seqüências</i>	81
4.4. RESULTADOS	81
<i>Pré-amplificação</i>	81
<i>Amplificação seletiva</i>	82
4.5. DISCUSSÃO	85

4.6. CONCLUSÃO	99
4.7. AGRADECIMENTOS	100
4.8. REFERÊNCIAS	100
CAPÍTULO 5. ANÁLISE DIFERENCIAL DA EXPRESSÃO GÊNICA DURANTE O AMADURECIMENTO DO MAMÃO PAPAIA UTILIZANDO CROSS-SPECIES MICROARRAY	106
5.1. RESUMO	106
5.2. INTRODUÇÃO	107
5.3. MATERIAIS E MÉTODOS	109
<i>Amostras</i>	109
<i>Extração do DNA genômico e do RNA total</i>	109
<i>Quantificação e análise da qualidade de ácidos nucleicos</i>	109
<i>Hibridização com DNA genômico</i>	110
<i>Síntese dos cRNAs e hibridização com o chip</i>	111
<i>Análise dos dados</i>	112
5.4. RESULTADOS	113
<i>Integridade dos RNAs</i>	113
<i>Hibridização do DNA e dos cRNAs com o chip ATH1-121501</i>	115
5.5. DISCUSSÃO	120
5.6. CONCLUSÃO	123
5.7. AGRADECIMENTOS	123
5.8. REFERÊNCIAS	124
CAPÍTULO 6. CLONAGEM DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO DO TIPO MADS-BOX DE MAMÃO PAPAIA	125
6.1. RESUMO	125
6.2. INTRODUÇÃO	126
6.3. MATERIAIS E MÉTODOS	128
<i>Amostras</i>	128
<i>Primers</i>	129
<i>Extração de RNA total e de DNA genômico</i>	130
<i>Quantificação e análise da qualidade de ácidos nucleicos</i>	130
<i>Síntese do DNA complementar (cDNA) simples fita</i>	131
<i>Análise de genes ortólogos aos fatores de transcrição LeSPL-CNR, LaMADS-RIN, TAGL1 e TDR4 de tomate</i>	131
<i>Purificação e clonagem dos fragmentos</i>	132
<i>Seqüenciamento e análise das seqüências</i>	133
<i>Isolamento da seqüência parcial de cDNA por RACE</i>	134
<i>Análise da expressão gênica por PCR quantitativo (qPCR)</i>	134
6.4. RESULTADOS	136
<i>Gene SQUAMOSA PROMOTER BINDING de mamão papaia (CpSPL)</i>	136
<i>Ensaio para o isolamento de um gene ortólogo ao gene LeMADS-RIN de tomate</i>	137
<i>Gene AGAMOUS-LIKE 1 de mamão papaia (PAGL1)</i>	138
<i>Gene APETALA 1 de mamão papaia (PAP1)</i>	142
6.5. DISCUSSÃO	144
<i>CpSPL</i>	144

<i>LeMADS-RIN</i>	147
<i>PAGL1</i>	148
<i>PAP1</i>	151
6.6. CONCLUSÃO	153
6.7. AGRADECIMENTOS	153
6.8. REFERÊNCIAS	153
 CAPÍTULO 7. ATIVIDADE E EXPRESSÃO DA ENZIMA ENDOPOLIGALACTURONASE DURANTE O AMADURECIMENTO DO MAMÃO PAPAIA	
7.1. RESUMO	157
7.2. INTRODUÇÃO	158
7.3. MATERIAIS E MÉTODOS	159
<i>Amostras e firmeza da polpa</i>	159
<i>Medida da atividade da poligalacturonase</i>	159
<i>Northern Bloitting</i>	160
<i>Isolamento da seqüência completa de cDNA da endo-PG</i>	163
7.4. RESULTADOS	163
<i>Medida da atividade da endo-PG</i>	163
<i>Northern Blotting</i>	164
<i>Isolamento da seqüência completa de cDNA da endo-PG (CpPG)</i>	166
7.5. DISCUSSÃO	170
<i>Relação da atividade e transcrição da endo-PG com a queda da textura</i>	170
<i>Seqüência completa de cDNA da endo-PG de mamão papaia</i>	171
7.6. CONCLUSÃO	174
7.7. AGRADECIMENTOS	175
7.8. REFERÊNCIAS	175
 CAPÍTULO 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	
APÊNDICE	182

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via da biossíntese do etileno e do ciclo de recuperação da metionina. ACC, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico; Ade, adenina; AdoMet, s-adenosil-L-metionina; KMB, ácido 2-ceto-4-metiltiobutírico; Met, L-metionina; MTA, 5'-metiltioadenosina; MTR, 5'-metiltioribose; MTR-1-P, 5'-metiltioribose-1-fosfato. Modificado de Bleeker e Kende (2000).....7

Figura 2. Modelo de parede celular primária do tipo I de mamão papaia. A parede celular primária é composta pela fase microfibrilar (composta por celulose, xiloglicanos e suas ligações entre si do tipo “cross-link”) formando um forte entrançado imerso em uma matriz péctica (composta por vários tipos de pectinas também existentes na lamela média). Modelo proposto por Carpita e Gibeaut (1993).....15

Figura 3. Efeito do tratamento com etileno no amadurecimento do mamão papaia. Amostras de frutos não-tratados (CONTROLE, □) e tratados com etileno (ETILENO, ○) tiveram o amadurecimento acompanhado pelas medidas dos seguintes parâmetros: Quantidade de CO₂ produzido pelo fruto medido por cromatografia gasosa com detector de condutividade térmica (CO₂ mg Kg⁻¹ h⁻¹); Etileno produzido pelo fruto medido por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (Etileno µL Kg⁻¹ h⁻¹); Textura da polpa avaliada com texturômetro (N cm⁻²). As linhas tracejadas verticais indicam o fim do período tratamento com etileno (12 horas). D.P.C.:Dias Pós-Colheita. As barras verticais representam o erro padrão das medidas (n=4).....32

Figura 4: Efeito do tratamento com etileno e com 1-MCP no amadurecimento do mamão papaia. Amostras de frutos dos grupos controle (CONTROLE, □), tratados com etileno (ETILENO, ○) e tratados com 1-MCP (1-MCP, △) tiveram o amadurecimento acompanhado pelas medidas dos seguintes parâmetros: Quantidade de CO₂ produzido pelos frutos medido por cromatografia gasosa com detector de condutividade térmica (de CO₂ mg Kg⁻¹ h⁻¹); Quantidade de etileno produzido pelos frutos medido por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (etileno µL Kg⁻¹ h⁻¹); Medida da textura da polpa efetuada com texturômetro (N cm⁻²). As duas linhas tracejadas verticais indicam o fim do tratamento por 12 horas com os gases etileno ou 1-MCP. D.P.C.:Dias Pós-Colheita. Barras verticais representam o erro padrão (n= 4).....34

Figura 5: Conteúdo de açúcares solúveis medidos durante o amadurecimento do mamão papaia. O perfil do conteúdo de açúcares solúveis foi traçado para os grupos de frutos controle (CONTROLE, □), tratados com etileno (ETILENO, ○) e tratados com 1-MCP (1-MCP, △). Quantidade de açúcares solúveis e sacarose representada pelos gráficos em barras (ordenadas da esquerda). Quantidade de glicose + frutose representada pelos gráficos em linha (ordenadas da direita). As duas linhas tracejadas verticais indicam o fim do tratamento por 12 horas com os gases etileno ou 1-MCP. FW: Massa fresca. D.P.C.:Dias Pós-Colheita. Barras verticais representam o erro padrão (n= 4).....36

Figura 6. *Differential Display-PCR* de amostras de cDNA de mamões não-tratados (controle, C) ou tratados (T) com etileno. Combinações do *primer* “sense” P₁₀ com os nove *primers* “antisense” T resultaram em diferentes perfis de fragmentos de cDNA. A amplificação do cDNA das amostras em questão foi conduzida sob a presença de ([α -³²P]dCTP), sendo a eletroforese efetuada em gel de poliacrilamida 5% e uréia 7 M. O filme radiográfico foi exposto durante 16 horas e revelado para visualização das bandas de cDNA. Alguns fragmentos diferencialmente expressos encontram-se destacados por caixas evidenciando as prováveis diferenças de expressão. Outras bandas que não foram coletadas devido à provável amplificação inespecífica, indicada pela presença em todas as combinações de *primers*, estão destacadas por flechas.....56

Figura 7: Análise da expressão diferencial por Northern Blot Reverso. As amostras foram aplicadas em membranas de transferência de ácidos nucleicos, em duplicata e cada membrana foi hibridizada com sonda radioativa obtida de frutos não-tratados (controle) e tratados com etileno. I- Membrana hibridizada com a sonda dos frutos controle; II- membrana hibridizada com a sonda dos frutos tratados. Os fragmentos que diminuíram a expressão após tratamento com etileno encontram-se numerados de 1 a 29, enquanto aqueles que aumentaram a expressão encontram-se numerados de 30 a 58. Os fragmentos destacados em caixas foram clonados e seqüenciados. Act: fragmento correspondente à actina. Tub: fragmento correspondente à tubulina.....58

Figura 8. Painel de *cDNA-AFLP* comparando a expressão gênica de mamão papaia dos grupos de frutos controle (C) tratados com etileno (E) e tratados com 1-MCP (M). A combinação do *primer* Asel CA com os *primers* *TaqI* AA (1), AC (2), CA (3) e CC (4) para amplificação específica resultaram em diferentes perfis de fragmentos de cDNA. As amostras marcadas com [α -³²P]dCTP foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 5% contendo uréia 7 M. O filme radiográfico foi exposto durante 16 horas e revelado para visualização das bandas de cDNA.....83

Figura 9. Alinhamento das seqüências parciais de aminoácidos deduzidas das seqüências dos genes que codificam a enzima pectinesterase de mamão papaia (*C.papaya*), *Phaseolus vulgaris* (*P.vulgaris*) e *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana* PME1 e PME2). Os aminoácidos idênticos estão destacados em fundo preto e letra branca, os aminoácidos similares estão destacados em fundo cinza e letra branca e os aminoácidos similares estão destacados em fundo branco e letra preta.....97

Figura 10. Avaliação da integridade de RNA por fluorescência. Os eletroferogramas apresentados mostram os picos correspondentes aos RNAs ribossomais 18S (1) e 28S (2). **A)** análise do RNA extraído de frutos verdes. **B)** análise do RNA extraído de frutos maduros. **C)** exemplo da análise de um RNA degradado. Os picos dos RNAs ribossomais dos gráficos **A** e **B** mostram a integridade do RNA analisado quando comparados com os picos dos RNAs ribossomais do gráfico **C**. As duas colunas ao lado dos gráficos **A** e **B** representam uma simulação computadorizada das bandas de RNAs dipostas em uma eletroforese em gel de agarose.....114

Figura 11. Número de *probe-sets* e *probe-pairs* retidos do chip ATH1-121501 de *Arabidopsis thaliana* após hibridização com DNA genômico de mamão papaia.

Eixo das ordenadas da esquerda representa os *probe-sets* retidos (□) e o eixo das ordenadas da direita representa os *probe-pairs* retidos (○).....116

Figura 12. Sinal de intensidade dos genes (*probe-sets*) na hibridização dos RNAs dos frutos verdes e maduros com o chip ATH1-121501 de *Arabidopsis thaliana*. O software GeneSpring organizou os genes em oito diferentes *clusters*. O eixo das ordenadas dos gráficos de cada *cluster* é representado pela intensidade dos genes hibridizados com o RNA dos frutos maduros (*Ripe*). O eixo das abscissas dos gráficos de cada *cluster* é representado pela intensidade dos genes hibridizados com o RNA dos frutos verdes (*Unripe*).....118

Figura 13. Seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos do gene *PAGL1*. A seqüência codificadora e os aminoácidos estão destacados em letras maiúsculas. Os aminoácidos deduzidos estão apresentados pelo código de uma letra e estão abaixo do primeiro nucleotídeo de cada códon. O *stop* códon está representado por um asterisco. O provável sinal de poliadenilação está sublinhado na parte 3'-UTR.....139

Figura 14. Análise por *Real Time* RT-PCR dos genes 18S e *PAGL1*. Os gráficos mostram as curvas de amplificação dos genes (A e D), as curvas de temperatura de fusão dos *amplicons* (B e E) e as retas relacionadas à eficiência das reações de PCR (C e F). Os gráficos A, B e C são referentes ao gene ribossomal 18S. Os gráficos D, E e F são referentes ao gene *PAGL1*. As reações de controle negativo (NTC) estão apresentadas nas curvas de amplificação dos genes e nas curvas de temperatura de fusão dos *amplicons*. As equações logarítmicas, os valores da eficiência das reações e os valores de RqS estão apresentados nos gráficos C e F.....141

Figura 15. Seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos do gene *PAP1*. A seqüência codificadora e os aminoácidos estão destacados em letras maiúsculas. Os aminoácidos deduzidos estão apresentados pelo código de uma letra e estão abaixo do primeiro nucleotídeo de cada códon.....143

Figura 16. Análise por *Real Time* RT-PCR dos genes 18S e *PAP1*. Os gráficos mostram as curvas de amplificação dos genes (A e D), as curvas de temperatura de fusão dos *amplicons* (B e E) e as retas relacionadas à eficiência das reações de PCR (C e F). Os gráficos A, B e C são referentes ao gene ribossomal 18S. Os gráficos D, E e F são referentes ao gene *PAP1*. As reações de controle negativo (NTC) estão apresentadas nas curvas de amplificação dos genes e nas curvas de temperatura de fusão dos *amplicons*. As equações logarítmicas, os valores da eficiência das reações e os valores de RqS estão apresentados nos gráficos C e F.....145

Figura 17. Alinhamento das seqüências parciais de aminoácidos deduzidas das seqüências dos genes *LeSPL-CNR* de tomate (*cnr_protein*), *CpSPL* de mamão papaia (*C.papaya*) e dos genes de *Arabidopsis thaliana* das famílias SPL5 (BT003714 e NM_112390), SPL4 (BT004391 e NM_104194) e SPL3 (BT005443). Os aminoácidos idênticos estão destacados em fundo preto e letra branca, os aminoácidos similares estão destacados em fundo cinza e letra branca e os aminoácidos similares estão destacados em fundo branco e letra preta. A região do domínio conservado SBP-BOX está sublinhada.....146

Figura 18. Alinhamento das seqüências parciais de aminoácidos deduzidas das seqüências dos genes que possuem o domínio MADS-BOX de *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana_AGL11*, U20182.1), mamão papaia (*C.papaya_PAPL1*), pepino (*C.sativus_CAG1*, AF022377.1), pêssego (*P.dulci_MADS1*, AY947462.1), uva (*V.vinifera_MADS5*, AF373604.1), tomate (*L.esculentum_TAGL11*, AY098736.2). Os aminoácidos idênticos estão destacados em fundo preto e letra branca, os aminoácidos similares estão destacados em fundo cinza e letra branca e os aminoácidos similares estão destacados em fundo branco e letra preta. O domínio conservado MADS-BOX (M) está sublinhado com linha cheia e o domínio conservado K-BOX (K) está sublinhado com linha pontilhada. O asterisco indica a região I (*Intervention region*).....150

Figura 19. Alinhamento das seqüências parciais de aminoácidos deduzidas das seqüências dos genes que possuem o domínio MADS-BOX de maçã (*M.domestica_MADS2*, U78948.1), tabaco (*N.tabacum_FUL gene*, DQ534202.1), tomate (*L.esculentum_TDR4*, AY098732.1), pêssego (*P.dulci_MADS2*, AY947463.1), damasco (*P.persica_MADS6*, AY705973.1), uva (*V.vinifera_AP1*, AY538746.1), mamão papaia (*C.papaya_PAP1*), *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana_AGL8*, NM 125484.2). Os aminoácidos idênticos estão destacados em fundo preto e letra branca, os aminoácidos similares estão destacados em fundo cinza e letra branca e os aminoácidos similares estão destacados em fundo branco e letra preta. O domínio conservado MADS-BOX (M) está sublinhado com linha cheia. O domínio conservado K-BOX (K) está sublinhado com linha pontilhada. O asterisco indica a região I (*Intervention region*).....152

Figura 20: Efeito do tratamento com etileno e 1-MCP na firmeza da polpa durante o amadurecimento do mamão papaia. Os gráficos mostram a relação entre a queda da firmeza da polpa dos frutos e o aumento da atividade da enzima poligalacturonase. **1ª linha.** Grupo de frutos controle (□). **2ª linha.** Grupo de frutos tratados com etileno (○). **3ª linha.** Grupo de frutos tratados com 1-MCP (△). Atividade da poligalacturonase efetuada segundo Karakurt e Huber (2003) com pequenas modificações (μg de ácido galacturônico mg proteína⁻¹ minuto⁻¹; gráficos em barras, ordenadas da esquerda). Medida da textura da polpa efetuada com texturômetro (N cm^2 ; gráficos em linha, ordenadas da direita). A linha vertical tracejada dos dois últimos gráficos indica o fim do tratamento com etileno e com 1-MCP. D.P.C.: Dias Pós-Colheita. As barras verticais representam o erro padrão. (n=4).....165

Figura 21. *Northern Blotting* de endopoligalacturonase de mamão papaia. O RNA extraído de cada amostra foi submetido a eletroforese desnaturante com formaldeído, transferido para uma membrana carregada positivamente e hibridizado com a sonda radioativa sintetizada a partir de um fragmento de endopoligalacturonase de mamão papaia. O filme radiográfico foi exposto durante 16 horas e revelado para visualização dos fragmentos hibridizados com aproximadamente 1,5 quilobases (Kb). **A)** amostras de RNA do grupo de frutos controle; **B)** amostras de RNA do grupo de frutos tratados com etileno; **C)** amostras de RNA do grupo de frutos tratados com 1-MCP. Os RNAs ribossomais (rRNA) foram corados com azul de metileno logo após a transferência para a membrana, demonstrando a integridade do material e a presença de iguais quantidades aplicadas no gel. D.P.C.: Dias Pós-Colheita.....166

Figura 22. Eletroforese em gel de agarose de reações de amplificação por PCR do gene *CpPG* utilizando o *primer* GSP1_PG para a reação 5'-RACE (**A**) e GSP2_PG para a reação 3'-RACE (**B**) em combinação com o *Universal Primer Mix* (UPM). Amostras de cDNA de frutos maduros foram utilizadas para as reações do tipo RACE. **P**) Padrão de peso molecular representados à esquerda pelos valores de tamanhos de algumas bandas.....167

Figura 23. Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos do gene *CpPG*. A sequência codificadora e os aminoácidos estão destacados em letras maiúsculas. Os aminoácidos deduzidos estão apresentados pelo código de uma letra e estão abaixo do primeiro nucleotídeo de cada códon. O *stop* códon está representado por um asterisco. Os dois prováveis sinais de poliadenilação estão sublinhados na parte 3'-UTR. O provável sítio de clivagem da proteína predita está representado por uma seta vertical entre os aminoácidos *Ala35* e *Thr36*.....169

Figura 24. Alinhamento das sequências parciais de aminoácidos deduzidas das sequências dos genes que codificam a enzima poligalaturonase de mamão papaia (*C.papaya*), *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana*), cenoura (*D.carota*), tomate (*L.esculentum*), pêra (*P.cummunis*) e melão (*C.melo*). Os aminoácidos idênticos estão destacados em fundo preto e letra branca, os aminoácidos similares estão destacados em fundo cinza e letra branca e os aminoácidos similares estão destacados em fundo branco e letra preta. O domínio conservado das enzimas glicosil-hidrolases da família 28 está sublinhado.....172

Figura 25. Filograma mostrando a relação entre a proteína predita do gene *CpPG* e outras poligalaturonases. A árvore filogenética foi calculada utilizando o programa ClustalW baseada no alinhamento dos aminoácidos deduzidos de cada gene. As sequências já depositadas no banco de dados de algumas poligalacturonases utilizadas para a comparação foram: *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana*, NP_191544), damasco (*P.persica*, AAC64184), pêra (*P.communis*, CAH18935), cenoura (*D.carota*, BAC87792), tomate (*L.esculentum*, AAC28947), melão (*C.melo*, AAC26510), arroz (*O.sativa*, NP_001043617), morango (*F.ananassa*, AAP37458), dois tipos de nabo (*B.napus*, AAP37458 e *B.rapa*, CAD21651), uva (*V.vinifera*, AAK81876) e mamão papaia (CAD:44275).....174

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estimativa da variação da expressão gênica dos fragmentos analisados por “Northern Blot Reverso”. DO: densidade óptica; Act: actina. Tub: tubulina.....61

Tabela 2. Clones de mamão papaia isolados por “*Differential Display*-PCR” e com expressão diferencial confirmada por “*Northern Blot* Reverso”. As seqüências das bandas foram comparadas com o GenBank® por meio do programa tBLASTX.....62

Tabela 3. Clones de mamão papaia isolados por *cDNA-AFLP*. As seqüências das bandas foram comparadas com o GenBank® por meio do programa tBLASTX.....84

Tabela 4. Prováveis genes com expressão > 1,5 vezes nos frutos verdes obtidos com *mask200*.....119

Tabela 5. Prováveis genes com expressão > 1,5 vezes nos frutos maduros obtidos com *mask200*.....119

Tabela 6. Comparação das técnicas de análise de expressão gênica empregadas no trabalho.....179

Tabela 7. Prováveis genes com expressão > 1,5 vezes nos frutos verdes obtidos com *mask200*.....182

Tabela 8. Prováveis genes com expressão > 1,5 vezes nos frutos maduros obtidos com *mask200*.....184

LISTA DE ABREVIATURAS

[α - ³² P]dCTP	Desoxicitosina 5'-trifosfato (α - ³² P)
1-MCP	1-metilciclopropeno
ACC	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
cDNA	DNA complementar
cDNA fd	DNA complementar fita dupla
cDNA fs	DNA complementar fita simples
cDNA-AFLP	cDNA Amplified Fragment Length Polymorphism
ddNTP	5'-trifosfato de 2',3'-didesoxirribonucleosídeo
DD-PCR	Differential Display-PCR
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	5'-trifostato de 2'-desoxirribonucleosídeo
DO	Densidade óptica
DPC	Dias pós-colheita
DTT	Tio-1,4-dimercapto-2,3-butanodiol
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
HCN	Ácido cianídrico
IPTG	isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosídeo
kb	quilobases ou quilopar de bases
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
min	minutos
MOPS	Ácido 3-[N-morfino]propanosulfônico
mRNA	RNA mensageiro
nor	non-ripening
pb	Par de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PG	Enzima poligalacturonase
Pgi	Enzima inibidora da enzima poligalacturonase
PME	Enzima pectina metil estearase
ppb	parte por bilhão
ppm	parte por milhão
PVP 40.000	polivilpirrolidona de peso molecular médio 40.000 g/mol
RGI	Ramnogalacturano do tipo I
RGII	Ramnogalacturano do tipo II
rin	ripening inhibitor
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
RT-PCR	Transcrição reversa seguida da PCR
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS	Laurel sulfato de sódio

SSC	Tampão citrate de sódio salino
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
XET	Enzima xiloglicano endotransglicosilase
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indoil galactopiranosídeo
β-gal	Enzima beta galactosidase
XSpecies	Cross-Species

ORGANIZAÇÃO DOS CAPÍTULOS

No **Capítulo 1** são apresentados as principais informações e dados que fundamentam o projeto de pesquisa que originou a presente tese.

O mamão papaia, um fruto climatérico com importantes modificações fisiológicas ocorridas após a colheita, teve o seu amadurecimento e os efeitos ocasionados pelo tratamento com etileno ou 1-MCP estudados, e os resultados são apresentados no **Capítulo 2**. Parâmetros fisiológicos e bioquímicos foram utilizados para discutir as diferenças existentes entre os frutos verdes e maduros, assim como a influência do adiantamento ou inibição do amadurecimento ocasionados pelos tratamentos com etileno e 1-MCP, respectivamente. Um artigo formulado a partir dos resultados obtidos nesse capítulo foi publicado no periódico *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (FABI *et al.*, 2007), em anexo ao final da tese. Com o intuito de isolar genes relacionados com o amadurecimento do mamão papaia e a qualidade pós-colheita do fruto, as amostras caracterizadas no **Capítulo 2** foram posteriormente utilizadas para as análises diferenciais da expressão gênica descritas nos capítulos posteriores.

A técnica *Differential Display-PCR* (DD-PCR) descrita no **Capítulo 3** utilizou amostras de frutos não-tratados (controle) e tratados com etileno, representando dois grupos de frutos distintos para a análise da expressão gênica.

Já o **Capítulo 4** relata o uso da técnica de *cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism* (cDNA-AFLP) para a análise diferencial de genes, sendo a amostragem

utilizada composta por frutos não-tratados (controle), tratados com etileno e tratados com 1-MCP, representando assim três grupos distintos de frutos.

O **Capítulo 5** mostra a utilização da técnica de *Cross-Species Microarray* (*XSpecies Microarray*) para a descoberta de possíveis genes relacionados com o amadurecimento do mamão, sendo que as amostras utilizadas foram representadas por frutos verdes e maduros. A utilização da técnica de *XSpecies Microarray* permitiu a análise da expressão gênica do mamão papaia de uma forma mais abrangente.

O **Capítulo 6** descreve o isolamento de genes de fatores de transcrição cuja expressão sofre alterações durante o amadurecimento do mamão papaia. Para tanto, reações de PCR foram efetuadas utilizando oligonucleotídeos degenerados e sintetizados com base em informações já disponíveis na literatura. Adicionalmente foram feitas análises por *Real Time-PCR* para avaliar a expressão durante o amadurecimento.

Não obstante o uso das técnicas descritas acima para o isolamento de genes possivelmente relacionados com a qualidade pós-colheita do mamão, o **Capítulo 7** descreve os perfis de atividade enzimática e transcritos de uma endopoligalacturonase (endo-PG) isolada por *DD-PCR*. As combinações dos resultados de atividade e *Northern Blot*, assim como as medições da firmeza da polpa durante o amadurecimento, sugerem que a enzima endo-PG desempenha papel fundamental do amolecimento da polpa dos frutos.

REFERÊNCIA

Fabi J.P., Cordenunsi B.R., Barreto G.P., Mercadante A.Z., Lajolo F.M., do Nascimento J.R.O. Papaya fruit ripening: Response to ethylene and 1-MCP. *J. Agric. Food Chem.*, v. 55: p. 6118-6123, 2007.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. Amadurecimento de frutos

O amadurecimento das frutas é um complexo processo no qual importantes alterações químicas e bioquímicas ocorrem, estendendo-se desde a polinização das flores (antese) até a colheita do fruto (SEYMOUR *et al.*, 1993; TUCKER; GRIERSON, 1987). Muitas vezes as transformações continuam após a colheita, exigindo assim cuidados especiais no manejo dos frutos que apresentam essas mudanças pós-colheita e são de interesse comercial.

Essas alterações durante o amadurecimento das frutas seguem um padrão específico para cada uma delas e além de resultar em sabor, odor, textura e cor adequadas para o consumo, propiciam o acesso a nutrientes importantes, como vitaminas, e também a outros compostos com ação biológica benéfica, como por exemplo, fibra alimentar e agentes antioxidantes (FENNEMA, 1996). Além disso, as frutas constituem matérias-primas de destaque na indústria alimentícia, sendo empregadas em uma ampla gama de produtos.

Do ponto de vista biológico, o amadurecimento consiste em uma série de transformações bioquímicas que resultam na obtenção de um fenótipo favorável à atração de animais consumidores que irão propiciar a dispersão das sementes (GIOVANNONI, 2001). Dentre essa gama de consumidores, que incluem os seres humanos, há um aproveitamento nutricional fundamental para a sobrevivência desses seres vivos. Esse aporte nutricional é formado pelas substâncias químicas

presentes nos frutos provindos de compostos estruturais previamente sintetizados e de compostos básicos dos metabolismos primários e secundários.

Do ponto de vista comercial, enquanto o amadurecimento de frutos promove incrementos em termos de qualidade sensorial e nutricional, ele aumenta a suscetibilidade dos frutos principalmente pela diminuição da firmeza da polpa e casca, como é o caso do mamão. Esse amolecimento predispõe os frutos às injúrias causadas pela manipulação durante e após a colheita e por microorganismos patógenos oportunistas, aumentando os desafios tecnológicos atuais. Dessa maneira, muitos estudos têm focado o metabolismo pós-colheita dos frutos, a fim de tentar entender os mecanismos bioquímicos e genéticos do amadurecimento e buscar a identificação de eventuais pontos de controle deste metabolismo, podendo controlá-los tanto mecanicamente quanto geneticamente. Assim, o aprimoramento das técnicas de produção e manejo pós-colheita pode resultar em uma diminuição das perdas e facilitar a distribuição desses alimentos, trazendo benefícios nutricionais e econômicos importantes.

1.2. O amadurecimento e os hormônios vegetais

As alterações no aspecto e composição que ocorrem durante o amadurecimento envolvem diversas etapas bioquímicas e são altamente coordenadas (SEYMOUR *et al.*, 1993). Esses processos são dependentes da atividade de várias enzimas, e o controle e coordenação decorrem da ação combinada de hormônios vegetais, como as auxinas (responsáveis pela regulação de genes relacionados à elongação, divisão e expansão de células vegetais, por exemplo) e o etileno (responsáveis pela regulação de genes relacionados ao

amadurecimento de frutos), e da expressão gênica (GRAY *et al.*, 1992; SMITH *et al.*, 1977; SPEIRS; BRADY, 1991; TUCKER; GRIERSON, 1987).

A produção dos hormônios vegetais nas plantas é endógena e geralmente o tratamento exógeno com esses hormônios promove um aumento da transcrição de proteínas reguladas por esses hormônios. Muitos estudos sobre a regulação gênica e o tratamento com hormônios vegetais estão sendo feitos na tentativa de entendimento da ação dos hormônios sobre a transcrição gênica e as etapas envolvidas nessa regulação, como o isolamento de fatores de transcrição primários e secundários e de receptores específicos, relatados por revisões feitas por Hagen e Guilfoyle (2002) para ação das auxinas, e Adams-Philips, Barry e Giovannoni (2004) para ação do etileno. Em tomate, o trabalho apresentado por Moore *et al.* (2002) levou ao estudo mais aprofundado da sinalização molecular decorrente do hormônio etileno. Nesse trabalho, os autores observaram que o tratamento com etileno aumentou a transcrição de genes regulados por ele, mas não alterou o fenótipo de não-maturação de duas variedades mutantes de tomate chamadas de *rin* ("ripening inhibitor") e *nor* ("non-ripening"), sugerindo que as duas mutações bloquearam genes de sinalização molecular independentes da ativação pelo etileno.

1.3. Importância do etileno no amadurecimento dos frutos

Em frutos, a ação dos hormônios liberados após a colheita, como é o caso do etileno, tem recebido especial importância, pois sua liberação endógena desencadeia alterações quase que imediatas em alguns frutos, tornando-os propícios à infestação por patógenos e à perda pós-colheita, diminuindo assim a vida de prateleira dos mesmos e alterando seu valor comercial (GIOVANNONI,

2001). Quando um fruto é colhido e apresenta um repentino aumento nas taxas de respiração e na liberação do gás etileno, esse fruto é classificado como climatérico. Já quando um fruto é colhido e as taxas de respiração e de liberação do gás etileno não possuem um pico detectável, o fruto é classificado como não-climatérico (SEYMOUR *et al.*, 1993). O hormônio etileno é sintetizado através do aminoácido metionina e as duas principais enzimas de síntese são: a enzima ACC sintase (EC 4.4.1.14), que sintetiza o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), e a enzima que transforma o ACC em HCN e CO₂ (ACC oxidase, EC 1.14.17.4). A ACC sintase produz, além do ACC, o composto 5-metiltioadenosina (MTA), que será utilizado em uma nova síntese de uma nova molécula de metionina, chamado de ciclo de recuperação da metionina (MIYAZAKI; YANG, 1987). Esse ciclo, denominado ciclo de Yang e apresentado na **Figura 1**, preserva um átomo de enxofre na forma metilada através do gasto de uma molécula de ATP, demandando uma pequena quantidade do aminoácido metionina em largas produções do hormônio etileno, como nas transformações dos frutos climatéricos durante o amadurecimento (BLEECKER; KENDE, 2000). Já a molécula de HCN liberada pela ACC oxidase é rapidamente transformada em β -cianoalanina pela enzima β -cianoalanina sintase (EC 4.4.1.9), evitando assim a toxicidade do composto HCN. As enzimas ACC sintase e ACC oxidase foram bem estudadas e já foram isoladas e caracterizadas em várias espécies vegetais, inclusive em mamão papaia. Mason e Botella (1997) identificaram dois genes da enzima ACC sintase em mamão, enquanto que Lin *et al.* (1997), Dunkley e Golden (1998) e López-Gómez *et al.* (2004) isolaram diferentes genes correspondentes a ACC oxidase dos frutos.

Um novo gene de ACC oxidase em mamão foi descoberto por Chen *et al.* (2003), porém este gene teve um aumento de expressão no final do

amadurecimento do fruto diferentemente dos outros genes isolados, caracterizando esse gene como o responsável pela parte de oxidação do composto ACC na fase de senescência do fruto.

Figura 1. Via da biossíntese do etileno e do ciclo de recuperação da metionina. ACC, ácido 1-aminociclopropano1-carboxílico; Ade, adenina; AdoMet, s-adenosil-L-metionina; KMB, ácido 2-ceto-4-metiltiobutírico; Met, L-metionina; MTA, 5'-metiltioadenosina; MTR, 5'-metiltioribose; MTR-1-P, 5'-metiltioribose-1-fosfato. Modificado de Bleeker e Kende (2000).

O hormônio etileno é produzido de forma auto-catalítica, ou seja, ocorre estímulo à transcrição dos genes das duas principais enzimas de formação através de uma sinalização molecular, modelo já proposto em tomate (ADAMS-PHILIPS, BARRY E GIOVANNONI 2004). Sabe-se que muitos genes são dependentes

diretamente dessa sinalização, e muitos trabalhos estão sendo feitos, como estudos em tomates (BRUMMELL *et al.*, 1999; GIOVANNONNI, 2001; MOCTEZUMA *et al.*, 2003; SITRIT; BENNETT, 1998) e em maçãs (DANDEKAR *et al.*, 2004), visando alcançar uma relação entre a liberação endógena, o tratamento com etileno e a proporção de transcritos dos genes em questão.

Sabendo-se dos efeitos na fase de pós-colheita causados pelo etileno, uma nova abordagem para o aumento da vida de prateleira de frutos climatéricos está sendo utilizada. Ela consiste na utilização de substâncias, chamadas de ciclopropenos, que inibem os efeitos do etileno bloqueando seus receptores de sinalização molecular (BLANKSHIP; DOLE, 2003). O 1-metilciclopropeno (1-MCP) é o inibidor de etileno mais bem estudado em frutos (SISLER *et al.*, 2003). Os efeitos do 1-MCP já foram estudadas em diversas frutas, como pêras (ARGENTA *et al.*, 2003), abacates, (ADKINS *et al.*, 2005), nectarinas (BREGOLI *et al.*, 2003) e mamão papaia (HOFMAN *et al.*, 2001, ERGUN; HUBER, 2004), e os efeitos no amadurecimento foram distintos para cada espécie estudada. Aliadas às informações decorrentes das análises moleculares da ação do etileno, as análises da utilização do 1-MCP em conjunto com o etileno podem representar uma nova ferramenta na descoberta de genes etileno-dependentes cujas expressões possam estar relacionadas à regulação do amadurecimento de frutos.

1.4. Expressão gênica e amadurecimento

A expressão gênica desempenha papel fundamental no controle do processo do amadurecimento, tanto pela regulação espacial quanto temporal, e o controle de genes específicos parece ser necessário durante esse processo (GIOVANNONI,

2001; SPEIRS; BRADY, 1991). A modulação da expressão gênica pode ser efetuada na transcrição, nas taxas de degradação de mRNAs e proteínas e também nos níveis de eficiência da tradução e distribuição entre compartimentos subcelulares, o que pode ser tomado como evidência da complexidade e sofisticação desse controle (SMITH *et al.*, 1977).

Esse conhecimento mais aprofundado acerca do controle gênico do amadurecimento está limitado a alguns poucos frutos, mas principalmente ao tomate (ADAMS-PHILIPS, BARRY E GIOVANNONI 2004; BRUMMELL *et al.*, 1999; GIOVANNONI, 2001; GRAY *et al.*, 1992; PICTON *et al.*, 1993; STITT, 1995), que constitui um importante modelo experimental de fruta climatérica. As informações relativas a algumas frutas tropicais de grande importância comercial, como por exemplo o mamão, são relativamente pequenas. Além disso, a maior parte das pesquisas é voltada para o estudo da expressão de enzimas específicas. Uma vez que a modulação gênica pode ocorrer em diferentes pontos do metabolismo e não só em relação à expressão de algumas enzimas pontuais, seria importante o desenvolvimento de estudos mais abrangentes, à semelhança do que vem sendo feito com o tomate (GIOVANNONI, 2001), pois dessa maneira o entendimento do amadurecimento dos frutos poderia ser facilitado e o controle deste tornar-se-ia possível.

Uma abordagem experimental que permite avaliar a expressão de genes em um momento específico, consiste na análise comparativa das espécies de mRNA presentes em um tecido em estágios de desenvolvimento ou fisiológicos distintos. Deste modo, podem ser estabelecidos dois panoramas da expressão gênica, e a partir da comparação entre eles, serem identificados os genes com expressão estimulada ou diminuída. O estudo apurado desses genes pode, então, permitir uma

estimativa mais apurada quanto à contribuição para a mudança fisiológica de interesse.

A evolução das técnicas de análise simultânea em larga escala de genes, tanto em formato de *microarray* ou *macroarray*, assim como a disponibilidade de bancos de seqüências gênicas, já permitiu avaliar mudanças no padrão de expressão gênica em vários vegetais (AHARONI; O'CONNELL, 2003; ALBELDA; SHEPPARD, 2000; BALDWIN *et al.*, 1999; CLARK *et al.*, 1999; DRMANAC; DRMANAC, 1999; EISEN; BROWN, 1999; ENGLISH; PARKER, 1999; KUHN, 2001; RAST *et al.*, 2000; TERRIER *et al.*, 2005; TRAINOTTI *et al.*, 2006). Uma nova técnica, identificada como *Cross Species Microarray*, se baseia na proximidade filogenética da espécie analisada com a espécie que possui o *chip* comercialmente disponível, podendo ser uma alternativa para a falta de informação genética de certas espécies (HAMMOND *et al.*, 2005, 2006). Porém, a configuração dessas técnicas de análise em larga escala exige uma infra-estrutura com demasiada sofisticação, tanto para o preparo dos *arrays* quanto para a análise dos resultados.

Algumas metodologias mais simples constituem uma alternativa interessante, pois são mais fáceis, mais baratas, e não dependem de uma coleção de seqüências de DNA para preparo dos *arrays*. Além disso, diferentemente dos *arrays*, em que as seqüências a serem avaliadas devem ser previamente selecionadas e conhecidas, essas técnicas dispensam qualquer informação prévia a respeito das seqüências. Desse modo, é possível que genes importantes e com mudança no padrão de expressão, mas que ainda não foram isolados, sejam identificados.

Essas metodologias mais simples, tais como a análise diferencial de bibliotecas de cDNAs (CLENDENNEN; MAY, 1997; MANNING, 1998; MEDINA-ESCOBAR *et al.*, 1997), “*Differential-Display-PCR*” (*DD-PCR*) (MEDINA-ESCOBAR

et al., 1997; MOYANO *et al.*, 2004; KIM; TRIPLETT, 2004; PETERSEN *et al.*, 2004; WILKINSON *et al.*, 1995) e “*cDNA Amplified Fragment Length Polymorfism*” (*cDNA-AFLP*) (BACHEM *et al.*, 1996; BACHEM *et al.*, 2001; BURG; BOTHA, 2004; OOMEN *et al.*, 2003; TRINDADE *et al.*, 2004; ZHENG *et al.*, 2004) já foram empregadas com sucesso na identificação de genes envolvidos no amadurecimento de frutas e vegetais. O custo relativamente baixo e menor complexidade dessas técnicas não significam qualidade inferior dos resultados, nem dificuldade para detecção de pequenas variações na expressão gênica ou detecção de genes pouco expressos. Apesar das limitações inerentes a cada técnica, os sistemas de análise qualitativa podem alcançar sensibilidade em torno de 2×10^{-5} , ou seja, mesmo mRNAs com abundância relativa de 1 em 100.000 podem ser detectados (KUHN, 2001).

Bons exemplos do potencial analítico das técnicas de estabelecimento de perfis de expressão gênica e das conseqüências advindas desse tipo de estudo são os trabalhos com morangos apresentados por Medina-Escobar *et al.* (1997) e Agius *et al.* (2003). Com a aplicação da técnica de “*Differential Display-PCR*” foi possível o isolamento e identificação de vários genes com expressão aumentada durante o amadurecimento dessa fruta (MEDINA-ESCOBAR *et al.*, 1997). A caracterização e estudo mais detalhado de um desses clones permitiu identificar uma aldo-ceto-redutase capaz de converter o ácido D-galacturônico em L-galactono lactona (AGIUS *et al.*, 2003), o qual é precursor imediato do ácido L-ascórbico na biossíntese em vegetais. A identificação desse gene serviu como confirmação da existência de uma via de biossíntese de ácido ascórbico a partir do principal componente das pectinas da parede celular, o ácido D-galacturônico. Quando foi realizada a superexpressão desse gene em *Arabidopsis thaliana*, observou-se um aumento de duas a três vezes no conteúdo de ácido ascórbico nos tecidos desse

vegetal, demonstrando o potencial de uso desse gene para a manipulação dos teores dessa vitamina. Resultados similares, que podem ser úteis para melhorar a qualidade sensorial, nutricional, aumentar o tempo de prateleira, a resistência a patógenos ou a produtividade, podem ser obtidos com outras frutas.

1.5. Mamão papaia

O mamão papaia é uma fruta climatérica de grande importância comercial, estando entre as frutas com maior produção no Brasil, que é o terceiro maior exportador com aproximadamente 39.000 toneladas da fruta. Em 2005, as exportações brasileiras de mamão tiveram um expressivo aumento em volume (7,87%) e valores (15,34 %), se comparados a 2004 (IBRAF - Instituto Brasileiro de Frutas. Informativo, edição nº 42, ano 7, Janeiro de 2006). Contudo, a produção dessa fruta é bastante afetada pelas perdas pós-colheita decorrentes do excessivo amolecimento da polpa, que favorece o ataque microbiano e os danos mecânicos. Sendo uma fruta climatérica, essas mudanças de textura ocorrem de forma relativamente rápida e as técnicas de manejo são relativamente limitadas quanto à prevenção e minimização dos danos (PAULL *et al.*, 1997). Deste modo, o mamão constitui não apenas um fruto de importância comercial, mas também, um excelente modelo de estudo do amadurecimento e das transformações que levam às alterações da textura. Assim, a evolução do conhecimento sobre o processo de amadurecimento desse fruto pode não apenas contribuir para o entendimento dos mecanismos regulatórios envolvidos, mas também, tem potencial de aplicação para a resolução de um problema prático, que é o excessivo amaciamento após a colheita.

1.6. Bioquímica estrutural da polpa do mamão

O mamão papaia é considerado um fruto carnoso. A sua polpa é constituída de células parenquimatosas, de características poliédricas ou alongadas com paredes primárias sem espessamento secundário, conferindo certa elasticidade ao tecido, sendo separadas uma das outras pela lamela média ou por espaços intercelulares (BRETT; WALDRON, 1996). A **Figura 2** mostra o modelo proposto da estrutura de parede celular de plantas em geral, inclusive do mamão papaia.

Nas plantas angiospermas dicotiledôneas, como é o caso do mamão papaia, as paredes celulares primárias são do tipo I (CARPITA; GIBEAUT, 1993) divididas em duas partes: a parte microfibrilar e a matriz. A parte microfibrilar é composta por iguais quantidades de celulose (cadeia linear de β -1,4-D-glicano) e de xiloglicanos (cadeia linear de β -1,4-D-glicano com algumas substituições com D-xilose) interligados entre si por ligações do tipo pontes de hidrogênio (“*cross-linking*”), com pequenas quantidades de arabinoxilanos (cadeia linear de D-xilose com ramificações de α -L-arabinose), glicomananos (cadeia linear de β -1,4-D-glicano e β -1,4-D-manano) e galacto-glicomananos (cadeia linear de β -1,4-D-glicano e β -1,4-D-manano com ramificações únicas de α -D-galactose) (BRUMMELL; HARPSTER, 2001, YONG *et al.*, 2005). Todos esses componentes são envoltos em uma matriz péctica presente também em grande parte da lamela média. Essa matriz é composta por homogalacturonanos (cadeia linear de ácido α -1,4-D-galacturônico com algumas metil-esterificações) e ramnogalacturonanos do tipo I (cadeia linear alternada de ácido α -1,4-D-galacturônico com α -1,2-ramnose com ramificações nesse açúcar de arabinanos, galactanos e arabinogalactanos, RGI) que controlam muitas propriedades fisiológicas, como porosidade das paredes, densidade celular e

espaçamento das microfibrilas. Uma variação dos homogalacturonanos, chamados de ramnogalacturonanos do tipo II (RGII), estão em menor quantidade na matriz e possuem ramificações com açúcares neutros raros, formando dímeros através de ligações do tipo di-ésteres com átomos de boro, funcionando como um controle de porosidade e de tensão de alongamento celular (BRUMMELL; HARPSTER, 2001; YONG *et al.*, 2005). Os espaços entre a fase microfibrilar e a matriz são preenchidas pelas pectinas hidratadas ligadas entre si por ligações do tipo ésteres e pelos homogalacturonanos não metil-esterificados através de um cátion bivalente de cálcio (CARPITA; GIBEAUT, 1993). A fase microfibrilar e a matriz podem também se unir por ligações covalentes entre algumas moléculas de xiloglicanos e pectinas (THOMPSON; FRY, 2000), sendo que algumas proteínas estruturais podem também fazer parte dessas ligações intermoleculares (YONG *et al.*, 2005).

As mudanças estruturais que ocorrem na parede celular das dicotiledôneas durante o amadurecimento, compreendem desde o aumento da concentração dos polissacarídeos pécticos até uma diminuição no tamanho dos polímeros da parede celular (HUBER, 1983; BRADY, 1987). Essas mudanças são devido, em grande parte, à ação de enzimas que catalisam as quebras das ligações inter e intra-moleculares dos glicanos que caracterizam a parede celular do vegetal. Entre as enzimas mais estudadas, estão a poligalacturonase (PG), a pectinametilesterase (PME), a β -galactosidase (β -gal), a endo- β -1-4-D-glicanase (EGase), a xiloglicano endotransglicosilase (XET) e as expansinas.

Figura 2. Modelo de parede celular primária do tipo I de mamão papaia. A parede celular primária é composta pela fase microfibrilar (composta por celulose, xiloglicanos e suas ligações entre si do tipo “cross-link”) formando um forte entrançado imerso em uma matriz péctica (composta por vários tipos de pectinas também existentes na lamela média). Modelo proposto por Carpita e Gibeaut (1993).

A PG catalisa a hidrólise das ligações α -1-4 de ácido poligalacturônico dos homogalacturanos, a princípio desesterificados, de forma aleatória (endo-PG, EC 3.2.1.15) ou a partir da extremidade não-redutora do ácido poligalacturônico (exoPG, EC 3.2.1.67). Já a PME (EC 3.1.1.11) desesterifica parcialmente a pectina pela clivagem hidrolítica dos grupamentos metila do grupo carboxílico dos ácidos galacturônicos. A β -galactosidase (EC 3.2.1.23) remove resíduos de β -D-galactosil de terminais não redutores de β -1-4-D-galactanos, e só está presente em sua forma exo, isto é, não foi relatada nenhuma forma de atuação aleatória desta enzima em

plantas superiores. A EGase (EC 3.2.1.4) hidrolisa ligações internas de cadeias de β -1-4-D-glicanos adjacentes a resíduos não-substituídos de forma irreversível. A XET (EC 2.4.1.207) possui uma ação endo-catalítica de β -1-4-D-glicanos assim como a EGase, porém de uma forma reversível, pois transfere o novo açúcar formado através da sua parte redutora para um carbono na posição quatro de um resíduo de glicose de um outro xiloglicano em sua parte não-redutora com a retenção da configuração anomérica da ligação glicosídica. Por fim, as expansinas são proteínas localizadas nas paredes celulares e atuam, provavelmente, rompendo reversivelmente as ligações do tipo pontes de hidrogênio entre as fases da microfibrila celulósica e da matriz péctica, particularmente de xiloglicanos, resultando em uma perda de adesão celular (BRUMMELL; HARPSTER, 2001).

1.7. Estudos sobre o mamão

Em mamão, muitas análises se concentram nas modificações químicas das paredes celulares, pois o amolecimento tanto da casca quanto da polpa durante o amadurecimento são as principais características do fruto. Como exemplo, podem-se citar os trabalhos efetuados por Paull *et al.* (1999) e Manrique e Lajolo (2004). Os autores do primeiro trabalho sugerem que a hidrólise de pectinas associada à modificação de hemiceluloses estão ligadas à diminuição da firmeza da polpa do mamão durante o amadurecimento, sendo que o primeiro evento é aparentemente o mais importante. Já os autores do segundo trabalho sugerem que, como indicado pela diminuição das razões entre os açúcares solúveis neutros e os açúcares solúveis ácidos durante a solubilização de pectinas no amadurecimento do mamão, a enzima poligalacturonase possui papel fundamental no amolecimento da polpa do

fruto. As atividades das enzimas responsáveis pela degradação de parede celular no mamão também foram estudadas (ALI *et al.*, 1998; ALI *et al.*, 2004; LAZAN *et al.*, 1995; LAZAN *et al.*, 2004; SOH *et al.*, 2006), porém apenas uma galactosidase e uma glicanase chamada de xilanase, a qual degrada parte da estrutura da microfibrila especificamente as hemiceluloses, apresentaram parte de seus genes seqüenciados, depositados no GenBank e publicados (OTHMAN *et al.*, 1998 para β -galactosidase com número de acesso [AF064786](#), CHEN; PAULL, 2003 para endoxilanase com número de acesso [AY138968](#)). Esses estudos acerca das enzimas pectinolíticas, que englobam a atividade e o isolamento dos genes, se originaram de estudos pontuais das enzimas, isto é, não foram feitos estudos genéticos globais sobre o amadurecimento do mamão papaia e os genes das enzimas responsáveis pelas transformações pós-colheita dos frutos.

A análise pontual de enzimas consideradas “chave” em alguns sistemas, que se estendem desde as medidas das atividades até as medidas de expressão gênica, são proveitosas, porém são relativamente limitadas. Devido a restrita abrangência dessas técnicas, a análise simultânea de transcritos pode ser uma ferramenta muito útil para o isolamento de genes ligados ao amadurecimento do fruto estudado, e não só a um definido metabolismo. No caso do mamão, Devitt *et al.* (2006) utilizaram a técnica de geração de ESTs (“Expressed Sequence Tags”) através de bibliotecas de cDNAs para o isolamento de fragmentos de genes do mamão papaia de duas variedades distintas.

Técnicas mais simples de análises de transcritos, as quais ilustram diferenças na expressão gênica, ainda não foram utilizadas no mamão papaia, pelo menos até o presente momento. Dessa forma, o trabalho apresentado nessa monografia faz a utilização de algumas técnicas de análise de transcritos para a tentativa de

isolamento de genes que possam estar relacionados com o amadurecimento do mamão papaia e que possam desempenhar funções que afetam a qualidade pós-colheita desse fruto.

1.8. REFERÊNCIAS

- Adams-Philips L., Barry C., Giovannoni J. Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends in Plant Science*, v. 9: p. 331-338, 2004;
- Adkins M.E., Hofman P.J., Stubbings B.A., Macnish A.J. Manipulating avocado fruit with 1-methycyclopropene. *Postharvest Biol. Technol.*, v. 35: 33-42, 2005;
- Agius F., González-Lamothe R., Caballero J.L., Muñoz-Blanco J., Botella M.A., Valpuesta V. Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature biotechnology*, v. 21: p.177-181, 2003;
- Aharoni A., O'Connell A.P. Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays. *J. of Exp. Botany*, v. 53: p. 2073-2087, 2002;
- Albelda S.M., Sheppard D. Functional genomics and expression profiling. Be there or be square. *American Journal of respiratory cell and molecular biology*, v. 23, 2000;
- Ali Z.M., Chin L.H., Lazan H. A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits. *Plant Science*, v. 167: p. 317-327, 2004;
- Ali Z.M., Ng S.Y., Othman R., Goh L.Y., Lazan H. Isolation, characterization and significance of papaya beta-galactanases to cell wall modification and fruit softening during ripening. *Physiologia Plantarum*, v. 104: p. 105-115, 1998;
- Argenta L.C., Fan X.T., Mettheis J.P. Influence of 1-methylcyclopropene on ripening, storage life, and volatile production by d'Anjou cv. pear fruit. *J. Agric. Food Chem.*, v. 51: 3858-3864, 2003;
- Bachem C.W., van der Hoeven R.S., de Bruijn S.M., Vreugdenhil D., Zabeau M., Visser R.G. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant Journal*, v. 9: 743-753, 1996;
- Bachem C.W.B., Oomen R.J.F.J., Visser R.G.F. Transcript Imaging with cDNA-AFLP: A Step-by-Step Protocol. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 16: p. 157-173, 1998;

- Baldwin D., Crane V., Rice D. A comparison of gel-based, nylon filter and microarray techniques to detect differential RNA expression in plants. *Current opinion in plant biology*, v. 2: p. 96-103, 1999;
- Blankenship S.M., Dole J.M. 1-methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biol. Technol.*, v. 28: 1-25, 2003;
- Bleecker A.B., Kende H., Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual R. of Cell and Devel. Biology*, v. 16: 1+, 2000;
- Brady C.J. Fruit ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, v. 38: p.155-204, 1987;
- Bregoli A.M., Ziosi V., Biondi S., Rasori A., Ciccioni M., Costa G., Torrigiani P. Postharvest 1-methylcyclopropene application in ripening control of 'Stark Red Gold' nectarines: Temperature-dependent effects on ethylene production and biosynthetic gene expression, fruit quality, and polyamine levels. *Postharvest Biol. Technol.*, v. 37: 111-121, 2003;
- Brett C, Waldron K. Physiology and Biochemistry of plants cell walls. London. Unwin Hyman, p. 194, 1996;
- Brummell D.A., Hall B.D., Bennett A.B. Antisense suppression of tomato endo-1,4-beta-glucanase Cel2 mRNA accumulation increases the force required to break fruit abscission zones but does not affect fruit softening. *Plant Molecular biology*, v. 40: p. 615-622, 1999;
- Brummell D.A., Harpster M.H. Cell Wall Metabolism in Fruit Softening and Quality and Its Manipulation in Transgenic Plants. *Plant Molecular Biology*, v. 47: p. 311-340, 2001;
- Burger A.L., Botha F.C. Cloning of a specific ripening-related gene from the multiple of ripening-related genes identified from a single band excised from a cDNA-AFLP gel. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 22: p. 225-236, 2004;
- 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*, v. 3: p. 1-30, 1993;
- Chen Y.T., Lee Y.R., Yang Y.T., Wang Y.T., Yang S.F., Shaw J.F. A novel ACC oxidase gene (CO-ACO2) associated with late stage fruit ripening and leaf senescence. *Plant Science*, v. 164: p. 531-540, 2003;
- Chen N. J., Paull R.E. Endoxylanase expressed during papaya fruit ripening: purification, cloning and characterization. *Functional Plant Biology*, v. 30: p. 433-441;
- Clark M.D., Panopoulou G.D., Cahil D.J., Büsow K., Lehrach H. Construction and analysis of arrayed cDNA libraries. *Methods in Enzymology*, v. 303: p. 205-233, 1999;

- Clendennen S.L.K., May G. D. Differential gene expression in ripening banana fruit. *Plant Physiology*, v. 115: p. 463-469, 1997;
- Dandekar A.M., Teo G., Defilippi B.G., Uratsu S.L., Passey A.J., Kader A.A., Stow J.R., Colgan R.J., James D.J. Effect of down-regulation of ethylene biosynthesis on fruit flavor complex in apple fruit. *Transgenic research*, v. 13: p. 373-384, 2004;
- Devitt L.C., Sawbridge T., Holton T.A., Mitchelson K., Dietzgen R.G. Discovery of genes associated with fruit ripening in *Carica papaya* using expressed sequence tags. *Plant Science*, v. 170: p. 256-363, 2006;
- Drmanac R., Drmanac S. cDNA screening by array hibridization. *Methods in Enzimology*, v. 303: p. 165-178, 1999;
- Dunkley H.M., Golden K.D. ACC oxidase from *Carica papaya*: Isolation and characterization. *Physiologia Plantarum*, v. 103: p. 225-232, 1998;
- Eisen M.B., Brown P.O. DNA arrays for analysis of gene expression. *Methods in Enzimology*, v. 303: p. 179-204, 1999;
- English D., Parker B. Methods for preparing PCR based arrays on Nytran N and SuPerCharge Nylon Membranes. *Applications Notes for Biomolecular Screening*, 1999;
- Ergun M., Huber D.J. Suppression of ethylene perception extends shelf-life and quality of "Sunrise Solo" papaya fruit at both pre-ripe and ripe stages of development. *Europ. J. Hort. Sci.*, v. 69: 184-192, 2004;
- Fennema O.R. Food Chemistry (Third edition), Marcel Dekker, New York (1996);
- Giovannoni J. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, v. 52: p. 725-749, 2001;
- Gray J., Picton S., Shabbeer J., Schuch W., Grierson D. Molecular bilology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes. *Plant Molecular Biology*, v. 19: p. 69-87, 1992;
- Hagen G., Guilfoyle T. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Molecular Biology*, v.49: p. 373-385, 2002;
- Hammond J.P., Bowen H.C., White P.J., Mills V., Pyke K.A., Baker A.J.M., Whiting S.N., May S.T., Broadley M.R. A comparision of the *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi arvense* shoot transcriptomes. *New Phytologist*, v. 170: p. 239-260, 2006;
- Hammond J.P., Broadley M.R., Craigon D.J., Higgins J., Emmerson Z., Townsend H., White P.J., May S.T. Using genomic DNA-basedprobe-selection to improve the sensitivity of high-densityoligonucleotide arrays when applied to heterologous species. *Plant Methods*, v. 1, 10 doi: 10.1186/1746-4811-1-10, 2005;

- Hofman P.J., Jobin-Decor M., Meiburg G.F., Macnish A.J., Joyce D.C. Ripening and quality responses of avocado, custard apple, mango and papaya fruit to 1-MCP. *Aust. J. Exp. Agric.*, v. 41: 567-572, 2001;
- Huber D.J. The role of cell wall hydrolases in fruit softening. *Hort. Rev.*, v. 5: p. 169-219, 1983;
- Kim H.J., Triplett B.A. Cotton fiber germin-like protein. I. Molecular cloning and gene expression. *Planta*, v. 218: p. 516-524, 2004;
- Kuhn E. From library screening to microarray technology: strategies to determine gene expression profiles and to identify differentially regulated genes in plants. *Annals of Botany*, v. 87: p. 139-155, 2001;
- Lazan H., Selamat M.K., Ali Z.M. Beta-galactosidase, polygalacturonase and pectinesterase in differential softening and cell-wall modification during papaya fruit ripening. *Physiologia Plantarum*, v. 95: p. 106-112, 1995;
- Lazan H, Ng SY, Goh LY, Ali ZM. Papaya beta-galactosidase/galactanase isoforms in differential cell wall hydrolysis and fruit softening during ripening. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 42: p. 847-853, 2004;
- López-Gómez R., Moralez-Domínguez F., Alcázar O.M., Gómez-Lim M.A. Identification of a Genomic Clone to ACC oxidase from Papaya (*Carica papaya* L.) and Expressions Studies. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52: p. 794-800, 2004;
- Manning K. Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits. *Planta*, v. 205: p. 622-631, 1998;
- Manrique G.D., Lajolo F.M. Cell-wall polysaccharide modifications during postharvest ripening of papaya fruit (*Carica papaya*). *Postharvest. Biol. Tech.*, v. 33: p. 11-26, 2004;
- Mason M.G., Botella J.R. Identification and characterisation of two 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase cDNAs expressed during papaya (*Carica papaya*) fruit ripening. *Aust. J. Plant Physiol.*, v.24: p.239-244, 1997;
- Medina-Escobar N., Cárdenas-Valpuesta V., Muñoz-Blanco J., Caballero J.L. Cloning and characterization of cDNAs from genes differentially expressed during the strawberry fruit ripening process by a MAST-PCR-SBDS method. *Analytical biochemistry*, vol. 248, p. 288-296, 1997;
- Miyazaki J.H., Yang S.F. The metionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, v. 69: p. 366-370, 1987;
- Moctezuma E., Smith D.L., Gross K.C. Effect of ethylene on mRNA abundance of three beta-galactosidase genes in wild type and mutant tomato fruit. *Postharvest. Biol. Technol.*, v. 28: p. 207-217, 2003;

- Moore S., Vrebalov J., Payton P., Giovannoni J. Use of genomics tools to isolate key ripening genes and analyse fruit maturation in tomato. *J. of Exp. Botany*, v. 53: p. 2023-2030, 2002;
- Moyano E., Encinas-Villarejo S., Lopez-Raez J.A., Redondo-Nevado J., Blanco-Portales R., Bellido M.L., Sanz C., Caballero J.L., Munoz-Blanco J. Comparative study between two strawberry pyruvate decarboxylase genes along fruit development and ripening, post-harvest and stress conditions. *Plant Science*, v. 166: p. 835-845, 2004;
- Oomen R.J.F.J., Bergervoet M.J.E.M., Bachem C.W.B., Visser R.G.F., Vincken J.P. Exploring the use of cDNA-AFLP with leaf protoplasts as a tool to study primary cell wall biosynthesis in potato. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 41: p. 965-971, 2003;
- Othman R., Choo T.S., Ali Z.M., Zainal Z., Lazan H. A full-length beta-galactosidase cDNA sequence from ripening papaya. *Plant Physiology*, v. 118: p. 1102, 1998;
- Paull R.E., Gross K., Qiu Y.X. Changes in papaya cell walls during fruit ripening. *Postharvest Biol. Tech.*, v. 16: p. 79-89, 1999;
- Paull R.E., Nishijima W., Reyes M., Cavaletto C. Postharvest handling and losses during marketing of papaya (*Carica papaya* L). *Postharvest Biol. Tech.*, v.11: p. 165-179, 1997;
- Petersen K., Didion T., Andersen C.H., Nielsen K.K. MADS-box genes from perennial ryegrass differentially expressed during transition from vegetative to reproductive growth. *J. of Plant Physiology*, v. 161: p. 439-447, 2004;
- Picton S., Barton S.L., Bouzayen M., Hamilton A.J., Grierson D. Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene. *Plant Journal*, v. 3: p. 469-481, 1993;
- Rast J.P., Amore G., Calestani C., Livi C.B., Ransick A., Davidson E.H. Recovery of developmentally defined gene sets from highdensity cDNA macroarrays. *Developmental biology*, v. 228: p. 270-285, 2000;
- Seymour G., Taylor J., Tucker G. Biochemistry of fruit ripening. Chapman & Hall, London, 1993;
- Sisler E.C., Alwan T., Goren R., Serek M., Apelbaum A. 1-substituted cyclopropenes: Effective Blocking Agents for Ethylene Action on Plants. *Plant Growth Reg.*, v. 40: 223-228, 2003;
- Sitrit Y., Bennett A.B. Regulation of Tomato Fruit Polygalacturonase mRNA Accumulation by Ethylene: A Re-Examination. *Plant Physiology* v. 116: p. 1145-1150, 1998;

- Smith H., Billett E., Giles A.B. The photocontrol of gene expression in higher plants
In: Smith H., ed. Regulation of enzyme synthesis and activity in higher plants.
San Diego, Academic Press, 1977, p. 93-125;
- Soh C.P., Ali Z.M., Lazan H. Characterisation of an alpha-galactosidase with
potential relevance to ripening related texture changes. *Phytochemistry*, v. 67:
p. 242-254, 2006;
- Speirs J., Brady C.J. Modification of gene expression in ripening fruit. *Aust. J. Plant
Physiol.*, v. 18: p. 519-532, 1991;
- Stitt M. Regulation of metabolism in transgenic plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.
Plant Molecular Biology*, v. 46: p. 431-468, 1995;
- Terrier N., Glissant D., Grimplet J., Barrieu F., Abbal P., Couture C., Ageorges A.,
Atanassova R., Leon C., Renaudin J.P., Dedaldechamp F., Romieu C., Delrot
S., Hamdi S. Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene
expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. *Planta*, v. 222: p.
832-847, 2005;
- Thompson J.E., Fry S.C. Evidence for covalent linkage between xyloglucan and
acidic pectins in suspension-cultured rose cells. *Planta* v. 211: p. 275-286,
2000;
- Trainotti L., Bonghi C., Ziliotto F., Zanin D., Rasori A., Casadoro G., Ramina A.,
Tonutti P. The use of microarray mu PEACH1.0 to investigate transcriptome
changes during transition from pre-climacteric to climacteric phase in peach
fruit. *Plant Science*, v. 170: p. 606-613, 2006;
- Trindade L.M., Horvath B.M., van Berloo R., Visser R.G.F. Analysis of genes
differentially expressed during potato tuber life cycle and isolation of their
promoter regions. *Plant Science*, v. 166: p. 423-433, 2004;
- Tucker G.A., Grierson D. Fruit ripening. In: The biochemistry of plants, vol. 12, p.
265-318, 1987;
- Wilkinson J.Q., Lanahan M.B., Conner T.W., Klee H.J. Identification of mRNAs with
enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain
reaction differential display. *Plant Molecular Biology*, v. 27: p. 1097-1108, 1995;
- Yong W.D., Link B., O'Malley R., Tewari J., Hunter C.T., Lu C.A., Li X.M., Bleecker
A.B., Koch K.E., McCann M.C., McCarty D.R., Patterson S.E., Reiter W.D.,
Staiger C., Thomas S.R., Vermerris W., Carpita N.C. Genomics of plant cell wall
biogenesis. *Planta*, v. 221: p. 747-751, 2005;
- Zheng X.W., Chen X.W., Zhang X.H., Lin Z.Z., Shang J.J., Xu J.C., Zhai W.X., Zhu
L.H. Isolation and identification of a gene in response to rice blast disease in
rice. *Plant Molecular Biology*, v. 54: p. 99-109, 2004.

CAPÍTULO 2

AMADURECIMENTO DO MAMÃO PAPAIA: RESPOSTA AO ETILENO E AO 1-MCP

2.1. RESUMO

O amadurecimento de frutos é um complexo processo bioquímico. O mamão papaia é uma fruta climatérica, a qual apresenta um rápido amolecimento de sua polpa durante o amadurecimento, afetando assim a qualidade pós-colheita. Neste capítulo, foi apresentado o estudo do amadurecimento do mamão papaia e os efeitos ocasionados pelo tratamento com etileno e 1-MCP. Foi mostrado que o tratamento com 100 ppm de etileno adiantou o amadurecimento do fruto, alterando especialmente as taxas de CO₂ e etileno liberados, assim como a redução da firmeza e o aumento do adoçamento da polpa. Já o tratamento com 100 ppb de 1-MCP, um inibidor de etileno, prolongou a vida de prateleira do fruto, porém as qualidades sensoriais não se mantiveram. Os níveis de CO₂ e etileno liberados permaneceram baixos, apesar de ter ocorrido um adoçamento da polpa durante o amadurecimento. Entretanto, o consumo do fruto ficou prejudicado pela discreta diminuição da textura da polpa, sugerindo que o tratamento com 100 ppb de 1-MCP logo após a sua colheita não representa uma ferramenta comercialmente favorável para retardar o amadurecimento.

2.2. INTRODUÇÃO

O amadurecimento afeta a qualidade final dos frutos tanto sensorial quanto nutricionalmente. Para frutas climatéricas, como é o caso de bananas, tomates, pêras e papaias, as mudanças ocorrem em um espaço de tempo curto (SEYMOUR, 1993). Dessa maneira, esses tipos de frutos estão sujeitos às perdas pós-colheita devido, principalmente, ao rápido amadurecimento ocasionado pelo hormônio etileno, que não só são produzidos pelo próprio fruto, mas também pelos frutos climatéricos com ele armazenados (BURG; BURG, 1962). Um modo de minimizar esses efeitos indesejáveis seria estocar separadamente da fonte produtora de etileno, porém não inibindo o efeito do etileno produzido pelo próprio fruto. Outro modo seria retirar quimicamente o etileno do ambiente de forma constante, através da oxidação com permanganato de potássio ou luz ultravioleta, entretanto essas técnicas possuem aplicações comerciais limitadas (HOFMAN *et al.*, 2001).

Uma nova abordagem para o aumento da vida de prateleira de frutos climatéricos baseia-se na inibição dos efeitos do etileno bloqueando seus receptores celulares quimicamente (BLANKSHIP; DOLE, 2003). Essas substâncias capazes de exercer esses bloqueios fazem parte de um grupo químico chamado de ciclopropenos, tendo o 1-metilciclopropeno (1-MCP) como o inibidor de etileno mais bem estudado (SISLER *et al.*, 2003). A ligação do 1-MCP aos receptores de etileno se dá de forma reversível para alguns frutos e irreversível para outros, e os efeitos em ambos os casos são perceptíveis por longos períodos de maturação. Os efeitos do 1-MCP já foram estudados em diversas frutas, como pêras (ARGENTA *et al.*, 2003), abacates, (ADKINS *et al.*, 2005), nectarinas (BREGOLI *et al.*, 2003) e mamão papaia (ERGUN; HUBER, 2004; HOFMAN *et al.*, 2001; JACOMINO *et al.*, 2002), apesar

desses resultados apresentarem diferenças entre cada frutos, tratando-se de eficiência comercial.

O mamão papaia (*Carica papaya*) variedade “Golden” é um fruto de especial relevância comercial para o Brasil, tanto no mercado interno quanto no mercado externo, e possui como principal característica a reduzida vida de prateleira devido ao rápido amolecimento da polpa do fruto. A variedade “Golden” apresenta qualidades sensoriais notórias adquiridas durante o amadurecimento, como a polpa macia e adocicada. Como o mamão papaia é um fruto climatérico, o aprimoramento das técnicas de pós-colheita é de fundamental importância para a diminuição das perdas e para a manutenção das características finais do fruto. Dessa maneira, esse capítulo discute os efeitos do etileno e do 1-MCP no amadurecimento do mamão papaia e a caracterização das amostras para as análises da expressão gênica visando melhorar a qualidade pós-colheita do fruto.

2.3. MATERIAIS E MÉTODOS

Frutos

Os frutos de mamão papaia (*Carica papaya*) analisados foram da variedade “Golden” com calibre 10 (tipo exportação), todos provindos de flores hermafroditas. Os frutos foram colhidos de plantios dos municípios de Sooretama e Linhares, ambos no estado do Espírito Santo, Brasil, e comercializados pela empresa Agra Pex Comércio Exterior LTDA (ES – Brasil) (www.agrapapaya.com). Os frutos foram colhidos com até $\frac{1}{4}$ de sua casca com coloração amarela, representados por, aproximadamente, 150 dias após a antese.

Os frutos foram obtidos em duas remessas, uma recebida no mês de Março

do ano de 2003 (amostragem I) e outra recebida no mês de Maio do ano de 2004 (amostragem II).

Amostragem I

Para amostragem I, um total de 80 frutos foram fornecidos com um dia após a colheita e em perfeito estado fito-sanitário não possuindo sinais evidentes de injúria ou doença. Um total de 40 frutos escolhidos aleatoriamente foram tratados com etileno (grupo tratados) e armazenados em câmara fechada de volume 240 dm³ com temperatura e umidade controladas (24°C ± 0,1°C e 95%, respectivamente) durante sete dias. Os 40 frutos restantes não passaram por nenhum tratamento (grupo controle) e foram armazenados em outra câmara sob as mesmas condições de temperatura e umidade (24°C ± 0,1°C e 95%, respectivamente) durante sete dias. A análise diária das amostras foi feita utilizando um total de 4 frutos para cada grupo. Para a análise de transcritos pela técnica de “*Differential Display-PCR*” descrita no **Capítulo 3**, foram utilizados os frutos do grupo controle, amostrados antes do tratamento com etileno, e aqueles amostrados 12 horas após o tratamento com etileno.

Amostragem II

Para amostragem II, um total de 180 frutos foram fornecidos com dois dias após a colheita e em perfeito estado fito-sanitário, não possuindo sinais evidentes de injúria ou doença. Um total de 40 frutos escolhidos aleatoriamente foram tratados com etileno, enquanto outros 80 frutos foram tratados com 1-MCP e armazenados em câmara fechada de volume 240 dm³ com temperatura e umidade controladas (24°C ± 0,1°C e 95%, respectivamente), durante cinco dias, no caso dos frutos

tratados com etileno, e onze dias para os frutos tratados com 1-MCP. Os 60 frutos restantes não passaram por nenhum tratamento (grupo controle) e foram armazenados em outra câmara sob as mesmas condições de temperatura e umidade ($24^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ e 95%, respectivamente) durante cinco dias. A análise diária das amostras foi feita utilizando um total de 4 frutos para cada grupo. Para a análise de transcritos pela técnica de *cDNA-AFLP* descrita no **Capítulo 4**, foram utilizadas amostras dos frutos do grupo controle (frutos sem tratamento algum), do grupo de frutos tratados com etileno e do grupo de frutos tratados com 1-MCP, todas amostras retiradas 12 horas após o início do tratamento com os gases. Já as amostras utilizadas nos experimentos de *XSpecies Microarray* (**Capítulo 5**) e do isolamento de fatores de transcrição (**Capítulo 6**), foram as dos frutos verdes e maduros sem nenhum tratamento (grupo controle).

Tratamento dos frutos com etileno

Os frutos escolhidos foram expostos a uma concentração de 100 ppm ($100 \mu\text{L L}^{-1}$) de etileno, em mistura com ar sintético, mantidos em fluxo constante durante 2 horas para a saturação do gás e mais 10 horas em sistema fechado. Transcorrido esse tempo, as amostras foram retiradas da câmara com etileno, ventiladas e armazenadas sob as mesmas condições de temperatura e umidade descritas anteriormente.

Tratamento dos frutos com 1-MCP

Os frutos escolhidos foram expostos a uma concentração de 100 ppb (100 nL L^{-1}) de 1-MCP, resultante da dissolução de duas porções de 18 mg de EthylBloc[®]

(0,14% ingrediente ativo, Floralife[®], Inc.) em dois frascos contendo 5 L de água destilada cada, durante 12 horas em sistema fechado. Transcorrido esse tempo, as amostras foram retiradas da câmara com 1-MCP, ventiladas e armazenadas sob as mesmas condições de temperatura e umidade descritas anteriormente.

Medidas de respiração e etileno

Para as medidas de CO₂ e etileno, os frutos foram acondicionados durante 1 hora em frascos plásticos individuais (1,7 L) hermeticamente fechados. Após esse período amostras gasosas de 10 mL para análise do etileno e 1 mL para análise do CO₂ foram coletadas do ambiente interno dos frascos. A composição de gases foi determinada por cromatografia gasosa (HP-6890) utilizando uma coluna HP-Plot Q (30 m, I.D. 0.53 mm), com injetor e detector a 250 °C e corrida isotérmica a 30 °C. Para a análise de etileno foi utilizado o detector de ionização de chama (FID), enquanto que para a análise do CO₂ foi utilizado o detector de condutividade térmica (TCD). As medidas foram feitas imediatamente após a chegada dos frutos ao laboratório, logo após o tratamento com os gases e diariamente a intervalos de 24 horas.

Medida da firmeza da polpa

Após as medidas de CO₂ e etileno, os frutos foram submetidos a análise da firmeza das polpas utilizando um texturômetro TA-XT2, (Stable MicroSystems[™]), com uma sonda em forma de faca (*“blade with knife”*). Para isso, foram retiradas da polpa de cada fruto três seções cilíndricas de 1 cm de altura e 1 cm de diâmetro distando 0,5 cm da casca. Cada seção da polpa dos frutos foi cortada com força e

velocidade constantes (20 gF e 2 mM/s, respectivamente). Os valores de resistência exercida pelas seções foram medidas e os valores máximos foram coletados. Após essa análise, as frações remanescentes dos frutos foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, misturadas para constituição de um “pool” e armazenadas a – 80 °C.

Medida dos açúcares solúveis

Os açúcares solúveis da polpa dos frutos da Amostragem II foram extraídos três vezes com etanol 80% a 80 °C. Após centrifugação, os sobrenadantes foram submetidos à vácuo (SpeedVac®) para evaporação do etanol. Os resíduos foram reconstituídos em água milli-Q deionizada, filtrados (0.22 µm) e analisados por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) com detector pulso-amperométrico, utilizando coluna *CarboPac* PA₁ (4 mm X 250 mm, HPAE-PAD – Dionex, Sunnyvale, CA, USA) em análise isocrática com fase móvel 18 mM NaOH durante 25 minutos, utilizando como valor de vazão constante de 1 mL/min. A quantificação dos açúcares se deu pela comparação dos cromatogramas e curvas dos respectivos padrões externos. O valor de açúcares solúveis totais foi dado pela soma dos valores de glicose, frutose e sacarose.

2.4. RESULTADOS

Frutos

Os frutos das amostragens I e II foram recebidos da empresa em perfeitas condições fito-sanitárias, com boa qualidade e homogeneidade no lote, estando todos com aproximadamente 25 % da cor da casca amarela. Após armazenamento

em câmaras com temperatura e umidade controladas e após o tratamento com os gases, os frutos foram deixados amadurecerem e as análises de CO₂, etileno e textura da polpa foram encerradas quando os frutos apresentaram sinais de avançada senescência ou podridão, ou seja, estavam inadequados para consumo. Alguns destes sinais foram infestações por fungos no pedúnculo, escurecimento da casca e excessivo amolecimento da polpa e casca. Para amostragem I, as análises dos frutos controle e tratados com etileno foram encerradas no oitavo dia pós-colheita, quando estes sinais se tornaram evidentes. Para amostragem II, as análises dos frutos não-tratados (controle) e tratados com etileno foram encerradas no sétimo dia pós-colheita, quando os sinais de senescência e podridão se tornaram evidentes. No grupo de frutos tratados com 1-MCP, a infestação por fungos no pedúnculo foi evidenciada no décimo terceiro dia pós-colheita, o que determinou o encerramento das análises.

Amostragem I

Como pode ser observado na **Figura 3**, o grupo de frutos controle apresentou as mudanças esperadas nas cores da casca e polpa, além de apresentarem mudanças características do climatério de frutos carnosos (firmeza da polpa, síntese de etileno e taxas de respiração) após o 4º dia depois da colheita. Já o grupo de frutos tratados apresentou mudanças logo após o tratamento com etileno, sendo que as taxas de CO₂ e etileno liberados aumentaram, enquanto a firmeza da polpa diminuiu, mostrando que o tratamento com etileno pareceu ter adiantado muitas transformações nos frutos de mamão papaia que seriam alcançadas apenas durante o amadurecimento normal do fruto.

Figura 3. Efeito do tratamento com etileno no amadurecimento do mamão papaia. Amostras de frutos não-tratados (CONTROLE, $\square$) e tratados com etileno (ETILENO, $\circ$) tiveram o amadurecimento acompanhado pelas medidas dos seguintes parâmetros: Quantidade de CO_2 produzido pelo fruto medido por cromatografia gasosa com detetor de condutividade térmica ($\text{CO}_2 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$); Etileno produzido pelo fruto medido por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (Etileno $\mu\text{L Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$); Textura da polpa avaliada com texturômetro (N cm^{-2}). As linhas tracejadas verticais indicam o fim do período tratamento com etileno (12 horas). D.P.C.:Dias Pós-Colheita. As barras verticais representam o erro padrão das medidas. ($n=4$).

Dentre as mudanças marcantes observadas nos frutos, o tratamento com etileno adiantou uma transformação bastante importante para o transporte e o consumo do mamão papaia, o amaciamento da polpa. Logo ao final do tratamento os frutos apresentaram um decréscimo na firmeza da polpa que foi suficiente para torná-los adequados para o consumo *in natura*. Essa mudança ocorreu de maneira simultânea com as mudanças observadas nas taxas de respiração e etileno, isto é, o fruto respondeu de forma imediata ao tratamento com etileno.

Amostragem II

Como apresentado na **Figura 4**, a diminuição da textura da polpa do grupo de frutos controle ocorreu no 4º dia pós-colheita, mesmo dia em que ocorreu a mudança da coloração da casca para totalmente amarela.

A maior produção de etileno se deu também no 4º dia pós-colheita, seguido pelo aumento na produção de CO₂, a qual foi máxima no 5º dia pós-colheita. Os pequenos desvios observados nas medidas da textura, liberação de etileno e respiração do grupo de frutos controle podem ser tomados como a confirmação da qualidade e homogeneidade dos frutos. Os frutos tratados com etileno tiveram a respiração manifestada de forma mais pronunciada quando comparada com a do grupo de frutos controle, evidenciado pela produção máxima de CO₂ também no 5º dia pós-colheita. Porém, o início da diminuição da textura da polpa e a maior produção de etileno foram adiantados em um dia, sendo observados no 2º dia e meio e no 3º dia pós-colheita, respectivamente.

Figura 4: Efeito do tratamento com etileno e com 1-MCP no amadurecimento do mamão papaia. Amostras de frutos dos grupos controle (CONTROLE, □), tratados com etileno (ETILENO, ○) e tratados com 1-MCP (1-MCP, △) tiveram o amadurecimento acompanhado pelas medidas dos seguintes parâmetros: Quantidade de CO₂ produzido pelos frutos medido por cromatografia gasosa com detector de condutividade térmica (de CO₂ mg Kg⁻¹ h⁻¹); Quantidade de etileno produzido pelos frutos medido por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (etileno μL Kg⁻¹ h⁻¹); Medida da textura da polpa efetuada com texturômetro (N cm⁻²). As duas linhas tracejadas verticais indicam o fim do tratamento por 12 horas com os gases etileno ou 1-MCP. D.P.C.:Dias Pós-Colheita. Barras verticais representam o erro padrão (n= 4).

A cor da casca dos frutos tratados com 1-MCP passou de verde para totalmente amarela de forma mais vagarosa (11º dia pós-colheita) quando comparado com os frutos controle e tratados com etileno. Porém as análises da produção de etileno e respiração não revelaram diferenças significativas quando comparados aos valores iniciais, e a análise da textura apresentou uma discreta queda. O término das análises se deu em razão da infestação do pedúnculo dos frutos por fungos, o único sinal de podridão observado. Além da observação da transformação da cor da casca durante o amadurecimento, a polpa também apresentou transformações, como a mudança de cor, passando de rósea para totalmente vermelha, o leve adoçamento e aromatização, porém com consistência característica de “borracha” como observada pela discreta diminuição da textura.

A **Figura 5** mostra a curva dos valores de açúcares solúveis, glicose e frutose durante o amadurecimento do mamão papaia. O teor de açúcares solúveis aumentou duas vezes e meia durante o amadurecimento, independentemente do tratamento efetuado. Para o grupo de frutos controle, o nível máximo de açúcares solúveis foi coincidente com o climatério respiratório e com o decréscimo da firmeza da polpa. Apesar do tratamento com etileno ter antecipado o incremento do conteúdo de açúcares solúveis, níveis similares ao grupo de frutos controle foram atingidos apenas ao final do amadurecimento. Já no grupo de frutos tratados com 1-MCP, o acúmulo de açúcares se deu em todo o processo de amadurecimento, resultado em valores similares aos do grupo controle.

Figura 5: Conteúdo de açúcares solúveis medidos durante o amadurecimento do mamão papaia. O perfil do conteúdo de açúcares solúveis foi traçado para os grupos de frutos controle (CONTROLE, □), tratados com etileno (ETILENO, ○) e tratados com 1-MCP (1-MCP, △). Quantidade de açúcares solúveis e sacarose representada pelos gráficos em barras (ordenadas da esquerda). Quantidade de glicose + frutose representada pelos gráficos em linha (ordenadas da direita). As duas linhas tracejadas verticais indicam o fim do tratamento por 12 horas com os gases etileno ou 1-MCP. FW: Massa fresca. D.P.C.: Dias Pós-Colheita. Barras verticais representam o erro padrão (n= 4).

Quando os principais açúcares que contribuem para o conteúdo dos açúcares solúveis totais foram analisados, notou-se que os conteúdos de glicose e frutose aumentaram durante o amadurecimento nos três grupos de frutos, como já observado anteriormente em outros experimentos (GOMEZ; LAJOLO; CORDENUNSI, 1999, 2002). Apesar do início do evento de acúmulo de monossacarídeos diferirem entre os grupos, os perfis dos níveis de glicose e frutose foram similares. Em contrapartida, foram observadas diferenças nos níveis de sacarose nos três diferentes grupos, não só na evolução durante o amadurecimento,

mas também na quantidade máxima e final do dissacarídeo. Enquanto o conteúdo de sacarose decai ao final do amadurecimento do grupo controle, o conteúdo no grupo de frutos tratados com 1-MCP incrementou em até duas vezes no mesmo período. Os frutos tratados com etileno também apresentaram altas concentrações de sacarose, porém as mudanças observadas durante o amadurecimento foram as mais dramáticas.

2.5. DISCUSSÃO

Amostragem I

A análise dos gráficos de amadurecimento do mamão papaia, tanto no grupo controle quanto no grupo tratado com etileno, revelou o climatério dos frutos, culminando nas várias transformações típicas da espécie, como o amaciamento da polpa, por exemplo.

A variação nas taxas de respiração de ambos os grupos mostra que os frutos tratados com etileno tiveram seu metabolismo acelerado retornando aos níveis basais dias após o tratamento e elevando-se novamente no mesmo dia que o grupo controle. Desse modo, parece que o tratamento com etileno, apesar de mudanças na textura e aumento pontual da respiração e etileno, não alterou a programação natural para a instalação do climatério respiratório dos frutos tratados.

Já a variação das taxas de etileno observada logo ao final do tratamento (indicado nos gráficos por uma linha vertical) pode ser explicada pela retenção do hormônio exógeno empregado no tratamento, o qual teria ficado retido no interior dos frutos e quando estes foram deixados por uma hora em frascos hermeticamente fechados o gás pode ter sido liberado no ambiente de análise. Contudo, não se pode

descartar que as enzimas ACC sintase e ACC oxidase tenham sido temporariamente estimuladas de forma pontual devido à presença do etileno exógeno aplicado, estando de acordo com a síntese auto-catalítica do etileno em frutos climatéricos (SEYMOUR *et al.*, 1993, ADAMS-PHILIPS; BARRY; GIOVANNONI, 2004). Entretanto, o retorno aos níveis basais de etileno, quando comparados com o grupo controle, sugere que uma diminuição na síntese do hormônio ocorreu, provavelmente devido à programação natural do climatério nos frutos.

A rápida resposta dos frutos ao tratamento com etileno sugere que muitas enzimas possuem sua regulação gênica dependente do hormônio etileno, inclusive enzimas ligadas à degradação de parede celular. Em revisão feita por Brummell e Hapster (2001), certas enzimas que possuem como função despolimerizar cadeias lineares e ramificadas de pectinas da matriz (poligalacturonase e β -galactosidases, respectivamente) podem ser reguladas pelo hormônio etileno, corroborando o fato que o tratamento dos frutos com esse hormônio diminuiu a firmeza da polpa.

Devido a esses resultados relativos à respiração, etileno produzido e textura, a amostra obtida logo após o tratamento com o etileno (um dia e meio após a colheita) foi escolhida para a análise diferencial de transcritos em comparação com a amostra antes do tratamento com etileno (um dia pós-colheita). Dessa maneira, considerou-se que muitos genes etileno-dependentes tiveram sua expressão alterada logo após o tratamento com etileno, aumentando a possibilidade de isolamento de fragmentos correspondentes a esses genes, que por sua vez podem ter relação com o amadurecimento do mamão papaia.

Amostragem II

Devido aos resultados obtidos nos experimentos realizados com a amostragem I, cujo tratamento com etileno acelerou muitas transformações peculiares ao amadurecimento do mamão papaia, a amostragem II consistiu na aquisição de novos frutos, e além do tratamento com etileno, efetuou-se o tratamento dos frutos com um antagonista do etileno, o 1-MCP (SISLER *et al.*, 2003). A decisão para o tratamento dos frutos com essa substância foi baseada nas mudanças pontuais causadas pelo tratamento com etileno e na estimativa da dependência que vários eventos podem ter em relação a esse hormônio. Já para a análise da expressão de genes etileno-dependentes e com função no amadurecimento do fruto, o resultado da possível diferença de números de transcritos poderia ser confirmado não apenas pela visualização do contraste com os transcritos da amostra controle, mas pelo contraste com uma amostra cujo gene poderia ter sido silenciado graças ao tratamento com 1-MCP.

A análise dos gráficos da **Figura 4** sugere novamente que enzimas relacionadas à degradação de parede celular tenham sido estimuladas pelo hormônio etileno, pois quando este foi aplicado houve uma diminuição da firmeza da polpa dos frutos, e quando um inibidor de etileno foi usado, não houve variação na firmeza da polpa. O 1-MCP, ao se ligar nos receptores de etileno (SISLER *et al.*, 2003) pode ter inibido a transcrição ou tradução de genes relacionados à degradação de parede celular. Porém, o 1-MCP parece não ter inibido a degradação de clorofila da casca de mamão papaia, evidenciada pela mudança na coloração da casca dos frutos, passando de verde para totalmente amarela, comportamento semelhante aos daqueles observados em experimento realizado por Jacomino *et al.* (2002). Porém, as análises da produção de etileno e respiração não revelaram

diferenças significativas quando comparados aos valores iniciais e a análise da textura da polpa revelou um discreto decréscimo, sugerindo uma diminuição do metabolismo dos frutos devido, provavelmente, à ligação do 1-MCP nos receptores de etileno, inibindo assim a atuação desse hormônio (SISLER *et al.*, 2003).

Os perfis de glicose e frutose nos três grupos de frutos apresentados na **Figura 5** podem ser um indício de que esses monossacarídeos são provenientes da hidrólise da sacarose, especialmente pela ação das invertases (GOMEZ *et al.*, 2002, ZHOU *et al.*, 2003). De fato, um aumento em monossacarídeos foi concomitante com uma diminuição de dissacarídeos, e para os frutos controle e tratados com etileno, um significativo decréscimo em sacarose foi notado concomitante ao pico de produção de etileno, o que sugere um efeito positivo desse hormônio na atividade de invertases. Entretanto, não se pode afirmar que o gene da invertase seja etileno-dependente, mas etileno-responsível, pois uma vez que a produção desse hormônio diminuiu a níveis próximos do zero no grupo tratados com 1-MCP, foi observado um leve aumento nos níveis de glicose e frutose.

A quantidade de açúcares solúveis aumenta durante o amadurecimento para os frutos do grupo controle e tratados com etileno e diminui ao final do experimento, assim como observado também para frutos irradiados (GOMEZ *et al.*, 1999). Como a quantidade de amido existente no mamão papaia não acresce no acúmulo de açúcares solúveis, é possível especular que alguns mecanismos de degradação de parede celular (LAZAN *et al.*, 1995, ALI *et al.*, 2004) ou metabolismo de ácidos orgânicos, podem prover fonte de carbono para síntese de açúcares, inclusive a sacarose. Entretanto, o aumento de sacarose nos frutos tratados com 1-MCP (e não a diminuição, como foi observado para os frutos controle e tratados com etileno), somado à não diminuição da firmeza da polpa, sugere que o mecanismo de síntese

de sacarose continua operante durante o amadurecimento dos frutos, pelo menos para os frutos tratados com 1-MCP, apesar dos níveis de síntese se apresentarem menores quando comparados com os de frutos em desenvolvimento (ZHOU; PAULL, 2001).

Devido às mudanças observadas nos frutos tratados com etileno e 1-MCP, as amostras escolhidas para a análise diferencial dos transcritos foram aquelas com 12 horas após o tratamento com os gases, inclusive para as amostras do grupo de frutos controle. O tratamento com etileno acelerou muitas mudanças e as chances de se isolar fragmentos de genes etileno-dependentes aumentam logo após o tratamento com esse gás. Dessa maneira, o tratamento com 1-MCP serviu não só para aumentar a vida de prateleira do mamão papaia, mas também para se observar quais mudanças nas quantidades de transcritos esse tipo de tratamento acarretaria quando comparados com os frutos controle e tratados com etileno.

2.6. CONCLUSÃO

O tratamento com etileno estimulou diversas reações em favor do amadurecimento e a inibição da ação desse hormônio pelo 1-MCP diminuiu de forma considerável as transformações típicas do climatério do fruto, aumentando a vida pós-colheita, porém comprometendo o amaciamento da polpa. Baseado nesses fatos pode-se concluir que as principais reações do amadurecimento do fruto, como o amolecimento da polpa, são controladas pelo hormônio etileno, e que sua inibição pode retardar o amadurecimento. Contudo, o tratamento dos frutos com a concentração de 100 ppb de 1-MCP não se mostrou como uma ferramenta comercialmente favorável para retardar o amadurecimento, pois a não diminuição da

firmeza da polpa do mamão papaia comprometeu o consumo desse fruto.

2.7. AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio Gioielli e ao Dr. Chiu Ming do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutico (FCF-USP) pelo uso do texturômetro, e às técnicas Tânia Shiga e Márcia Moraes pela ajuda na análise de açúcares solúveis.

2.8. REFERÊNCIAS

- Adams-Philips L., Barry C., Giovannoni J. Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends in Plant Science*, v. 9: p. 331-338, 2004;
- Adkins M.E., Hofman P.J., Stubbings B.A., Macnish A.J. Manipulating avocado fruit with 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biol. Technol.*, v. 35: 33-42, 2005;
- Ali Z.M., Chin L.H., Lazan H. A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits. *Plant Science*, v. 167: 317-327, 2004;
- Argenta L.C., Fan X.T., Mettheis J.P. Influence of 1-methylcyclopropene on ripening, storage life, and volatile production by d'Anjou cv. pear fruit. *J. Agric. Food Chem.*, v. 51: 3858-3864, 2003;
- Blankenship S.M., Dole J.M. 1-methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biol. Technol.*, v. 28: 1-25, 2003;
- Bregoli A.M., Ziosi V., Biondi S., Rasori A., Ciccioni M., Costa G., Torrigiani P. Postharvest 1-methylcyclopropene application in ripening control of 'Stark Red Gold' nectarines: Temperature-dependent effects on ethylene production and biosynthetic gene expression, fruit quality, and polyamine levels. *Postharvest Biol. Technol.*, v. 37: 111-121, 2003;
- Brummell D.A., Harpster M.H. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, v. 47: 311-340, 2001;
- Burg S.P., Burg E.A. Role of ethylene in fruit ripening. *Plant Physiol.*, v. 37: 179-189, 1962;

- Ergun M., Huber D.J. Suppression of ethylene perception extends shelf-life and quality of "Sunrise Solo" papaya fruit at both pre-ripe and ripe stages of development. *Europ. J. Hort. Sci.*, v. 69: 184-192, 2004;
- Gomez M., Lajolo F.M., Cordenunsi R.B. Evolution of soluble sugars during ripening of papaya fruit and its relation to sweet taste. *J. Food Sci.*, v. 67: 442-447, 2002;
- Gomez M.L.P.A., Lajolo F.M., Cordenunsi B.R. Metabolismo de carboidratos durante o amadurecimento do mamão (Carica papaya L. cv. Solo): influência da radiação gama. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 19: 246-252, 1999;
- Hofman P.J., Jobin-Decor M., Meiburg G.F., Macnish A.J., Joyce D.C. Ripening and quality responses of avocado, custard apple, mango and papaya fruit to 1-MCP. *Aust. J. Exp. Agric.*, v. 41: 567-572, 2001;
- Jacomino P.P., Kluge R.A., Brackmann A., de Camargo e Castro P.R. Amadurecimento e Senescência de Mamão com 1-metilciclopropeno. *Scientia Agricola*, v. 59: p. 303-308, 2002,
- Lazan H., Selamat M.K., Ali Z.M. Beta-galactosidase, polygalacturonase and pectinesterase in differential softening and cell-wall modification during papaya fruit ripening. *Physiologia Plantarum*, v. 95: 106-112, 1995;
- Paull R.E., Gross K., Qiu Y.X. Changes in papaya cell walls during fruit ripening. *Postharvest Biol. Technol.*, v. 16: 79-89, 1999;
- Seymour G., Taylor J., Tucker G. Biochemistry of fruit ripening. Chapman & Hall, London, 1993;
- Sisler E.C., Alwan T., Goren R., Serek M., Apelbaum A. 1-substituted cyclopropenes: Effective Blocking Agents for Ethylene Action on Plants. *Plant Growth Reg.*, v. 40: 223-228, 2003;
- Zhou L.L., Chen C.C., Ming R., Christopher D.A., Paull R.E. Apoplastic invertase and its enhanced expression and post-translation control during fruit maturation and ripening. *J. A. Soc. Hort. Sci.*, v. 128: 628-635, 2003;
- Zhou L.L., Paull R.E. Sucrose metabolism during papaya (Carica papaya) fruit growth and ripening. *Amer. Soc. Hort. Sci. J.*, v. 126: 351-357, 2001.

CAPÍTULO 3

ANÁLISE DIFERENCIAL DA EXPRESSÃO GÊNICA DURANTE O AMADURECIMENTO DO MAMÃO PAPAIA UTILIZANDO *DIFFERENTIAL DISPLAY-PCR*

3.1. RESUMO

O mamão papaia é um fruto que sofre grandes modificações durante o amadurecimento. Pouco é conhecido sobre a regulação gênica do amadurecimento desse fruto, e uma análise de transcritos diferencialmente expressos poderia contribuir para aumentar esse entendimento. A técnica de *DD-PCR* representa uma alternativa não dispendiosa e com bons resultados obtidos na literatura. Dessa maneira, para a tentativa de isolamento de genes possivelmente candidatos à expressão diferencial durante o amadurecimento do mamão papaia, empregou-se a técnica de *DD-PCR* para analisar frutos não-tratados e tratados com o hormônio de amadurecimento etileno. Uma técnica de triagem dos fragmentos foi efetuada (*Northern Blot* Reverso), eliminando assim os falso-positivos, tornando a técnica de *DD-PCR* mais reprodutível. Dessa maneira, foram isolados alguns genes potencialmente interessantes ao amadurecimento, em especial o gene de uma endopoligalacturonase, enzima relacionada ao metabolismo de parede celular e lamela média e, conseqüentemente, desempenha papel importante no amolecimento da polpa dos frutos.

3.2. INTRODUÇÃO

A análise diferencial de transcritos tem sido utilizada largamente para o isolamento de genes com possíveis alterações de expressão e que sejam fundamentais para certos tipos de reações bioquímicas (KUHN, 2001). O uso de abordagens baseadas na amplificação desses genes utilizando a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) tem crescido devido ao aprimoramento de equipamentos e enzimas. A técnica de *Differential Display-PCR* (DD-PCR), primeiramente descrita por Liang e Pardee (1992), se baseia no pareamento de um dos *primers* (*primer* aleatório) ao acaso nas simples fitas de cDNA e, através da amplificação no primeiro ciclo de PCR, novas fitas de DNA com uma porção poliadenilada na extremidade 3' são sintetizadas. Numa segunda etapa, os *primers* T, caracterizados por apresentarem uma seqüência politimínica, se pareiam à porção 3' poliadenilada e uma nova extensão da fita de DNA ocorre. Os ciclos restantes da técnica aumentam o número de cópias das duplas-fitas de DNA, e uma eletroforese desnaturante separa os fragmentos por peso molecular.

Muito autores já utilizaram essa técnica para a descoberta de genes em vegetais (KIM; TRIPLET, 2004; MEDINA-ESCOBAR *et al.*, 1997; MOYANO *et al.*, 2004; PETERSEN *et al.*, 2004; WILKINSON *et al.*, 1995), confirmando que apesar do custo relativamente baixo e menor complexidade, a técnica pode render bons resultados, sendo possível a detecção de pequenas variações na expressão gênica ou detecção de genes pouco expressos.

O mamão papaia é um fruto muito importante para o mercado nacional e exportação, contudo, pouco se sabe das modificações genéticas advindas do amadurecimento do fruto, e uma abordagem transcriptômica mais simples poderia

ser o início de trabalhos direcionados à melhoria da qualidade pós-colheita dos frutos. Baseados nesses fatos, a técnica de *DD-PCR* foi utilizada para a tentativa de isolamento de fragmentos de genes diferencialmente expressos durante o amadurecimento do mamão papaia utilizando amostras caracterizadas no capítulo anterior.

3.3. MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

As amostras de frutos utilizadas nos experimentos descritos nesse capítulo foram caracterizadas na Amostragem I do **Capítulo 2**. As amostras caracterizadas nesse capítulo mostraram que as técnicas de tratamento dos frutos com etileno, além de empregadas na fisiologia pós-colheita, podem ser utilizadas nas análises de amostras com padrão de expressão gênica alterado, pois genes essenciais ao metabolismo do amadurecimento do mamão papaia podem ser mais facilmente isolados através da comparação de frutos não-tratados com frutos tratados.

Dessa maneira, a análise diferencial da expressão gênica foi feita comparando os transcritos de dois grupos de frutos distintos: a amostra controle (frutos não-tratados, primeiro dia pós-colheita, **Figura 3**, página 32) e a amostra tratada com etileno (frutos tratados com etileno, primeiro dia e meio pós-colheita, **Figura 3**, página 32). A escolha dessas duas amostras se deu pela distinção na textura da polpa, cuja amostra tratada com etileno apresentou firmeza da polpa bastante reduzida quando comparada com a amostra controle.

Primers

>primer oligo (dT)₁₂₋₁₈

>Oligonucleotídeo dC₁₀T₃₀

>P₆: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGTG-3'

>P₁₀: 5'-ATTAACCCTCACTAAAGCACCGTCC-3'

>P₁₁: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGTGGGAGC-3'

>T₁: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTAA-3'

>T₂: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTAC-3'

>T₃: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTAG-3'

>T₄: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTCA-3'

>T₅: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTCC-3'

>T₆: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTCG-3'

>T₇: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTGA-3'

>T₈: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTGC-3'

>T₉: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTGG-3'

Extração de RNA total

O RNA total dos frutos foi extraído segundo Lopez-Gómez e Gómez-Lim (1992), com algumas modificações. Cinco gramas de polpa de mamão em cada estágio foram triturados em nitrogênio líquido e homogeneizados com o tampão de extração tris-borato 150 mM pH 7,5 contendo EDTA 1 mM, SDS 2%, 2-mercaptoetanol 1%. Uma primeira centrifugação (10.000g, 10 minutos) foi feita para retirada de material insolúvel, e ao sobrenadante foram adicionados 0,25 volume de etanol absoluto e 0,1 volume de acetato de potássio 5M. Após agitação em vórtex por 1 minuto, foi adicionado 1 volume de clorofórmio, nova agitação em vórtex e centrifugação (10.000g, 10 minutos). O sobrenadante foi recuperado e a ele adicionado 1 volume de solução fenol-clorofórmio, saturado em tampão tris-HCl pH

7,5, seguido de centrifugação a 10.000g por 10 minutos. À fase aquosa, recuperada em novo tubo, foi adicionada 1 volume de clorofórmio e feita nova centrifugação a 10.000g por 10 minutos. Ao sobrenadante, adicionou-se 0,43 volume de cloreto de lítio 10M, e esta mistura ficou incubada a noite inteira a -20°C. Após centrifugação a 10000g por 1 hora, ressuspendeu-se o precipitado em 200 µL de tampão TE (Tris-HCl 0,01 M pH 8 e EDTA 0,001 M), e novamente precipitado com 0,1 volume de acetato de sódio 3M e 2,5 volumes de etanol absoluto, e incubados a -20°C por 2 horas no mínimo. Após centrifugação a 10.000g por 1 hora, o precipitado foi ressuspendido em água estéril, seguindo-se da quantificação e verificação da qualidade e integridade dos ácidos nucléicos extraídos.

Quantificação de ácidos nucléicos

Os ácidos nucléicos foram quantificados por espectrofotometria (SAMBROOK *et al.*, 1989), tendo como referência o fato de que a absorbância de uma amostra de 40 µg/mL de RNA ou 50 µg/mL de DNA a 260 nm possui valor igual a 1. As amostras de ácidos nucléicos foram diluídas em tampão TE (Tris-HCl 0,01 M pH 8 e EDTA 0,001 M).

Análise da qualidade e integridade de ácidos nucléicos

A análise da qualidade dos ácidos nucléicos foi feita com base na razão da leitura das absorbâncias a 260nm e 280nm (260 nm/280 nm), considerando que os valores de amostras puras devem ser 1,8 para DNA e 2,0 para RNA (SAMBROOK *et al.*, 1989). A análise da integridade dos ácidos nucléicos foi feita por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo em tampão Tris-fosfato

0,09 M pH 8 e EDTA 0,002 M (SAMBROOK *et al.*, 1989), realizada a 80 V durante 25 minutos.

Síntese do cDNA fita simples

A partir de 5 µg de RNA mensageiro purificado, foi sintetizado o cDNA fita simples de cada grupo de frutos através da técnica de transcrição reversa utilizando o kit “SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR” (Invitrogen™), segundo as instruções do fabricante e utilizando o *primer* oligo (dT)₁₂₋₁₈.

Amplificação seletiva dos genes

O uso da técnica de DD-PCR se deu como descrito por Diachenko *et al.* (1996). Amostras de cDNA dos frutos do grupo controle e tratados com etileno da amostragem I foram submetidos a amplificação pela técnica de PCR, utilizando combinações de um dos três *primers* aleatórios “sense” P₆, P₁₀ e P₁₁ (1 µM) com cada um dos nove *primers* “antisense” a 1 µM em presença de 3 mCi de [α -³²P]dCTP (3.000 Ci / mmol) e 50 µM de dNTP em 10 µL de reação em tampão Tris-HCl 20 mM (pH 8,4) contendo KCl 50 mM, MgCl₂ 0,35 mM e 1 unidade da enzima *Taq* polimerase. O programa utilizado para amplificação das amostras consistiu de uma incubação a 94 °C / 5 min, 40 °C / 5 min, 68 °C / 5 min, 2 ciclos de incubação a 94 °C / 2 min, 40 °C / 5min, 68 °C / 5min e 22 ciclos de incubação a 94 °C / 1 min, 60 °C / 1 min, 68 °C / 9 min.

Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes foi utilizada para separar as amostras de cDNA amplificados. As amostras foram

divididas em duplicatas, adicionadas de um volume de *stop solution* (formamida 98%, EDTA 0,01 M, azul de bromofenol 0,025% e xileno cianol 0,025%), aquecidas a 95 °C, resfriadas em gelo e submetidas à separação em géis de poliacrilamida utilizando a cuba de eletroforese “Sequi-Gen[®] II Nucleic Acid Sequencing Cell” (BioRad[®]). As eletroforeses foram efetuadas em gel de poliacrilamida a 5% em tampão Tris-borato 0,045 M (pH 8) e EDTA 0,001 M contendo uréia (7 M) e temperatura constante de 50 °C por um total de 2 horas e 30 minutos. Terminadas as eletroforeses, os géis de poliacrilamida foram retirados da cuba, transferidos para folhas de papel 3 MM e embalados com filme plástico. Estes foram expostos a filmes radiográficos por 16 horas a –80 °C. Após serem revelados, os filmes foram realinhados com os géis para isolamento e posterior reamplificação das bandas diferencialmente expressas .

Isolamento e reamplificação das bandas diferencialmente expressas

Os fragmentos que visivelmente apresentavam diferença em sua expressão foram recortados com bisturi estéril e ressuspensos em 200 µL de água estéril. Após terem sido mantidas a 4 °C por 16 horas, as amostras foram incubadas a 95 °C por 5 minutos e resfriadas em gelo. A reamplificação dos fragmentos retirados do gel de poliacrilamida foi feita por PCR de uma alíquota de 1 µL da amostra utilizando a mesma combinação dos *primers* empregados na reação que originou o fragmento, utilizando 10 µM de cada *primer*, em tampão Tris-HCl 20 mM (pH 8,4) na presença de 50 µM de dNTP contendo KCl 50 mM, MgCl₂ 0,7 mM e 1 unidade da enzima *Taq* polimerase em um total de 20 µL de reação. O programa utilizado constituiu de 35 ciclos a 94 °C / 1 min, 60 °C / 1 min e 72 °C / 2 min. As reações foram submetidas a

eletroforeses em gel de agarose e as bandas foram cortadas e purificadas com o kit “GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification” (Amersham Biosciences®), sendo retomados em 50 µL de água estéril.

Northern Blot Reverso

Os fragmentos isolados, após reamplificação e purificação do gel de agarose, foram diluídos para 900 µL em tampão 20 X SSC (citrato de sódio 3 M pH 7, NaCl 3 M) e alíquotas de 450 µL foram aplicadas em duas membranas de transferência de ácidos nucleicos (Hybond™-N+ da Amersham Pharmacia Biotech®) com auxílio de vácuo e por meio do aparato “Bio-Dot® Microfiltration Apparatus” (BioRad®). Para normalização, amostras de seqüências parciais de 2 genes constitutivos (actina e tubulina) foram utilizadas como controle, sendo aplicadas a cada uma das membranas. Após a transferência, as membranas foram colocadas na superfície de uma solução de desnaturação (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M) por 5 minutos para separação das fitas duplas de DNA e logo após em uma solução de neutralização (Tris-HCl 0,5 M pH 7,2, NaCl 1,5 M e EDTA 0,001 M) por 1 minuto. As fitas desnaturadas dos fragmentos foram fixadas nas membranas por exposição à luz ultravioleta (120.000 µJ/cm²) em uma câmara Hoefer® UVC 500.

Amostras de cDNA dos frutos controle e tratados com etileno (amostragem I) foram sintetizadas para atuar como sondas radioativas e assim indicar a abundância relativa de mRNA. Para isso, alíquotas de RNA total das amostras foram tomadas para síntese de cDNA, utilizando o kit “SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR” (Invitrogen™), em presença de 50 mCi de [α -³²P]dCTP (3.000 Ci / mmol). As sondas foram purificadas por cromatografia de filtração em gel em

colunas AutoSeqTM G50 (Amersham Pharmacia Biotech[®]) e desnaturadas por incubação a 100 °C por 5 minutos antes da adição às soluções de hibridização.

As membranas foram bloqueadas por incubação em 25 mL de solução de pré-hibridização contendo 5X SSC (citrato de sódio 0,75 M pH 7 e NaCl 0,75 M), 5X solução de Denhardt's, SDS 0,5% e 500 µg de DNA não-homólogo (DNA de salmão) durante 1 hora a 65 °C. Decorrido esse período as sondas desnaturadas foram adicionadas às soluções e as membranas foram incubadas a 65 °C durante 12 horas para hibridização. Terminada essa etapa, as membranas foram lavadas em 2X SSC (citrato de sódio 0,3 M pH 7 e NaCl 0,3 M) e SDS 0,1% durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguida de lavagem final com uma solução contendo 1X SSC (citrato de sódio 0,15 M pH 7 e NaCl 0,15 M) e SDS 0,1% durante 15 minutos a 65 °C.

Terminada a lavagem, cada membrana foi retirada da solução, foi envolta em filme plástico e exposta a filmes radiográficos por 4, 6 e 8 horas a -80 °C. Após esses períodos de exposição os filmes foram retirados e revelados, sendo que aqueles resultantes da exposição por 6 horas foram escolhidos para análise por apresentarem o maior contraste de sinal para comparação das amostras.

As imagens dos filmes foram capturadas e digitalizadas com o software Molecular AnalystTM/PC (BioRad[®]) e a intensidade do sinal de hibridização para cada amostra de DNA foi obtido pela medida da densidade óptica (DO). Assim as manchas nos filmes corresponderam ao sinal radioativo emitido pela hibridização dos fragmentos com as sondas dos frutos controle e dos frutos tratados com etileno. A coloração de fundo (*background*) foi descontada dos valores de densidade óptica e estes foram normalizados com os valores das densidades ópticas dos fragmentos de actina e tubulina através da divisão matemática entre os valores. Os valores

finais de densidade óptica das manchas foram comparados entre as duas membranas, obtendo-se assim uma razão para cada fragmento de DNA, que refletiu a diferença nos níveis de transcritos entre os dois tratamentos. Caso a razão entre as densidades ópticas tenha sido maior que dois, significando que o gene diminuiu ou aumentou em duas vezes a sua expressão, os fragmentos correspondentes foram clonados e seqüenciados.

Clonagem

Os fragmentos isolados pela que tiveram a confirmação da expressão diferenciada por *Northern Blot* Reverso foram novamente reamplificados e clonados no plasmídeo pCR[®]4-TOPO[®] (Invitrogen[™]) através do kit “TOPO TA Cloning[®]” (Invitrogen[™]) segundo as instruções do fabricante. Para fazer a transformação de células de *E. coli* TOP 10[®], 4 µL das reações de ligação foram adicionadas a 100 µL de suspensão de bactérias, incubadas a 42 °C durante 30 segundos e imediatamente transferidas para o gelo. Após adição de meio SOC (SAMBROOK *et al.*, 1989), as suspensões celulares foram incubadas em banho a 37°C por 1 hora com agitação leve e constante. As reações foram plaqueadas em meio sólido Luria Bertani (LB)-ágar (SAMBROOK *et al.*, 1989) contendo ampicilina na concentração de 50 µg / mL e incubadas a 37°C durante 12 horas. Das colônias que cresceram, uma delas foi isolada de cada placa e transferida para meio LB líquido contendo ampicilina na mesma concentração anterior e incubados a 37 °C durante 12 horas para posterior extração do DNA plasmidial. Para a purificação dos plasmídeos foi utilizado o kit “QUIAprep[®] Spin Miniprep” da QUIAGEN[™], sendo estes quantificados por espectrofotometria e analisados por eletroforese em gel de agarose.

Seqüenciamento

Alíquotas de 250 fmol dos plasmídeos purificados foram utilizadas para amplificação com o *primer* M13 *foward* de acordo com o kit “Thermo Sequenase™ CyTM5 Dye Terminator” (Amersham Biosciences™) (SANGER *et al.*, 1977). O programa utilizado para as reações foi de 35 ciclos a 95 °C / 30 s, 55 °C / 30 s e 72 °C / 80 s. As reações foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida no seqüenciador ALFexpress® II (Amersham Pharmacia Biotech®) de acordo com as instruções do fabricante.

Análise das seqüências

Os eletroferogramas gerados pela separação das reações de seqüenciamento nos géis de poliacrilamida foram analisados pelo software Alfin®2.10 (Amersham Pharmacia Biotech®) para determinação das seqüências de bases das amostras de DNA. As seqüências de DNA obtidas foram submetidas à comparação com os dados do banco de seqüências de DNA, GenBank®, por meio do *software* BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL *et al.*, 1990), disponível na Internet (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Esse *software* permitiu comparar seqüências obtidas nos experimentos com seqüências genômicas (BLASTN), ou ainda, comparar as seqüências de aminoácidos previstos pelos nucleotídeos obtidos com seqüências de aminoácidos já existentes e previstos pelas seqüências de nucleotídeos do GenBank® (tBLASTX). Após a análise computacional, o programa forneceu um “Score” e um “E value” para os alinhamentos. O “Score” representou o grau de similaridade da seqüência analisada com as seqüências do banco de dados, possuindo um valor alto quando estas foram

similares. O “E value” representou a probabilidade da sequência analisada se alinhar de forma aleatória à sequência do banco de dados. Desse modo, um bom resultado de comparação se deu por um alto “Score” e um baixo “E value”.

3.4. RESULTADOS

A **Figura 6** apresenta um dos oito painéis que foram obtidos pela técnica de “*Differential Display-PCR*”. Os retângulos destacados na figura mostram apenas algumas bandas retiradas do gel por apresentarem diferenças de intensidade mais significativas.

Os *primers* aleatórios P foram utilizados para pareamento ao acaso nas fitas de cDNA e, através da amplificação na primeira etapa, novas fitas de DNA com uma porção poliadenilada na extremidade 3’ foram sintetizadas. Numa segunda etapa, os *primers* T, caracterizados por apresentarem uma sequência politimínica, se ligaram de forma homóloga a porção 3’ poliadenilada e uma nova extensão da fita de DNA se realizou. Os 22 ciclos restantes da técnica aumentaram o número de cópias das duplas fitas de DNA com pareamento dos *primers* P e T, resultando em um perfil parcial dos transcritos dos frutos controle e tratados com etileno. Apesar disso, algumas bandas que aparentemente apresentaram diferenças na intensidade, não foram coletadas.

Figura 6. *Differential Display-PCR* de amostras de cDNA de mamões não-tratados (controle, C) ou tratados (T) com etileno. Combinações do *primer* “sense” P₁₀ com os nove *primers* “antisense” T resultaram em diferentes perfis de fragmentos de cDNA. A amplificação do cDNA das amostras em questão foi conduzida sob a presença de ([α -³²P]dCTP), sendo a eletroforese efetuada em gel de poliacrilamida 5% e uréia 7 M. O filme radiográfico foi exposto durante 16 horas e revelado para visualização das bandas de cDNA. Alguns fragmentos diferencialmente expressos encontram-se destacados por caixas evidenciando as prováveis diferenças de expressão. Outras bandas que não foram coletadas devido à provável amplificação inespecífica, indicada pela presença em todas as combinações de *primers*, estão destacadas por flechas.

O critério utilizado foi que, caso houvesse uma repetição da expressão de uma determinada banda com a mesma intensidade e com aproximadamente o mesmo peso molecular em várias reações com diferentes combinações de pares de *primers*, estas não seriam coletadas. Esse fato evidenciou um problema que parece ser freqüente dessa técnica: a grande quantidade de bandas inespecíficas produzidas, ou seja, bandas que não resultam de amplificação de uma combinação

específica de *primers*, mas de pareamento indesejável de um mesmo *primer* em ambas as fitas, ou *primers* pareando em posições não-homólogas. Isso se deve, provavelmente, em razão das pequenas quantidades de cDNA disponíveis e pelo uso de *primers* aleatórios, destinados ao pareamento casual para a amplificação de genes. Assim, a ligação dos *primers* com o cDNA pode resultar em amplificações inespecíficas, originando bandas que não refletem a presença de transcritos nem variações dos níveis existentes.

Um total de 960 fragmentos expressos foram observados nos painéis de análise, e 96 bandas representadas por fragmentos diferencialmente expressos foram recortadas do gel, eluídas e submetidas a duas amplificações, uma para confirmação de sua presença na solução e outra preparativa para viabilizar as análises posteriores. Algumas bandas recortadas não apresentaram amplificação quando analisadas por eletroforese em gel de agarose, o que pode ser devido ao corte da banda com o bisturi não ter sido efetuado no local exato e, portanto, não existir fragmento na reação de amplificação, ou ainda, devido ao excesso de uréia contida no gel de poliacrilamida, inibindo a enzima de amplificação na PCR. A fim de minimizar o efeito desta alta concentração de uréia nas amostras que não foram amplificadas em uma primeira tentativa, diluições das soluções que continham as bandas recortadas dos géis foram feitas, seguindo-se pela amplificação por PCR.

Um total de 58 fragmentos que tiveram suas reamplificações confirmadas foram selecionados, purificados e aplicados nas duas membranas de transferência de ácidos nucléicos. As membranas foram hibridizadas com as sondas de cDNA radioativas preparadas a partir dos RNAs extraídos dos frutos controle e tratados com etileno da amostragem I, a fim de constatar possíveis diferenças nas hibridizações dos fragmentos com as sondas e, conseqüentemente, verificar

diferenças na expressão dos genes correspondentes nos diferentes grupos de frutos.

Figura 7: Análise da expressão diferencial por Northern Blot Reverso. As amostras foram aplicadas em membranas de transferência de ácidos nucleicos, em duplicata e cada membrana foi hibridizada com sonda radioativa obtida de frutos não-tratados (controle) e tratados com etileno. I- Membrana hibridizada com a sonda dos frutos controle; II- membrana hibridizada com a sonda dos frutos tratados. Os fragmentos que diminuíram a expressão após tratamento com etileno encontram-se numerados de 1 a 29, enquanto aqueles que aumentaram a expressão encontram-se numerados de 30 a 58. Os fragmentos destacados em caixas foram clonados e seqüenciados. Act: fragmento correspondente à actina. Tub: fragmento correspondente à tubulina.

A **Figura 7** mostra os fragmentos que tiveram sua expressão diminuída numerados de 1 a 29 e os que tiveram sua expressão aumentada numerados de 30 a 58. Após a hibridização com as sondas radioativas, a comparação foi feita através da medida das densidades óticas (DO) das manchas observadas depois da revelação dos filmes. Assim, se a razão “*DO frutos controle / DO frutos tratados*” foi igual ou maior que dois, houve um decréscimo de duas vezes no nível de expressão do fragmento em questão. Por outro lado, se a razão “*DO frutos tratados / DO frutos controle*” foi igual ou maior que dois, houve um aumento de duas vezes no nível de expressão do fragmento. A **Tabela 1** apresenta os valores das razões de densidade óptica obtidos para cada um dos fragmentos analisados, sendo que apenas aqueles que obtiveram valores acima de dois foram considerados. Os fragmentos que tiveram uma aparente diminuição da expressão estão apresentados à esquerda da tabela, enquanto aqueles com aumento da expressão estão localizados à direita e as amostras destacadas em cinza foram clonadas e seqüenciadas. Alguns fragmentos que apresentaram valores negativos ou incompatíveis com a análise visual dos filmes, não foram empregados nos experimentos posteriores. Esses valores discrepantes foram conseqüência de manchas inespecíficas na membrana de hibridização, geralmente ocasionadas pela falha no bloqueio da membrana com o DNA de salmão, que permitiu que a sonda se ligasse inespecificamente à membrana, resultando em um sinal elevado de *background*. Outro motivo pode ter sido pelos baixos sinais de hibridização com os fragmentos de actina e tubulina, os quais foram utilizados para a normalização dos valores das densidades óticas, normalização essa considerada pouco eficiente, já que os valores de densidade óticas, quando normalizados, resultaram em valores aproximadamente iguais aos valores não normalizados. Dessa maneira, não apenas a análise da expressão

diferencial por densidade óptica foi efetuada, mas também, a confirmação pela análise visual dos fragmentos diferencialmente expressos foi efetuada e considerada de fundamental importância. A leitura atenta de alguns trabalhos publicados, que fizeram uso em conjunto das técnicas de *DD-PCR* e “*Northern Blot Reverso*”, mostrou que nenhum deles fez uso de genes para controle, indicando que apenas a análise visual pode ser um bom parâmetro para realização da análise diferencial de expressão das amostras em questão, desde que efetuado um *Northern Blot Reverso* (GHANNAM *et al.*, 2005; MOU *et al.*, 1994; SHEN *et al.*, 2004; ZEGZOUTI *et al.*, 1997).

Desse modo, levando-se em consideração a análise numérica das razões das densidades ópticas (maiores que dois; número dos fragmentos sombreados em tom de cinza, **Tabela 1**) e a análise visual (**Figura 7**), das 58 bandas selecionadas, apenas 13 com aparente diminuição de expressão e 4 com aparente aumento de expressão foram utilizadas para clonagem e seqüenciamento.

Após a clonagem dos fragmentos e preparação dos plasmídeos, as amostras foram seqüenciadas e os dados resultantes foram submetidos a uma análise comparativa com as informações do GenBank® através do *software* BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990). Dos 17 fragmentos que tiveram a expressão diferenciada confirmada pelo “*Northern Blot Reverso*”, 7 resultaram em uma análise comparativa bem sucedida, como pode ser observado na **Tabela 2**. As 10 seqüências remanescentes não apresentaram similaridade com nenhuma outra seqüência presente no banco de dados.

Tabela 1: Estimativa da variação da expressão gênica dos fragmentos analisados por “Northern Blot Reverso”. DO: densidade óptica; Act: actina. Tub: tubulina.

<i>Fragmentos que diminuem a expressão</i>	<i>DO frutos controle/DO frutos tratados</i>	<i>Fragmentos que aumentam a expressão</i>	<i>DO frutos tratados/DO frutos controle</i>
1	-0,05	30	1,48
2	-1,91	31	2,98
3	2,54	32	1,16
4	1,69	33	0,70
5	0,94	34	0,48
6	6,78	35	0,96
7	4,15	36	0,24
8	2,49	37	-0,42
9	3,15	38	0,28
10	2,22	39	0,85
11	-0,12	40	0,70
12	0,43	41	2,44
13	2,43	42	4,38
14	2,25	43	6,07
15	2,66	44	0,61
16	0,93	45	0,38
17	8,02	46	0,77
18	2,07	47	0,64
19	2,34	48	0,69
20	3,92	49	7,75
21	0,52	50	-2,21
22	1,60	51	-0,36
23	1,77	52	-0,12
24	-6,57	53	2,23
25	3,32	54	0,32
26	3,07	55	0,59
27	1,31	56	3,47
28	1,36	57	0,44
29	5,79	58	0,39
Act	2,37	Tub	-0,31

3.5. DISCUSSÃO

Como observado na **Tabela 2**, os clones *Cpunk3* (fragmento 10) e *Cpunk5* (fragmento 18) foram relacionados com clones de identidade desconhecida de *Arabidopsis thaliana* e os clones *Cpunk1* (fragmento 29) e *Cpunk4* (fragmento 49) foram relacionados com clones também não-identificados de *Lotus corniculatus*.

Uma vez que não há dados sobre essas seqüências, não é possível no momento fazer considerações a respeito da sua identidade e suposto papel no amadurecimento do mamão. Por outro lado, as identidades de muitos fragmentos de DNA são revisadas diariamente devido aos constantes estudos de genoma em andamento, nos quais se descobrem regiões do material genético que podem ser transcritas e traduzidas, ou pelo desenvolvimento de estudos específicos com esses clones. Assim, não se pode descartar que esses fragmentos sejam identificados em novas análises, possivelmente em um prazo de tempo relativamente curto, e que também esses genes possam ser importantes no controle do amadurecimento de frutos, inclusive do mamão papaia.

Tabela 2. Clones de fragmentos de cDNA de mamão papaia isolados por “*Differential Display-PCR*” e com expressão diferencial confirmada por “*Northern Blot Reverso*”. As seqüências das bandas foram comparadas com o GenBank® por meio do programa tBLASTX.

Clone	Tamanho (pb)	Resposta ao etileno	Seqüência com maior identidade	Nº de identificação	Score (bits)	E-value
<i>CpPG</i>	688	+	Endopoligalacturonase de <i>Prunus persica</i>	AF095577	282	3e ⁻⁸⁵
<i>CpIAA</i>	538	-	Gene “auxine-induced IAA” de <i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_180944	170	6e ⁻⁴³
<i>CpNLS</i>	279	-	Receptor NLS de <i>Oryza sativa</i>	AB004660	164	8e ⁻³⁹
<i>Cpunk1</i>	407	-	Clone não identificado de <i>Lotus corniculatus</i>	AP004903	181	1e ⁻⁴³
<i>Cpunk3</i>	377	-	Clone não-identificado de <i>Arabidopsis thaliana</i>	AB025634 BA000014	101	3e ⁻³²
<i>Cpunk4</i>	381	+	Clone não-identificado de <i>Lotus corniculatus</i>	AP004926	89	6e ⁻¹⁶
<i>Cpunk5</i>	415	-	Clone não-identificado de <i>Arabidopsis thaliana</i>	AY058230	44	7e ⁻¹²

O clone *CpPG* (fragmento 43) teve alta similaridade com uma endopoligalacturonase de damasco (*Prunus persica*). Duas seqüências existentes no GenBank® de possíveis poligalacturonases de mamão papaia, que possuem números de acesso AJ505750 e Y07900 e com tamanhos de 599 pb e 195 pb, respectivamente, apresentaram baixa similaridade com a seqüência isolada no experimento de *DD-PCR*, quando comparadas utilizando duas ferramentas de bioinformática disponíveis na Internet: “Blast-two-sequences” (TATUSOVA *et al.*, 1999) (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi) e “ClustalW” (THOMPSON *et al.*, 1994) (<http://align.genome.jp/>).

A baixa similaridade das seqüências de *Carica papaya* isoladas por outros autores depositadas no GenBank com as seqüências de PG de outras espécies, e o fato de que a seqüência isolada por *DD-PCR* teve similaridade com as seqüências de *Pyrus communis*, *Prunus persica*, *Arabidopsis thaliana* e *Lycopersicum esculentum*, principalmente em regiões conservadas, permite supor que o clone *CpPG* seja realmente de uma poligalacturonase de mamão papaia. Esse resultado é de grande importância para o projeto, uma vez que é compatível com a idéia de indução das enzimas de degradação de parede celular, aumentando sua expressão conforme o fruto amadurece, sendo sensível ao tratamento com etileno e, provavelmente, diminuindo a firmeza da polpa do fruto (BRUMMEL; HARPSTER, 2001; SITRIT *et al.*, 1998). Em virtude da provável relação desse clone com o amaciamento da polpa e da pequena homologia do fragmento isolado com as seqüências do mamão papaia já existentes no banco de dados, outros estudos mais detalhados desse gene foram efetuados e estão apresentados no **Capítulo 7** dessa tese.

O clone *CpIAA* (fragmento 9) correspondeu a uma proteína pertencente à

família dos genes induzidos por auxina (*Aux/IAA genes*) em *Arabidopsis thaliana*. Esses genes aumentam sua expressão quando a planta é submetida ao tratamento com a auxina ácido indol-3-acético (IAA) (ABEL *et al.*, 1995). Nesse trabalho, os autores descreveram o isolamento, a estrutura e as características de expressão dos genes da família *PS-IAA4/5* em *Arabidopsis thaliana*. Essa família de genes, cuja expressão é induzida pelo tratamento com auxinas, foi anteriormente estudada pelo mesmo grupo e caracterizado em ervilhas (*Pisum sativum*) (BALLAS *et al.*, 1993, 1995; OELLER *et al.*, 1993, OELLER; THEOLOGIS, 1995; THEOLOGIS *et al.*, 1985). As conclusões sugerem que o IAA induz uma grande quantidade de genes diferentes e hierárquicos que traduzem proteínas nucleares de vida curta, que por sua vez ativam genes responsáveis pelo crescimento das células vegetais no início do ciclo de vida da *Arabidopsis thaliana*, demonstrando que esse hormônio é de fundamental importância para o crescimento vegetal. Já no amadurecimento dos frutos, como exemplo da importância desse hormônio, foi observado em bananas que ele é capaz de inibir certas reações de amadurecimento, como por exemplo, a degradação de amido (PURGATTO *et al.*, 2001). Nesse trabalho supracitado, os autores analisaram as atividades de enzimas ligadas à degradação de amido, como a sacarose-sintase, sacarose-fosfato-sintase e β -amilase, e concluíram que o tratamento com auxina retardou a expressão da β -amilase, e que provavelmente o amido só foi hidrolisado após o IAA ter sido metabolizado pelos frutos infiltrados, demonstrando que esse hormônio tem uma relação direta entre a sua produção e o amadurecimento da banana, considerada um fruto climatérico. Dessa maneira, a diminuição da expressão desse suposto gene relacionado com a inibição do amadurecimento em frutos é consistente com os resultados alcançados mediante o tratamento com etileno, um hormônio que estimulou o amadurecimento do mamão

papaia e supostamente inibiu os efeitos das auxinas, como demonstrado previamente por Riov e Goren (1979) e Riov, Dror e Goren (1982), que observaram a inibição do transporte de auxina em folhas de citrus e eucalipto mediante a presença do hormônio etileno.

Já o clone *CpNLS* (fragmento 3) obteve alta similaridade com uma importina Alfa-2. Essa família compreende proteínas que se ligam aos NLS (*Nuclear Localization Signals*) de certas proteínas sinalizadoras que agem na cromatina e esse complexo é usado para transportar essas proteínas para dentro do núcleo (SMITH *et al.*, 1997). Essas proteínas transportadas são ativadoras ou supressoras da expressão gênica de determinados genes. Pelo fato do tratamento com etileno ter diminuído a expressão dessa proteína, é possível que esse gene esteja envolvido com o transporte de certas proteínas que inibem o amadurecimento do mamão papaia, ou ainda, que esteja envolvido na inibição de proteínas que transportam fatores associados à estimulação do amadurecimento do mamão papaia.

3.6. CONCLUSÃO

A técnica de *Differential Display*-PCR não demandou muitos gastos e foi relativamente simples, porém apresentou baixa reprodutibilidade e falsos positivos, sendo necessária a confirmação da expressão diferencial dos fragmentos através do “*Northern Blot Reverso*”, técnica essa que se demonstrou eficiente na eliminação de falso-positivos e na redução de gastos desnecessários com clonagem e seqüenciamento. Apesar do baixo número de fragmentos isolados, a técnica de *DD-PCR* permitiu a identificação de uma provável endopoligalacturonase de mamão papaia além de outros dois genes que também podem estar relacionados com o

amadurecimento do fruto. Dessa maneira, a análise da expressão gênica durante o amadurecimento do mamão papaia foi efetuada utilizando uma simples técnica, e genes de relevante importância e passíveis de futuros estudos foram isolados, e suas possíveis funções foram relacionadas aos efeitos causados na qualidade pós-colheita do fruto.

3.7. REFERÊNCIAS

- Abel S., Nguyen M.D., Theologis A. The PS-IAA4/5-like family of early auxin-inducible mRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *J. of Mol. Biol.* v. 251: p. 533-549, 1995;
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *J. of Mol. Biol.*, 215: p. 403-407, 1990;
- Ballas N., Wong L.M., Ke M., Theologis A. 2 auxine-responsive domains interact positively to induce expression of the early indoleacetic acid-inducible gene, PS-IAA4/5. *PNAS*, v. 92: p. 3483-3487, 1995;
- Brummell D.A., Harpster M.H. Cell Wall Metabolism in Fruit Softening and Quality and Its Manipulation in Transgenic Plants. *Plant Molecular Biology*, v. 47: p. 311-340, 2001;
- Diachenko L.B., Ledesma J., Chenchik A.A., Siebert, P.D. Combining the technique of RNA fingerprinting and differential display to obtain differentially expressed mRNA. *Biochemical and Biophysical research communications*, v. 219: p. 824-828, 1996;
- Ghannam A., Jacques A., De Ruffray P., Baillieul F., Kauffmann S. Identification of tobacco ESTs with a hypersensitive response (HR)-specific pattern of expression and likely involved in the induction of the HR and/or localized acquired resistance (LAR). *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 43: p. 249-259, 2005;
- Kim H.J., Triplett B.A. Cotton fiber germin-like protein. I. Molecular cloning and gene expression. *Planta*, v. 218: p. 516-524, 2004;

- Kuhn E. From library screening to microarray technology: strategies to determine gene expression profiles and to identify differentially regulated genes in plants. *Annals of Botany*, v. 87: p. 139-155, 2001;
- Liang P., Pardee A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, v. 257: p. 967–971, 1992;
- López-Gómez R., Gómez-Lim M.A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *Hortscience*, v. 27: p. 440-442, 1992;
- Medina-Escobar N., Cárdenas-Valpuesta V., Muñoz-Blanco J., Caballero J.L. Cloning and characterization of cDNAs from genes differentially expressed during the strawberry fruit ripening process by a MAST-PCR-SBDS method. *Analytical biochemistry*, v. 248: p. 288-296, 1997;
- Mou L., Miller H., Li J., Wang E., Chalifour L. Improvements to the differential display method for gene analysis. *Biochemical and Biophysical Res. Comm.*, v. 199: p. 564-569, 1994;
- Moyano E., Encinas-Villarejo S., Lopez-Raez J.A., Redondo-Nevado J., Blanco-Portales R., Bellido M.L., Sanz C., Caballero J.L., Munoz-Blanco J. Comparative study between two strawberry pyruvate decarboxylase genes along fruit development and ripening, post-harvest and stress conditions. *Plant Science*, v. 166: p. 835-845, 2004;
- Oeller P.W., Keller J.A., Parks J.E., Silbert J.E., Theologis A. Structural characterization of the early indoleacetic acid-inducible genes, PS-IAA4/5 and PS-IAA6, in pea (*Pisum sativum* L). *J. of Mol. Biol.*, v. 233: p. 789-798, 1993;
- Oeller P.W., Theologis A. Induction kinetics of the nuclear proteins encoded by the early indoleacetic acid-inducible genes, PS-IAA4/5 and PS-IAA6, in pea (*Pisum sativum* L). *Plant Journal*, v. 7: p. 37-48, 1995;
- Petersen K., Didion T., Andersen C.H., Nielsen K.K. MADS-box genes from perennial ryegrass differentially expressed during transition from vegetative to reproductive growth. *J. of Plant Physiology*, v. 161: p. 439-447, 2004;
- Purgatto E., Lajolo F.M., Nascimento J.R.O, Cordenunsi B.R. Inhibition of β -amylase activity, starch degradation and sucrose formation by indole-3-acetic acid during banana ripening. *Planta*, v. 212: 823-828, 2001;
- Riov J., Dror N., Goren R.. Effect of ethylene on [14 C] indole-3-acetic acid metabolism in leaf tissues of wood plants. *Plant Physiology*, v. 70: p. 1265-1270, 1982;

- Riov J., Goren R. Effect of ethylene on auxine transport and metabolism in mibrid sections in relation to leaf abscission of woody-plants. *Hortscience*, v. 14: p. 455-455, 1979;
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniats T. Molecular cloning: A laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York USA, 1989;
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminatin inhibitors. *PNAS* v. 74: p. 5463-5467, 1977;
- Shen Y., Tang M.J., Hu Y.L., Lin Z.P. Isolation and characterization of a dehydrin-like gene from drought-tolerant *Boea crassiflora*. *Plant Science*, v. 166: p. 1167-1175, 2004;
- Sitrit Y., Bennett A.B. Regulation of Tomato Fruit Polygalacturonase mRNA Accumulation by Ethylene: A Re-Examination. *Plant Physiology* 116: p. 1145-1150, 1998;
- Smith H.M.S., Hicks G.R., Raikhel N.V. Importin alpha from Arabidopsis thaliana is a nuclear import receptor that recognizes three classes of import signals. *Plant Physiology*, v. 114: p. 411-417, 1997;
- Tatusova T.A., Madden T.L. "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences". *FEMS Microbiology Letters*, v. 174: p. 247-250, 1999;
- Theologis A., Huynh T.V., Davis R.W. Rapid induction of specific messenger-RNAs by auxin in pea epicotyl tissue. *J. of Mol. Biol.*, v. 183: p. 53-68, 1985;
- Thompson J.D., Higgis D.G., Gibson T.J. CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties amd weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, v. 22: p. 4673-4680, 1994;
- Wilkinson J.Q., Lanahan M.B., Conner T.W., Klee H.J. Identification of mRNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction differential display. *Plant Molecular Biology*, v: 27, p. 1097-1108, 1995;
- Zegzouti A., Marty C., Jones B., Bouquin T., Latché A., Pech J.C., Bouzayen M. Improved screening of cDNAs generated by mRNA differential display enables the selection of true positives and the isolation of weakly expressed messages. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 15: p. 236-245, 1997.

CAPÍTULO 4

ANÁLISE DIFERENCIAL DA EXPRESSÃO GÊNICA DURANTE O AMADURECIMENTO DO MAMÃO PAPAIA UTILIZANDO *cDNA- AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORFISM*

4.1 RESUMO

O amadurecimento de frutos, através de reações bioquímicas, produz transformações imediatas em certos frutos, e no caso do fruto climatérico mamão papaia, não é diferente. Diversos genes são responsáveis por essas mudanças, e o isolamento e caracterização de alguns deles podem facilitar o entendimento do amadurecimento. A técnica de *cDNA-AFLP* foi utilizada para a tentativa de isolamento de genes diferencialmente expressos e que possivelmente tenham relação com o amadurecimento do mamão papaia. Fragmentos de genes da ACC oxidase (*CpACO*), de uma proteína inibidora de poligalacturonase (*CpPgi*), de uma enolase (*CpENOL*), de uma AACT (*CpAACT*) e de uma PME (*CpPME*) foram isolados, e junto com outros genes relacionados ao metabolismo de açúcares, ao stress e ao transporte celular, suas possíveis funções no amadurecimento do mamão foram discutidas. Os resultados obtidos sugerem que a técnica de *cDNA-AFLP* pode ser considerada como uma ferramenta efetiva na descoberta de novos genes relacionados ao amadurecimento do mamão papaia e à qualidade pós-colheita do fruto.

4.2. INTRODUÇÃO

O amadurecimento de frutos é um processo fisiológico caracterizado pelas transformações bioquímicas que alteram as propriedades após colheita. As ferramentas para traçar um perfil transcriptômico do amadurecimento de frutos têm sido largamente utilizadas, e técnicas como *Differential Display-PCR* (DD-PCR, LIANG; PARDEE, 1992) e *cDNA Amplified Fragment Length Polymorphism* (cDNA-AFLP, BACHEM *et al.*, 1996) têm recebido especial atenção.

A técnica de cDNA-AFLP difere da DD-PCR por não utilizar *primers* aleatórios na etapa de PCR. Os cDNAs duplas-fitas pertencentes a uma biblioteca de cDNA são submetidos a uma digestão com duas enzimas de restrição (uma de corte freqüente e outra de corte raro), para posterior ligação de adaptadores específicos e uma pré-amplificação pela PCR. Essas etapas são de fundamental importância para a técnica, pois restringem o tamanho dos fragmentos e aumentam o número dos transcritos de forma representativa (BACHEM *et al.*, 1996; 1998). Terminadas essas etapas, o *primer* específico da região digerida pela enzima de corte raro é marcado radioativamente, uma nova reação de PCR é efetuada e os fragmentos são separados por peso molecular (BACHEM *et al.*, 1996). A técnica de cDNA-AFLP já foi empregada com sucesso na identificação de genes envolvidos no amadurecimento de frutas e vegetais (BACHEM *et al.*, 1996; 1998; BURGER; BOTH, 2004; OOMEN *et al.*, 2003; TRINDADE *et al.*, 2004; ZHENG *et al.*, 2004). O custo relativamente baixo e a menor complexidade dessa técnica não significaram qualidade inferior dos resultados, nem dificuldade para detecção de pequenas variações na expressão gênica ou detecção de genes pouco expressos (KUHN, 2001).

Neste capítulo, o uso de *cDNA-AFLP* foi empregado para tentativa de isolamento de gene relacionados como o amadurecimento do mamão papaia, e para isso, frutos sem tratamento (controle), tratados com etileno e tratados com 1-MCP foram utilizados. Genes relacionados à síntese de etileno, ao *stress*, ao metabolismo de parede celular, de glicose e de carotenóides, assim como genes responsáveis por transporte celular, foram isolados e suas possíveis funções na qualidade pós-colheita do mamão papaia foram discutidas. Entretanto um grande número de genes mostrou similaridade aos genes de plantas com diversas funções, inclusive à germinação de sementes ou crescimento das plantas, ou ainda mostraram similaridade com genes e proteínas com funções desconhecidas, o que limita as discussões acerca de uma provável relação com o amadurecimento do fruto.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

As amostras de frutos utilizadas nos experimentos descritos nesse capítulo foram caracterizadas na Amostragem II do **Capítulo 2**. As amostras caracterizadas nesse capítulo mostraram que as técnicas de tratamento dos frutos com etileno e 1-MCP, além de empregadas na fisiologia pós-colheita, podem ser utilizadas nas análises de amostras com padrão de expressão gênica alterado, pois genes essenciais ao metabolismo do amadurecimento do mamão papaia podem ser mais facilmente isolados através da comparação de frutos não-tratados com frutos tratados.

Dessa maneira, a análise diferencial da expressão gênica foi feita comparando os transcritos de três grupos de frutos distintos: a amostra controle

(frutos não-tratados, segundo dia e meio pós-colheita, **Figura 4**, página 34), a amostra tratada com etileno (frutos tratados com etileno, segundo dia e meio pós-colheita, **Figura 4**, página 34) e a amostra tratada com 1-MCP (segundo dia e meio pós-colheita, **Figura 4**, página 34). A escolha dessas três amostras se deu pela distinção na textura da polpa, cuja amostra tratada com etileno apresentou firmeza da polpa bastante reduzida quando comparada com a amostra controle.

Primers

Adaptador AseI

Fita superior: 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'

Fita inferior: 5'-TAGGTACGCAGTC-3'

Adaptador TaqI

Fita superior: 5'-GACGGATGAGTCCTGAC-3'

Fita inferior: 5'-CGGTCAGGACTCAT-3'

Primer AseI para pré-amplificação

5'-CTCGTAGACTGCGTACCTAAT-3'

Primer TaqI para pré-amplificação

5'-GACGATGAGTCCTGACCGA-3'

Primers AseI para amplificação seletiva

AseI (AC): 5'-GACTGCGTACCTAATAC-3'

AseI (CA): 5'-GACTGCGTACCTAATCA-3'

AseI (CA): 5'-GACTGCGTACCTAATCA-3'

AseI (CC): 5'-GACTGCGTACCTAATCC-3'

AseI (GA): 5'-GACTGCGTACCTAATGA-3'

AseI (GC): 5'-GACTGCGTACCTAATGC-3'

AseI (TA): 5'-GACTGCGTACCTAATTA-3'

AseI (TC): 5'-GACTGCGTACCTAATTC-3'

Primers TaqI para amplificação seletiva

TaqI (AA): 5'-GATGAGTCCTGACCGAAA-3'

TaqI (AC): 5'-GATGAGTCCTGACCGAAC-3'

TaqI (CA): 5'-GATGAGTCCTGACCGACA-3'

TaqI (CC): 5'-GATGAGTCCTGACCGACC-3'

TaqI (GA): 5'-GATGAGTCCTGACCGAGA-3'

TaqI (GC): 5'-GATGAGTCCTGACCGAGC-3'

TaqI (TA): 5'-GATGAGTCCTGACCGATA-3'

TaqI (TC): 5'-GATGAGTCCTGACCGATC-3'

Extração de RNA total

O RNA total dos frutos foi extraído segundo Lopez-Gómez e Gómez-Lim (1992), com algumas modificações, método já descrito no **Capítulo 3** página 67 desta presente tese.

Purificação do RNA mensageiro

O RNA mensageiro foi purificado por cromatografia de afinidade utilizando oligonucleotídeos dC₁₀T₃₀ imobilizados em partículas de poliestireno-látex (kit “Oligotex[®] mRNA Mini Kit”, Quiagen[™]), segundo as instruções do fabricante, a partir de 280 mg de RNA total de cada amostra.

Quantificação de ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos foram quantificados por espectrofotometria (SAMBROOK *et al.*, 1989), tendo como referência o fato de que a absorbância de uma amostra de 40 µg/mL de RNA ou 50 µg/mL de DNA a 260 nm possui valor igual a 1. As

amostras de ácidos nucleicos foram diluídas em tampão TE (Tris-HCl 0,01 M pH 8 e EDTA 0,001 M).

Análise da qualidade e integridade de ácidos nucleicos

A análise da qualidade dos ácidos nucleicos foi feita com base na razão da leitura das absorbâncias a 260nm e 280nm (260 nm/280 nm), considerando que os valores de amostras puras devem ser 1,8 para DNA e 2,0 para RNA (SAMBROOK *et al.* 1989). A análise da integridade dos ácidos nucleicos foi feita por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo em tampão Tris-fosfato 0,09 M pH 8 e EDTA 0,002 M (SAMBROOK *et al.*, 1989), realizada a 80 V durante 25 minutos.

Síntese do cDNA fita simples

A partir de 5 µg de RNA mensageiro purificado, foi sintetizado o cDNA fita simples de cada grupo de frutos através da técnica de transcrição reversa utilizando o kit “SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR” (Invitrogen™), segundo as instruções do fabricante e utilizando o *primer* oligo (dT)₁₂₋₁₈.

Otimização do método de síntese de cDNA fita simples

Para otimização das condições e checagem da eficiência das reações, foram utilizados 5 µg da amostra de RNA mensageiro purificado dos frutos tratados com 1-MCP para efetuar a síntese do cDNA fita simples com um marcador radioativo incorporado. À reação inicial, adicionaram-se 10 mCi de [α -³²P]dCTP (6.000 Ci /

mmol) e as instruções do fabricante do kit “SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR” foram seguidas.

Uma alíquota de 5 µL do cDNA fita simples marcado radioativamente foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 1% em tampão Tris-fosfato 0,09 M pH 8 e EDTA 0,002 M (SAMBROOK *et al.*, 1989), realizada a 80 V durante 25 minutos. Após secagem do gel, este foi exposto a filme radiográfico por 16 horas a – 80 °C e revelado. A etapa de hidrólise do RNA através da ação da enzima RNase H foi efetuada simultaneamente com a síntese do cDNA fita dupla e está descrita a seguir.

Síntese do cDNA fita dupla

A partir do cDNA fita simples, foi sintetizado o cDNA fita dupla de cada grupo de frutos. À reação de síntese do cDNA fita simples, adicionaram-se 10 unidades da enzima DNA polimerase I em presença de 10 unidades da enzima RNase H, em tampão Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) contendo dNTP 0,2 mM, KCl 75 mM, (NH₃)₂SO₄ 10 mM, MgCl₂ 5 mM e DTT 1 mM. As reações foram incubadas a 37 °C por 2 horas. Terminada a incubação, as proteínas remanescentes nas reações de síntese de cDNA fita dupla, correspondentes às enzimas utilizadas nas etapas anteriores, foram removidas por extração com uma mistura de fenol-clorofórmio (1:1), seguida por centrifugação a 14.000g e 4 °C por 20 minutos. O cDNA fita dupla proveniente da fase aquosa foi precipitado com 3 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de acetato de sódio (pH 5,2), recuperado por centrifugação (14.000g, 4 °C, 20 minutos) e ressuspendido em 40 µL de água esterilizada.

Otimização do método de síntese do cDNA fita dupla

Para otimização das condições e checagem da eficiência das reações, foi utilizada a amostra de RNA extraído dos frutos tratados com 1-MCP para efetuar a síntese do cDNA fita dupla com um marcador radioativo incorporado. À reação de síntese do cDNA fita simples, adicionaram-se 10 mCi de [α - 32 P]dCTP (6.000 Ci / mmol) e as mesmas etapas descritas anteriormente foram seguidas.

Uma alíquota de 5 μ L do cDNA fita dupla marcado radioativamente foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 1% em tampão Tris-fosfato 0,09 M pH 8 e EDTA 0,002 M (SAMBROOK *et al.*, 1989), realizada a 80 V durante 25 minutos. Após secagem do gel, este foi exposto a filme radiográfico por 16 horas a – 80 °C e revelado para visualização das bandas de DNA.

Digestão do cDNA fita dupla com enzimas de restrição

Alíquotas de 20 μ L das amostras de cDNA fita dupla foram utilizadas para digestão seqüencial com as enzimas de restrição *Asel* e *TaqI*. Adicionaram-se às alíquotas de cDNA 10 unidades da enzima *Asel* em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,9) contendo NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM e DTT 1 mM, em um volume final de 50 μ L, sendo incubadas a 37 °C por 12 horas. A seguir foram adicionadas 10 unidades da enzima *TaqI* em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,9) contendo NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM e DTT 1 mM, em um volume final de 60 μ L e as reações foram incubadas a 65 °C por 12 horas.

Alíquotas de 5 μ L do cDNA fita dupla marcado radioativamente foram digeridos primeiramente com as enzimas *Asel* e *TaqI* separadamente, e depois foram digeridos com a combinação das duas enzimas de restrição. O cDNA digerido

foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 1% em tampão Tris-fosfato 0,09 M pH 8 e EDTA 0,002 M (SAMBROOK *et al.*, 1989), realizada a 80 V durante 25 minutos. Após secagem do gel, este foi exposto a filme radiográfico por 16 horas a – 80 °C e revelado para visualização das bandas do cDNA digerido.

Preparação e ligação dos adaptadores

Para a realização da ligação, foi feita a preparação dos adaptadores a serem ligados às extremidades do cDNA digerido. O adaptador *Asel* foi preparado através da mistura de 2,6 µg do oligonucleotídeo da fita superior com 2,0 µg do oligonucleotídeo da fita inferior (estoques de 1 µg / µL), completadas para 100 µL com água destilada estéril, aquecidas a 65 °C por 5 minutos e deixadas esfriar a temperatura ambiente, equivalendo a uma concentração final do adaptador *Asel* de 5 pM. O adaptador *TaqI* foi preparado através da mistura de 25 µg do oligonucleotídeo da fita superior com 22 µg do oligonucleotídeo da fita inferior (estoques de 1 µg / µL), completadas para 100 µL com água destilada estéril, aquecidas a 65 °C por 5 minutos e deixadas esfriar a temperatura ambiente, equivalendo a uma concentração final do adaptador *TaqI* de 50 pM.

As reações de ligação dos adaptadores foram efetuadas combinando 1 µL da solução de 5 pM do adaptador *Asel* e 1 µL da solução de 50 pM do adaptador *TaqI*, em presença de 1,5 unidade da enzima T_4 DNA ligase, em tampão Tris-HCl 30 mM contendo $MgCl_2$ 10 mM, DTT 10 mM e ATP 1 mM (pH 7,8) em um volume final de 55 µL. As reações foram incubadas a 37 °C por 12 horas.

Otimização e execução da pré-amplificação

Para a otimização da pré-amplificação, foram testados 10 µL da reação de ligação e suas diluições de duas, cinco e dez vezes. As reações ocorreram na presença de 0,1 ng dos *primers* para pré-amplificação *Asel* e *TaqI*, em presença de 1 unidade de *Taq* polimerase, em tampão Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), contendo dNTP 0,25 mM, MgCl₂ 1,5 mM e KCl 50 mM em um volume final de 50 µL. O programa utilizado foi de 25 ciclos a 94 °C / 30 s, 56 °C / 30 s e 72 °C / 1 min. Vinte e cinco microlitros das reações foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1% em tampão Tris-fosfato 0,09 M pH 8 e EDTA 0,002 M (SAMBROOK *et al.*, 1989), realizada a 80 V durante 25 minutos, utilizando como controle negativo as respectivas diluições contendo apenas os adaptadores.

Marcação radioativa dos primers e reação de PCR

Para a amplificação seletiva foi utilizada a combinação do *primer Asel* (CA) com os *primers TaqI* (AA), (AC), (CA), (CC), (GA), (GC), (TA) e (TT), na qual 20 ng do *primer Asel* (CA) foram marcados com ³²P através da reação de fosforilação com 0,2 unidades de T₄ polinucleotídeo quinase em presença de 2 mCi de [γ -³²P]dATP (3000 Ci / mmol), em tampão Tris-HCl 70 mM (pH 7,6) contendo MgCl₂ 10 mM e DTT 5 mM. À reação de marcação foi adicionada 1 unidade de *Taq* polimerase em tampão Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), contendo 60 ng de *primer TaqI* GA, dNTP 0,15 mM, MgCl₂ 1,5 mM e KCl 50 mM em um volume final de 20 µL. O programa de PCR utilizado foi de 11 ciclos a 94 °C / 30 s, 65 °C / 30 s (- 0,7 °C / ciclo) e 72 °C / 1 min, seguido de 19 ciclos a 94 °C / 30 s, 56 °C / 30 s e 72 °C / 1 min.

Otimização da amplificação seletiva quanto ao uso do cDNA ligado aos adaptadores

Para a otimização da amplificação seletiva foi utilizada a combinação de dois *primers* escolhidos de forma aleatória, o *primer* Asel (AC) e o *primer* Taql (GA). Utilizaram-se 5 μ L de uma diluição de vinte vezes de cada uma das reações resultantes da pré-amplificação após marcação radioativa do *primer* e amplificação por PCR acima descrita, realizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida, sendo possível observar qual foi a diluição que apresentou um maior número de bandas com os maiores tamanhos.

Otimização da amplificação seletiva quanto ao uso das reações de pré-amplificação

Outra amplificação seletiva foi efetuada nas mesmas condições descritas acima para poder analisar o efeito das diluições das amostras resultantes da pré-amplificação. Para tanto, foram utilizados 5 μ L da melhor diluição verificada do cDNA ligado aos adaptadores e as diluições de vinte, cinquenta e cem vezes das reações de pré-amplificação. Após marcação radioativa do *primer* e a amplificação por PCR acima descrita, realizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida, sendo possível observar qual foi a diluição que apresentou bandas diferencialmente expressas com maior intensidade.

Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes foi efetuada como descrito no **Capítulo 3**, página 49, desta tese.

Isolamento e reamplificação das bandas diferencialmente expressas

O isolamento de reamplificação das bandas diferencialmente expressas foram efetuados nos mesmos moldes que o **Capítulo 3**, página 50, utilizando a mesma combinação dos *primers* usados nas reações de amplificação seletiva descritas acima que originaram os fragmentos (20 ng para os primers *Asel* e 60 ng para os primers *TaqI*).

Clonagem

Os fragmentos isolados que tiveram expressão diferenciada aparente, após terem sido reamplificados, foram clonados utilizando o kit “pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector Systems” (Promega Corporation) segundo as instruções do fabricante. Para fazer a transformação de células de *Echerichia coli* XL1 Blue MRF' (*Epicurian Coli*[®] XL1-Blue Supercompetent Cells, Stratagene[®]), 10 µL das reações de ligação foram adicionadas a 50 µL de bactérias, incubadas a 42 °C durante 50 segundos e imediatamente transferidas para o gelo. Após incubação de 20 minutos no gelo, as reações foram plaqueadas em meio sólido Luria Bertani (LB)-ágar (SAMBROOK *et al.*, 1989) contendo ampicilina (50 µg / mL), IPTG 0,1M e X-Gal (1 mg / mL) em sua superfície, e incubadas a 37°C durante 12 horas. Das colônias que cresceram, uma delas foi isolada de cada placa e transferida para meio LB líquido contendo ampicilina na mesma concentração anterior e incubados a 37 °C durante 12 horas para posterior extração do DNA plasmidial. Para a purificação dos plasmídeos foi utilizado o kit “Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega Corporation), sendo estes quantificados por espectrofotometria e analisados por eletroforese em gel de agarose.

Seqüenciamento e análise das seqüências

As reações de seqüenciamento, assim como as análises das seqüências, foram efetuadas como descrito no **Capítulo 3** páginas 73 e 74.

4.4. RESULTADOS

Pré-amplificação

As reações de síntese de cDNA radioativas foram expostos à filmes radiográficos, e após revelação deste, mostrou-se que os cDNAs simples e dupla fitas foram gerados com êxito. A necessidade de otimização das diluições de cDNA utilizadas nessa etapa foi devido aos resultados obtidos na pré-amplificação de amostras de cDNA com diluição de uma vez, pois resultaram em fragmentos com tamanhos abaixo dos previstos pela técnica (experimentos prévios, dados não apresentados). Entretanto, a otimização da etapa de pré-amplificação não utilizou material radioativo, pois as reações de PCR produzem material suficiente para visualização através da coloração por brometo de etídio.

Os resultados obtidos dos géis de agarose mostraram que quando as diluições do cDNA aumentaram, o tamanho médio dos fragmentos amplificados acompanhou as diluições. A diluição de dez vezes do cDNA dupla fita foi a diluição que apresentou o produto com tamanho médio maior (100 pb – 600 pb) como previsto pela técnica (BACHEM *et al.*, 1998). O controle negativo nos permitiu observar que a ligação dos adaptadores e a pré-amplificação foram efetivas, pois se os adaptadores não tivessem se ligado adequadamente de forma exata às fitas de cDNA digeridas pelas enzimas, a reação de PCR não funcionaria e as bandas visualizadas seriam apenas as dos adaptadores.

Amplificação seletiva

A tentativa de otimização da amplificação seletiva partiu primeiramente das diluições do cDNA para pré-amplificação descritas acima. A diluição das reações de pré-amplificação para efetuar a amplificação seletiva nessa primeira etapa foi feita baseada nas estimativas de Bachem *et al.* (1998), que utilizou diluições de dez, cinquenta e cem vezes. Portanto, uma diluição padrão de vinte vezes das reações de pré-amplificação foi testada.

Na primeira etapa de otimização da amplificação seletiva, concluiu-se que a diluição de dez vezes das amostras de cDNA com os adaptadores ligados foi a que apresentou bandas de maior peso molecular. Esse resultado está de acordo com o resultado obtido na otimização da pré-amplificação, na qual também a diluição de dez vezes foi a que apresentou um maior número de bandas de maior peso molecular.

Na segunda etapa de otimização da amplificação seletiva, a diluição de dez vezes do cDNA ligado aos adaptadores foi utilizada, variando a quantidade de reação de pré-amplificação empregada. Foi observado que a diluição de cinquenta vezes foi a que apresentou bandas diferencialmente expressas com maior intensidade. A diluição de vinte vezes, utilizada na primeira etapa da otimização, também apresentou bandas diferenciais, validando o experimento anteriormente realizado. Porém, essas bandas tinham menor intensidade quando comparadas com as bandas existentes na diluição de cinquenta vezes.

Como exemplo de reprodutibilidade das diluições utilizadas, é mostrado na **Figura 8** um painel obtido através do uso das diluições otimizadas e da combinação de *primers*, no caso a combinação do *primer* Asel CA e dos *primers* TaqI AA, AC, CA e CC (colunas 1, 2, 3 e 4, respectivamente) para amplificação seletiva.

Figura 8. Paineis de *cDNA-AFLP* comparando a expressão gênica de mamão papaia dos grupos de frutos controle (**C**) tratados com etileno (**E**) e tratados com 1-MCP (**M**). A combinação do *primer* Asel CA com os *primers* *TaqI* AA (1), AC (2), CA (3) e CC (4) para amplificação específica resultaram em diferentes perfis de fragmentos de cDNA. As amostras marcadas com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 5% contendo uréia 7 M. O filme radiográfico foi exposto durante 16 horas e revelado para visualização das bandas de cDNA.

Um total de sessenta e quatro combinações de *primers* foram realizadas (oito *primers* Asel e oito *primers* *TaqI* para amplificação seletiva). Com o total de 12 painéis de análise, foram obtidos cerca de 1300 fragmentos expressos, sendo que aproximadamente 500 deles apresentaram aparente diferença de expressão. Todos os fragmentos considerados diferencialmente expressos foram recortados dos géis

de poliacrilamida e armazenados a -20 °C. Os fragmentos recortados foram escolhidos de forma aleatória e submetidos à reamplificação pela reação de PCR.

As reações positivas tiveram os fragmentos purificados do gel de agarose, clonados e seqüenciados. Um total de 82 clones foram seqüenciados e a **Tabela 3** mostra os resultados de 23 clones que tiveram alguma similaridade com seqüências depositadas no banco de dados GenBank. Os clones restantes não tiveram similaridade significativa com nenhuma seqüência depositada no banco de dados, levando em consideração um “score” maior que dez e um “e-value” menor que $1e^{-1}$.

Tabela 3. Clones de fragmentos de cDNA de mamão papaia isolados por cDNA-AFLP. As seqüências das bandas foram comparadas com o GenBank® por meio do programa tBLASTX.

Clone	Tamanho (pb)	Expressão relativa	Seqüência com maior identidade	Nº de identificação	Score (bits)	E-value
<i>CpPgi</i>	461		Proteína inibidora de poligalacturonase de <i>Cicer arietinum</i>	AJ 515557	123	$2e^{-42}$
<i>Cp14-3-3</i>	500		Proteína do tipo 14-3-3 de <i>Pisum sativum</i>	PSU 15036	261	$1e^{-81}$
<i>CpACO</i>	249		ACC oxidase de <i>Carica papaya</i>	AY601704.1	117	$2e^{-31}$
<i>CpENOL</i>	460		Proteína enolase de <i>Gossypium barbadense</i>	AY 297757.1	301	$3e^{-79}$
<i>CpHSP91</i>	381		Gene HSP91 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_106642.3	222	$1e^{-55}$
<i>CpCSP41</i>	542		Gene CSP41 de <i>Nicotiana tabacum</i>	AY 324804	129	$2e^{-73}$
<i>CpVRN1</i>	357		Gene VRN1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	AF 285092	55.6	$7e^{-25}$
<i>CpPRL1</i>	427		Gene PRL1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	X82825	138	$3e^{-43}$
<i>CpBOR1</i>	322		Gene BOR1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_180138.1	217	$2e^{-54}$

<i>Cpkin1</i>	295		Proteína quinase de <i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_105393.2	67.3	$3e^{-09}$
<i>CpAACT</i>	341		Gene AACT de <i>Hevea brasiliensis</i>	AF429383.1	173	$3e^{-39}$
<i>Cphpr</i>	433		Proteína rica em hidroxiprolina de <i>Arabidopsis thaliana</i>	AY081543	103	$5e^{-38}$
<i>CpPME</i>	305		PME de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	X85216	69.8	$1e^{-19}$
<i>CpCD11</i>	314		Gene CD11 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_1036054.1	70.3	$3e^{-11}$
<i>CpSyt</i>	191		Gene Syt de <i>Arabidopsis thaliana</i>	AJ617630	60.6	$7e^{-08}$
<i>CpVCL1</i>	157		Gene VCL1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_129359.1	70.7	$5e^{-11}$
<i>CpT1J1</i>	194		Gene T1J1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	AY142003.1	121	$4e^{-26}$
<i>CpSIG2</i>	338		Gene SIG2 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	AF015543.1	98.2	$2e^{-18}$
<i>CpbZIP</i>	294		Fator de transcrição bZIP de <i>Arabidopsis thaliana</i>	AY050923	51.5	$2e^{-04}$
<i>Cphps</i>	485		Proteína rica em serina de <i>Brassica rapa</i>	EF110928.1	111	$5e^{-33}$
<i>CpHSP70</i>	334		Gene HSP70-2 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_128771.2	123	$5e^{-26}$
<i>CpImpA1</i>	565		Proteína Importina alfa de <i>Arabidopsis thaliana</i>	AF077528	107	$1e^{-76}$
<i>CpNADH2</i>	444		NADH subunidade 2 de <i>Brassica napus</i> L.	AP006444.1	103	$4e^{-63}$

4.5. DISCUSSÃO

O clone *CpPgi* correspondeu a uma proteína inibidora de poligalacturonase (Pgi), bastante similar à Pgi de grão-de-bico (*Cicer arietinum*). As proteínas

inibidoras de poligalacturonase são proteínas que possuem repetidas seqüências do aminoácido leucina, fazendo parte da grande família das proteínas chamadas de “Leucine Rich Repeated (Lrr) proteins”. As proteínas do tipo Lrr de dicotiledôneas descritas na literatura (DE LORENZO *et al.*, 2001) são relacionadas nos vegetais, principalmente, aos genes que conferem resistência (DE LORENZO; CERVONE; 1997; JONES; JONES, 1997) e aos receptores de proteínas envolvidos no desenvolvimento das plantas (BECRAFT, 1998). As proteínas inibidoras de poligalacturonase atuam no mecanismo de defesa dos vegetais inibindo a ação das poligalacturonases fúngicas pela interação proteína-proteína, especialmente nas regiões ricas em leucina (AHSAN *et al.*, 2005; LECKIE *et al.*, 1999). O fragmento isolado no experimento de cDNA-AFLP de mamão papaia, com 461 pares de bases, correspondeu a um transcrito com aumento de expressão no grupo de frutos sem tratamento, sendo que o tratamento com etileno e com 1-MCP pareceu inibir sua expressão. Em revisão feita por Dong (1998), os resultados da ação do etileno no mecanismo de defesa de plantas ainda são contraditórios, mostrando que em algumas plantas o hormônio inibe a transcrição do gene Pgi, em outras o hormônio facilita a criação de resistência contra fungos. Já os autores Li *et al.* (2003) estudaram a expressão de dois genes de proteínas inibidoras de poligalacturonase de nabo (*Brassica napus*) em resposta a diferentes tipos de “stress” bióticos e abióticos, mostrando que a expressão delas em folhas maduras varia conforme a intensidade e o tipo do “stress”. Portanto é possível que o etileno tenha inibido o gene de Pgi em mamão papaia em razão do amadurecimento, para que não acontecesse uma ligação cruzada entre o sítio Lrr da Pgi e a poligalacturonase endógena, podendo essa agir na degradação da parede celular e no amolecimento natural da polpa de fruto. Por outro lado, o etileno e o 1-MCP podem ter funcionado

como um fator de “stress” abiótico, inibindo assim a expressão da Pgi de mamão papaia. Desse modo, estudos mais aprofundados necessitam ser feitos, pois os resultados mostram que o tratamento com os gases inibiu a expressão dessa enzima de defesa, e a não-similaridade da sequência acima descrita com a sequência parcial da Pgi de mamão papaia depositada no banco de dados (número de acesso [AY673961.1](#)) sugere que a sequência dessa enzima ainda não está totalmente definida.

O clone *Cp14-3-3* possuiu alta similaridade com uma proteína do tipo 14-3-3 de ervilha (*Pisum sativum*). Esse fragmento, de 500 pares de base, correspondeu a um transcrito com aumento de expressão quando os frutos foram tratados com 1-MCP. Proteínas do tipo 14-3-3 eram originalmente consideradas como proteínas específicas de cérebros de mamíferos, mas foi descoberta que sua distribuição ocorre também em outros grupos de células eucarióticas (ZHANG *et al.*, 1995). Essas proteínas possuem seqüências altamente conservadas e já foram isoladas em espécies vegetais, como *Arabidopsis thaliana* (ZHANG *et al.*, 1995), ervilhas (STANKOVIC *et al.*, 1995) e cana-de-açúcar (KURAMAE *et al.*, 2001), porém com funções muito distintas, como inibindo a proteína quinase C, ativando as enzimas tirosina e triptofano hidroxilases e atuando como a enzima fosfolipase A₂ (ZHANG *et al.*, 1995). Muitos atributos foram colocados acerca das funções dessas proteínas, mas atualmente acredita-se que as suas principais funções sejam as de sinalização de transcrição (FERL, 2004), pois dentre outros relatos, um estudo sobre os efeitos da enzima nitrato redutase observou que apenas a fosforilação de proteínas não era suficiente para ativar algumas proteínas-alvo em plantas, ocorrendo uma colaboração de proteínas do tipo 14-3-3 na sinalização de transcrição (HUBER *et al.*, 1996). Devido ao aumento da expressão desse tipo de proteína em mamão papaia

com o tratamento com 1-MCP, novos caminhos de sinalização molecular podem ser ativados, já que este inibe uma série de ocorrências naturais do amadurecimento sugerindo uma via de sinalização secundária existente no fruto. Apesar de genes do tipo 14-3-3 terem sido isolados em alguns frutos, como tomate (LAUGHNER *et al.*, 1994), morango (AHARONI; O'CONNELL, 2002) e melão (NAGASAWA *et al.*, 2005), pouco se sabe da função dessas proteínas no amadurecimento dos frutos. Devido aos resultados obtidos no experimento de cDNA-AFLP serem preliminares e estudos sobre as muitas funções atribuídas às proteínas do tipo 14-3-3 estejam em andamento, é necessário que esse fragmento isolado seja melhor caracterizado para ser possível retirar conclusões sobre as proteínas do tipo 14-3-3 e o amadurecimento de frutos, especialmente o mamão papaia.

O clone *CpACO* possuiu similaridade com a enzima ACC oxidase de mamão papaia (*Carica papaya* L.) (LÓPEZ-GÓMEZ *et al.*, 2004), sendo que ela é uma das principais enzimas de síntese do etileno, junto com a enzima ACC sintase (ALEXANDER; GRIERSON, 2002; WANG *et al.*, 2002). A síntese do etileno endógeno em frutos climatéricos possui um aumento durante o amadurecimento, e esse hormônio desencadeia uma série de reações nesses frutos. O aumento da síntese de etileno é proveniente do aumento da expressão de genes das enzimas relacionadas à síntese desse hormônio, que inclui a enzima ACC oxidase, cuja função é transformar o composto ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico em etileno, liberando CO₂ e HCN (SEYMOUR *et al.*, 1993). O resultado obtido está de acordo com o observado no experimento efetuado e apresentado no **Capítulo 2 (Figura 4, página 33)**, pois quando se teve um aumento na liberação de etileno, houve também um aumento na expressão do fragmento isolado do gene da ACC oxidase. O isolamento de um fragmento de um gene que sabidamente aumenta sua

expressão durante o tratamento com etileno pode ser interpretado como uma evidência da validade do experimento efetuado e dos resultados obtidos.

O clone *CpENOL* apresentou uma grande similaridade com uma proteína do tipo enolase de algodão (*Gossypium barbadense*). A enzima enolase (2-fosfo-D-glicerato hidrolase, EC 4.2.1.11) é uma enzima comumente encontrada nos seres vivos, pois ela catalisa, em uma reação dependente de Mg^{2+} , a desidratação do 2-fosfoglicerato (2-PGA) para fosfoenolpiruvato (PEP), o qual é convertido a piruvato (através da enzima piruvato quinase) com a concomitante liberação de ATP em uma subsequente reação final na cadeia de degradação da glicose, a cadeia glicolítica (HANNAERN *et al.*, 2000). Da mesma maneira que outras enzimas envolvidas na glicólise e neoglicogênese, a enolase é uma das enzimas que apresenta estrutura bem conservada entre as espécies de seres vivos, entretanto, grande parte dos vegetais possui um inserto de 5 aminoácidos na enzima que difere dos outros seres vivos (STRAENTEN *et al.*, 1991). Foi verificado que os transcritos da enzima enolase em sementes de arroz tiveram um acréscimo de 8 vezes quando as sementes foram submersas em água destilada por 24 horas. Já em raízes de milho submetidas à anóxia por 2 dias, a quantidade de transcritos aumentou de duas a cinco vezes e a atividade enzimática aumentou 200% quando comparados aos experimentos realizados em níveis aeróbicos (UMEDA; UCHIMYIA, 1994). O clone *CpENOL* isolado de mamão papaia (460 pb) teve aumento de expressão nos frutos tratados com etileno, e como o tratamento com etileno pareceu adiantar uma série de reações (como discutido no **Capítulo 2**), dentre as mais importantes o aumento das taxas de respiração e liberação de etileno endógeno e a diminuição da firmeza da polpa, pode-se supor que essas mudanças iniciadas ou estimuladas pelo etileno demandam um rápido aporte de energia para que todas as transformações ocorram,

desde a transcrição do gene, passando pela síntese da proteína até a reação bioquímica realizada pela enzima. E essa energia, em forma de ATP deve, provavelmente, ter como principal fornecedor a degradação da glicose provinda da sacarose armazenada nos frutos, como sugerido no **Capítulo 2**, mostrando que o fato da enzima enolase ter aumentado de expressão nos frutos tratados com etileno pode ter levado a um consumo de sacarose 12 horas depois (3º dia após a colheita).

Os clones *CpHSP91* e *CpHSP70* apresentaram alta similaridade com proteínas do tipo “Heat Shock” (*HSP91* e *HSP70*) de *Arabidopsis thaliana*. As “Heat Shock Proteins” (*HSP*) têm sua expressão aumentada em plantas quando tratadas com calor ou submetidas a vários tipos de *stress* (BOSTON *et al.*, 1996; VIERLING, 1991). As *HSP* são subdivididas de acordo com as suas massas moleculares, e as proteínas *HSP70* (com massas moleculares de 70 kDa) fazem parte do maior e mais bem caracterizado grupo por terem sido isoladas pela primeira vez (VIERLING, 1991). Neste trabalho os autores notaram que plantas submetidas ao calor (37 °C) tinham um aumento na expressão de proteínas com massa moleculares de aproximadamente 70 KD. Dessa maneira, o fragmento representado pelo clone *CpHSP70*, com ligeiro aumento de expressão nos frutos tratados com etileno, pode ter aumentado sua expressão devido ao fator de *stress* abiótico causado pelo tratamento com etileno. Ainda não se pode atribuir uma função para o gene, mas não se pode descartar que, analisando-se os padrões de expressão nos frutos controle e tratados com 1-MCP, esse gene deve ter uma expressão constante até o início do amadurecimento, cujo etileno endógeno, ou o *stress* causado pro ele aplicado exogenamente, desencadeie um aumento de expressão.

O clone *CpHSP91* teve alta similaridade com uma *HSP* de alto peso molecular, denominada de “High-Molecular Weight Protein” (HMW). A principal

subfamília, com relevante homologia com as *HSP70*, é a das proteínas inicialmente isoladas de leveduras e com pesos moleculares entre 90 e 110 kDa, chamadas de proteínas *HSP110/SSE*. O trabalho inicial de isolamento e caracterização de uma proteína HMW de *Arabidopsis thaliana* foi realizado por Storozhenko *et al.* (1996), que isolaram uma sequência de cDNA (2866 bp) codificadora de uma proteína com peso estimado de 91,6 kDa, a qual foi denominada *HSP91* (código de acesso Z70314.1), pertencente a subfamília de proteínas *HSP110/SSE*. No trabalho realizado, os autores observaram que esse gene foi constitutivamente expresso em plantas não submetidas a *stress* algum, porém, da mesma forma que Vierling (1991), observaram que quando as plantas foram expostas ao calor (37 °C) durante o desenvolvimento, a expressão do gene *HSP91* aumentou. Dessa forma, como os fragmentos isolados de mamão papaia tiveram um aumento na expressão quando os frutos foram tratados com etileno e por esses fragmentos possuírem certa similaridade com membros da família das *HSP*, pode-se especular que o tratamento com etileno tenha sido representado pelos frutos como um fator de *stress* abiótico.

O clone identificado como *CpCSP41* apresentou alta similaridade com uma proteína encontrada nos cloroplastos de algumas plantas, chamadas de CSPs (“Chloroplast Stem-loop binding Proteins”). Essas proteínas estão amplamente distribuídas nos vegetais e possuem função de endoribonucleases. Muitos RNAs mensageiros (principalmente dentro dos cloroplastos) possuem uma sequência de ácidos nucleicos invertida e repetida na região 3’ UTR (“Untranslated Region”), que forma uma estrutura estável do tipo “Stem-Loop” e aumenta a estabilidade molecular do RNA (STERN *et al.*, 1989). Essas estruturas constituem sítios de reconhecimento para as proteínas nucleares do tipo CSPs, que irão se ligar ao RNA e remover ou desfazer essas estruturas. A proteína CSP41 foi primeiramente isolada em espinafre

(*Spinach oleracea*) e sua seqüência se encontra no banco de dados GenBank sob o número de acesso U49442 (YANG *et al.*, 1996), cujos autores conseguiram demonstrar uma função endoribonucleásica atribuída a essa proteína. Porém a seqüência que apresentou maior similaridade com a de mamão papaia foi a de tabaco (*Nicotiana tabacum*). No trabalho apresentado por Bollenbach e Stern (2003) sobre a enzima isolada de tabaco, relacionou-se a quantidade e o tipo de cátions divalentes e a atividade nucleásica *in vitro*. Já em outro trabalho realizado com espinafre (DENG; GRUISSEM, 1987), os autores efetuaram experimentos visando elucidar a expressão de genes de plastídeos em diferentes tecidos do vegetal, demonstrando que muitos destes genes possuíam uma expressão constitutiva apesar de alguns deles serem estimulados por foto-períodos mais longos. Os autores concluíram que as grandes transformações nas proteínas dos plastídeos são consequência de eventos pós-transcricionais e não de mudanças nas quantidades de transcritos (já que muitos genes possuíam uma expressão constitutiva), sendo que a revisão feita por Gruissem (1989) suporta as mesmas conclusões. O fragmento isolado de mamão papaia teve sua expressão aumentada quando os frutos foram tratados com 1-MCP. Porém não se pode chegar a qualquer conclusão apenas com base nos trabalhos comentados acima, já que esse tipo de proteína faz parte de um controle de expressão gênica muito apurado, associado à regulação pós-transcricional em cloroplasto, organela de ocorrência pouco provável nas células da polpa dos frutos de mamão papaia.

O clone *CpVRN1* possuiu identidade com uma proteína isolada de *Arabidopsis thaliana* responsável pelo processo de vernalização das sementes da planta. Esse processo é caracterizado pela diminuição da expressão de proteínas que inibem a eclosão da semente após longos períodos de frio, processo esse

principalmente regulado por uma proteína do tipo MADS-BOX chamada de FLC (FLOWERING LOCUS C gene) (SHELDON *et al.*, 2000). O gene VRN1 (VERNALIZATION 1 gene) de *Arabidopsis thaliana* também traduz uma proteína do tipo MADS-BOX e sua principal função é a de manter a repressão do gene FLC durante o desenvolvimento da planta em temperaturas mais elevadas (LEVY *et al.*, 2002), sendo que esse gene também já foi isolado em uma série de leguminosas, como ervilha e soja (HECHT *et al.*, 2005). O fragmento isolado de mamão papaia teve sua expressão aumentada quando os frutos foram tratados com 1-MCP, porém não se pode chegar a qualquer conclusão apenas com base nos trabalhos comentados acima, já que esse tipo de proteína faz parte de um processo especializado de germinação de sementes, o que, a princípio, não poderia ser relacionado com a expressão em células da polpa de frutos de mamão papaia.

O clone *CpPRL1* é similar ao gene PRL1 (PLEIOTROPIC REGULATORY 1 gene) de *Arabidopsis thaliana*. Esse gene codifica uma proteína do tipo WD40, característica por possuir 7 regiões conservadas de 40 aminoácidos cada, com repetições de triptofano (W) e ácido aspártico (D) em cada região, que em *Arabidopsis thaliana* funciona como regulador pleiotrópico de resposta à glicose e hormônios (NÉMETH *et al.*, 1998). No trabalho citado, o mutante *prl1* de *Arabidopsis* se tornou hipersensível à glicose e à sacarose, fazendo com que as plantas crescessem de forma anormal e morressem três semanas depois à exposição em meio 6% de glicose/sacarose, enquanto o grupo controle cresceu normalmente. Entretanto, nas plantas mutantes houve um aumento da quantidade de glicose, frutose, sacarose e amido durante o desenvolvimento, variando de 2 a 5 vezes quando comparados com as plantas controle. Com base nesses resultados dos *Northern Blots* efetuados com genes ligados ao metabolismo de açúcares, sugeriu-

se que a mutação *prl1* promoveu hipersensibilidade à glicose por inibição da repressão de genes glicose-responsíveis, isto é, o gene PRL1 pode atuar como um regulador negativo de genes responsíveis à glicose. O fragmento isolado de mamão papaia teve sua expressão aumentada quando os frutos foram tratados com 1-MCP, e quando analisado em conjunto aos resultados apresentados no **Capítulo 2**, pode-se observar que durante o amadurecimento o acúmulo de açúcares solúveis é maior quando comparado com os frutos controle e tratados com etileno. De fato, esse acúmulo de sacarose pode representar uma diminuição na expressão de genes de metabolismo de glicose/sacarose, podendo ter ocorrido devido ao aumento de expressão do gene PRL1 em frutos tratados com 1-MCP.

O clone *CpBOR1* correspondeu ao gene BOR1 (BORON 1 gene) de *Arabidopsis thaliana*. A proteína traduzida por esse gene faz parte da superfamília de transportadores do tipo carbonato, e possui como função o transporte de átomos de Boro das células pericíclicas para o xilema das plantas (TAKANO *et al.*, 2005). Baseado nestes trabalhos publicados correspondentes ao gene BOR1, as comparações com o clone isolado de mamão papaia, que representou um fragmento com aumento de expressão no grupo de frutos tratados com etileno, puderam ser efetuadas. A função do elemento Boro no desenvolvimento das plantas e frutos é de fundamental importância para a construção da parede celular vegetal, pois seu átomo forma dímeros através de ligações do tipo di-ésteres com o açúcar apiose das ramificações do RGII, funcionando como um controle de porosidade e de tensão de alongamento celular (BRUMMELL; HARPSTER, 2001; YONG *et al.*, 2005). Como explicado anteriormente, o etileno aumenta a expressão de enzimas que degradam parede celular dos frutos, desfazendo as ligações inter e intra-moleculares dos RGI e RGII, e provavelmente, liberando o átomo livre no citoplasma. Takano *et al.* (2005)

demonstraram que o aumento da expressão do gene BOR1 diminuiu a concentração celular de Boro, e dessa maneira, pode-se sugerir que uma reação similar ocorreu no fruto mamão papaia, já que o limiar citoplasmático de toxicidade do elemento é baixo (TAKANO *et al.*, 2005).

O clone *CpAACT* isolado de mamão papaia representa o gene da enzima AACT (acetoacetil-CoA tiolase ou acetil-CoA acetyl transferase, E.C. 2.1.3.9), com alto grau de similaridade com a enzima de seringueira cultivada na Amazônia (*Hevea brasiliensis*), assim como de *Arabidopsis thaliana*, tabaco (*Nicotiana tabacum*), mostarda (*Brassica juncea*), rabanete (*Raphanus sativus*) e nabo (*Brassica rapa*). A enzima AACT catalisa a formação de duas moléculas de acetil-CoA em 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA), que por sua vez é transformado em ácido mevalônico (MVA) pela enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMGR) (BACH *et al.*, 1999). O ácido mevalônico é o principal precursor de isoprenóides em procariotos e eucariotos, dentre eles os ácidos graxos e os carotenóides (CHEMLER *et al.*, 2006; KAJIWARA *et al.*, 1997). Fabi *et al.*, (2007) analisaram o efeito dos tratamentos com etileno e 1-MCP na quantidade de carotenóides durante o amadurecimento do mamão papaia, e observaram que ambos os tratamentos diminuíram a quantidade de carotenóides quando comparados com o grupo controle. Enquanto a quantidade dos três principais carotenóides em mamão papaia com polpa avermelhada (*all-trans* α -licopeno, *all-trans* β -criptoxantina e *all-trans* β -caroteno) aumentou durante o amadurecimento dos frutos controle, as quantidades desses carotenóides nos frutos tratados com etileno e 1-MCP, além de terem sido menores que os controles, não aumentaram. Como o clone *CpAACT* foi obtido através de um fragmento que diminuiu a expressão quando os frutos foram tratados com etileno e 1-MCP e analisando-se os

resultados obtidos por Fabi *et al.* (2007), pode-se especular que essa diminuição na expressão do gene ACCT foi a provável razão pela diminuição da quantidade de carotenóides em ambos os frutos tratados.

O clone *CpPME* apresentou similaridade com uma pectinametilesterase (PME) de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (EBBELAAR *et al.*, 1996). A PME (EC 3.1.1.11) desesterifica parcialmente a pectina pela clivagem hidrolítica dos grupamentos metila do grupo carboxílico dos ácidos galacturônicos, e logo após a desesterificação, a enzima PG cliva randomicamente (endo-PG) ou a partir da extremidade não-redutora do ácido poligalacturônico (exo-PG), desestruturando a parede celular e lamela média dos frutos fazendo com que a firmeza da polpa diminua (BRUMMELL; HARPSTER, 2001). O gene de PME isolado de mamão papaia também obteve similaridade com duas isoenzimas de *Arabidopsis thaliana* nomeadas de PME1 e PME2 (RICHARD *et al.*, 1994; 1996). Duas seqüências existentes no GenBank® de possíveis PMEs de mamão papaia, que possuem números de acesso [CO373905.1](#) e [Y07899.1](#), com tamanhos de 631 pb e 649 pb, respectivamente, não apresentaram similaridade com a seqüência do clone *CpPME* quando comparadas utilizando duas ferramentas de bioinformática disponíveis na Internet: “Blast-two-sequences” (TATUSOVA *et al.*, 1999) (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi) e “ClustalW” (THOMPSON; HIGGS; GIBSON, 1994) (<http://align.genome.jp/>). A **Figura 9** mostra, de maneira mais detalhada, a comparação da seqüência parcial de aminoácidos deduzida do fragmento do clone *CpPME* com as seqüências parciais de *Phaseolus vulgaris* (número de acesso [X85216.1](#)) e as duas de *Arabidopsis thaliana* (PME1, número de acesso [NM_104261.2](#) e PME2, número de acesso [U25649.1](#)). Entretanto, quando comparadas às seqüências de *Carica papaya* já depositadas com as seqüências de

Phaseolus vulgaris e as duas de *Arabidopsis thaliana*, nota-se que há similaridade entre as seqüências, porém em um local diferente da obtida com o clone *CpPME*. Dessa maneira, não se pode descartar a possibilidade de que o fragmento contido no clone *CpPME* é o de um gene de PME de mamão papaia nunca isolado anteriormente, e apenas futuros trabalhos poderão confirmar se as seqüências depositadas no banco de dados são semelhantes à isolada pelo método de *cDNA-AFLP*.

<i>A.thaliana</i> PME1	1	-----MPRQPLSNQFNTITAQGKKDPNQSSGMSIQRCTIS
<i>A.thaliana</i> PME2	51	RD CDVTGTIDFIFGSAAVVFQGCKIMPRQPLSNQFNTITAQGKKDPNQSSGMSIQRCTIS
<i>C.papaya</i>	1	-----MPRQPLSNQFNTITAQGKKDPNQSSGMSIQRCTIS
<i>P.vulgaris</i>	1	-----MPRQPLSNQFNTITAQGKKDPNQNTGLIIQKSTIT
<i>A.thaliana</i> PME1	36	--ANG--NVTIAPT YLGRPWKEFSTTVIMETVIGAVVRPSGWM SWVSGVDPPASIVYGEYKN
<i>A.thaliana</i> PME2	111	--ANG--NVTIAPT YLGRPWKEFSTTVIMETVIGAVVRPSGWM SWVSGVDPPASIVYGEYKN
<i>C.papaya</i>	1	-----QXQH--LVGLERFSTTVIMETVIGAVVRPSGWM SWVSGVDPPASIVYGEYKN
<i>P.vulgaris</i>	36	--PFCNNLTAPT YLGRPWKEFSTTVIMQSDIGALINPVGWMSWVPNVEPTTIFYAEYQN
<i>A.thaliana</i> PME1	93	TGPGSDVTQRVKWAGYKPVMSDAEAAKFTVATLLHCADWIEATGVINQLS--
<i>A.thaliana</i> PME2	168	TGPGSDVTQRVKWAGYKPVMSDAEAAKFTVATLLHCADWIEATGVINQLS--
<i>C.papaya</i>		-----TGPGSDVTQRVKWAGYKPVMSDAEAAKFTVATLLHCADWIEATGVINQLS--
<i>P.vulgaris</i>	94	SGPGADVSRVKWAGYKPTLTDRNAEEFTVQSFQCPFWLIPNAAVQFDS--

Figura 9. Alinhamento das seqüências parciais de aminoácidos deduzidas das seqüências dos genes que codificam a enzima pectinesterase de mamão papaia (*C.papaya*), *Phaseolus vulgaris* (*P.vulgaris*) e *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana* PME1 e PME2). Os aminoácidos idênticos estão destacados em fundo preto e letra branca, os aminoácidos similares estão destacados em fundo cinza e letra branca e os aminoácidos similares estão destacados em fundo branco e letra preta.

O fragmento do clone *CpPME* demonstrou um ligeiro aumento de expressão no grupo de frutos tratados com etileno, podendo-se especular que a enzima PME pode ser etileno-dependente de modo similar ao fragmento da endo-PG isolado por *DD-PCR*. Também esse resultado é de grande importância para o projeto, uma vez que é compatível com a idéia de indução das enzimas de degradação de parede celular, aumentando sua expressão conforme o fruto amadurece, sendo sensível ao

tratamento com etileno e, provavelmente, auxiliando na diminuição da firmeza da polpa do fruto (BRUMMEL; HARPSTER, 2001; SITRIT *et al.*, 1998).

O clone *CpVCL1* apresentou similaridade com o gene VCL1 (VACUOLELESS 1 gene) de *Arabidopsis thaliana*. Muitas plantas são caracterizadas por apresentar em suas células um vacúolo central que se estende por até 90% da célula. Em trabalho publicado por Rojo *et al.* (2001), foi verificado que a inativação do gene VCL1 em *Arabidopsis* bloqueou a formação de vacúolo, alterando a orientação da divisão e alongação das células no embrião, fazendo com que a planta morresse. O grupo sugere que a função da proteína codificada pelo gene VACL1 pode estar relacionada com os eventos de fusão de membranas necessários para o transporte de proteínas para o interior do vacúolo e na biogênese do compartimento. O clone *CpVCL1* aumentou a expressão quando os frutos foram tratados com etileno, porém o padrão de expressão já nos frutos controle se revelava alta, podendo representar algum tipo de gene de fundamental importância para o trânsito de proteínas endereçadas ao vacúolo e que possam estar relacionadas ao amadurecimento. Em contrapartida, pouco se pode acrescentar relacionando-se o artigo publicado com os resultados em mamão papaia, visto que a biogênese dos vacúolos nos frutos provavelmente ocorreu em seu desenvolvimento (SHIRATAKE; MARTINOIA, 2007).

Os clones descritos acima parecem ter relação com diferentes eventos ou transformações ocorridas durante do amadurecimento do mamão papaia com possíveis alterações na qualidade pós-colheita do fruto, e podem ser alvos de futuros estudos acerca dos mecanismos atuantes no amadurecimento de frutos em geral. Contudo, alguns clones apresentados na **Tabela 3** não possuem literatura específica para o fragmento isolado (*CpCD11*, *CpSyt*, *CpT1J1* e *CpSIG2*), outros ainda codificam proteínas e/ou enzimas com funções ainda desconhecidas (*Cpkin1*,

Cphpr, *Cphps* e *CpNADH2*), e outros fazem parte de uma vasta família de fatores de transcrição com funções ainda não estabelecidas (*CpbZIP* e *CplmpA1*), impossibilitando assim estabelecer uma relação da função desse genes com o amadurecimento do mamão papaia.

4.6. CONCLUSÃO

O tratamento dos frutos com etileno e 1-MCP, além de empregado na fisiologia pós-colheita dos frutos, pode ser empregado na caracterização de amostras com padrão de expressão gênica alterado, como visto neste capítulo. A utilização da técnica de *cDNA-AFLP* para o estudo do perfil de expressão gênica e o isolamento de fragmentos de genes relacionados ao amadurecimento do mamão papaia corroborou o emprego dos tratamentos com etileno e 1-MCP dos frutos.

Fragmentos de genes relacionados com a síntese de etileno, metabolismo de parede celular, açúcares e carotenóides, assim como outros genes relacionados ao stress e ao transporte celular, apresentaram suas possíveis funções no amadurecimento e qualidade pós-colheita do mamão papaia discutidas. Desse modo, a técnica de *cDNA-AFLP* demonstrou ser uma ferramenta muito útil para a análise transcriptômica do amadurecimento de frutos, pois além de apresentar uma variabilidade de resultados, como observado pelas diversas funções dos fragmentos isolados, a técnica foi reprodutível, como observado pela quantidade de fragmentos diferencialmente expressos isolados que possuíram relação com o amadurecimento do mamão papaia e a sua qualidade pós-colheita.

4.7. AGRADECIMENTOS

Aos alunos Graziela Conti e Alexandre Buchala pela ajuda na otimização das reações de *cDNA-AFLP*, reamplificação e clonagem dos fragmentos e ao técnico Luiz Marcelo Eugenio pela ajuda nas reações de seqüenciamento.

4.8. REFERÊNCIAS

- Aharoni A., O'Connell A.P. Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays. *J. of Exp. Bot.*, v. 53: p. 2073-2087, 2002;
- Alexander L., Grierson D., Ethylene Biosyntheses and Action in Tomato: a Model for Climateric Fruit Ripening. *J. of Exp. Bot.*, v. 53: p. 2039-2055, 2002;
- Ashan N., Yoon H.S., Jo J. Molecular cloning of a BcPGIP cDNA from *Brassica campestris* and its expression to several stresses. *Plant Science*, v. 169: p. 1081-1089, 2005;
- Bach T.J., Boronat A., Campos N., Ferrer A., Vollack K.U. Mevalonate biosynthesis in plants. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v. 34: p. 107-122, 1999;
- Bachem C.W., van der Hoeven R.S., de Bruijn S.M., Vreugdenhil D., Zabeau M., Visser R.G. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant Journal*, v. 9: 743-753, 1996;
- Bachem C.W.B., Oomen R.J.F.J., Visser R.G.F. Transcript Imaging with cDNA-AFLP: A Step-by-Step Protocol. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 16: p. 157-173, 1998;
- Becraft P.W. Receptor kinases in plant development. *Trends in Plant Science*, v. 3: p. 384-388, 1998;
- Bollenbach T.J., Stern D.B. Divalent Metal-Dependent Catalysis and Cleavage Specificity of CSP41, a Chloroplast Endoribonuclease belonging to the Short Chain Dehydrogenase/Reductase Superfamily. *Nucleic Acids Research*, v. 31: p. 4317 – 4325, 2003;
- Boston R.S., Viitanen P.V., Vierling E. Molecular Chaperones and Protein Folding in Plants. *Plant Molecular Biology*, v. 32: p. 191 – 222, 1996;

- Brummell D.A., Harpster M.H. Cell Wall Metabolism in Fruit Softening and Quality and Its Manipulation in Transgenic Plants. *Plant Molecular Biology*, v. 47: p. 311-340, 2001;
- Burger A.L., Botha F.C. Cloning of a specific ripening-related gene from the multiple of ripening-related genes identified from a single band excised from a cDNA-AFLP gel. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 22: p. 225-236, 2004;
- Chemler J.A., Yan Y., Koffas M.A.G. Biosynthesis of isoprenoids, polyunsaturated fatty acids and flavonoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories* v. 5:20, doi:10.1186/1475-2859-5-20;
- De Lorenzo G., Cervone F. Polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs): their role in specificity and defense against pathogenic fungi, in: G.Stacey, NT Keen (Eds.), *Plant-Microbe Interactions*, v. 3: Chapman & Hall, New York, p. 76-93, 1997;
- De Lorenzo G., D'Ovidio R., Cervone F. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathology*, v. 39: p. 313-335, 2001;
- Deng W.W., Gruissem W. Control of Plastid Gene Expression during Development: The Limited Role of Transcriptional Regulation. *Cell*, v. 49: p. 379 – 387, 1987;
- Dong X., SA, J.A. Ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. in Plant Biology*, v. 1: p. 316-323, 1998;
- Ebbelaar M.e., Tucker G.a., Laats M.M., van Dijk C., Stolle-Smits T., Recourt K. Characterization of pectinases and pectin methylesterase cDNAs in pods of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Molecular Biology*, v. 31: p. 1141-1151, 1996;
- Fabi J.P., Cordenunsi B.R., Barreto G.P., Mercadante A.Z., Lajolo F.M., do Nascimento J.R.O. Papaya fruit ripening: Response to ethylene and 1-MCP. *J. Agric. Food Chem.*, v. 55: p. 6118-6123, 2007;
- Ferl R.J. 14-3-3 proteins: regulation of signal-induced events. *Physiologia Plantarum*, v. 120: p. 173-178, 2004;
- Hannaert V., Henner B., Ulrich N., Willian M. Enolase from *Trypanosoma brucei*, from the Amitochondriate Protist *Mastigamoeba Balamuthi*, and from the Chloroplast and Cytosol of *Euglena gracilis*: Pieces in the Evolutionary Puzzle of the Eukaryotic Glycolytic Pathway. *Molecular Biology Evolution*, v. 17: p. 89-100, 2000;
- Hecht V., Foucher F., Ferrándiz C., Macknight R., Navarro C., Morin J., Vardy M.E., Ellis N., Beltrán J.P., Rameau C., Weller J.L. Conservation of *Arabidopsis*

- flowering genes in model legumes. *Plant Physiology*, v. 137: p. 1420-1434, 2005;
- Huber S.C., Bachmann M., Huber J.L. Post-translational regulation of nitrate reductase activity: a role for Ca^{2+} and 14-3-3 proteins. *Trends in Plant Science*, v. 1: p. 432-438, 1996;
- Jones D.A., Jones J.D.G. The role of leucine-rich repeat proteins in plant defense. *Adv. in Bot. R. Incorpor. Adv. In Plant Pathology*, v. 24: p. 89-166, 1997;
- Kajiwarra S., Fraser P.D., Kondo K., Misawa N. Expression of na exogenous isopentenyl diphosphate isomerase enhances isoprenoid biosynthesis in *Echerichia coli*. *Biochemistry Journal*, v. 324: p. 421-426, 1997;
- Kuhn E. From library screening to microarray technology: strategies to determine gene expression profiles and to identify differentially regulated genes in plants. *Annals of Botany*, v. 87: p. 139-155, 2001;
- Kuramae E.E., Fenille R.C., de Rosa V.E. Identification of 14-3-3-like protein in sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Genetics and Molecular Biology*, v. 24: p. 43-48, 2001;
- Laughner B., Lawrence S.D., Ferl R.J. 2 tomato fruit homologs of 14-3-3 mammalian brain proteins. *Plant Physiology*, v. 105: p. 1457-1458, 1994;
- Leckie F., Mattei B., Capodicasa C., Hemmings A., Nuss L., Aracri B., De Lorenzo G., Cervone F. The specificity of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP): a single amino acid substitution in the solvent-exposed beta-strand/beta-turn region of the leucine-rich repeats (LRRs) confers a new recognition capability. *Embo Journal*, v. 18: p. 2352-2363, 1999;
- Levy Y.Y., Mesnage S., Mylne J.S., Gendall A.R., Dean C. Multiple roles of *Arabidopsis* VRN1 in vernalization and flowering time control. *Science*, v. 297: p. 243-246, 2002;
- Li R., Rimmer R., Yu M., Sharpe A.G., Séguin-Swartz G., Lydiate D., Hegedus D.D. Two *Brassica napus* polygalacturonase inhibitor protein genes are expressed at different levels in response to biotic and abiotic stresses. *Planta*, v. 217: p. 299-308, 2003;
- Liang P., Pardee A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, v. 257: p. 967-971, 1992;
- López-Gómez R., Gómez-Lim M.A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *Hortscience*, v. 27: p. 440-442, 1992;

- López-Gómez R., Moralez-Domínguez F., Alcázar O.M., Gómez-Lim M.A. Identification of a Genomic Clone to ACC oxidase from Papaya (*Carica papaya* L.) and Expressions Studies. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52: p. 794-800, 2004;
- Nagasawa M., Mori H., Shiratake K., Yamaki S. Isolation of cDNAs genes expressed after/during fertilization and fruit set of melons (*Cucumis melo* L.). *J. of the Jap. Soc. for Hort. Science*, v. 74: p. 23-30, 2005;
- Németh K., Salchert K., Putnoky P., Bhalerao R., Koncz-Kálmán Z., Stankovic-Stangeland B., Bakó L., Mathur J., Ökrész L., Stabel S., Gelgenberger P., Stitt M., Rédei G.P., Schell J., Koncs C. Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, v. 12: p. 3059-3073, 1998;
- Oomen R.J.F.J., Bergervoet M.J.E.M., Bachem C.W.B., Visser R.G.F., Vincken J.P. Exploring the use of cDNA-AFLP with leaf protoplasts as a tool to study primary cell wall biosynthesis in potato. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 41: p. 965-971, 2003;
- Richard L., Qin L.X., Gadgil P., Goldberg R. Molecular cloning and characterization of a putative pectin methylesterase cDNA in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* v. 355: p. 135-139, 1994;
- Richard L., Qin L.X., Goldberg R. Clustered genes within the genome of *Arabidopsis thaliana* encoding pectin methylesterase-like enzymes. *Gene*, v. 170: p. 207-211, 1996;
- Rojo E., Gillmor C.S., Kovaleva V., Somerville C.R., Raikhel N.V. VACUOLELESS1 is an essential gene required for vacuole formation and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, v. 1: p. 303-310, 2001;
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York USA, 1989;
- Seymour G., Taylor J., Tucker G. Biochemistry of fruit ripening. Chapman & Hall, London, 1993;
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS*, v. 74: p. 5463-5467, 1977;
- Sheldon C.C., Rouse D.T., Finnegan E.J., Peacock W.J., Dennis E.S. The molecular basis of vernalization: The central role of FLOWERING LOCUS C (FLC). *PNAS*, v. 97: p. 3753-3758, 2000;
- Shiratake K., Matinoia E. Transporters in fruit vacuoles. *Plant Biotechnology*, v. 24, p. 127-133, 2007;

- Sitrit Y., Bennett A.B. Regulation of Tomato Fruit Polygalacturonase mRNA Accumulation by Ethylene: A Re-Examination. *Plant Physiol.*, v. 116: p. 1145-1150, 1998;
- Stankovic B., Stankovic A. G., Smith C. M., Davies E. Isolation, Sequencing, and Analysis of a 14-3-3 Brain Protein Homolog from Pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol.*, v. 107: p. 1481-1482, 1995;
- Stern D.B., Kindle K.L. 3' End Maturation of the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast *atpB* mRNA is a Two-step Process. *Journal Biology Chemistry*, v. 264: p. 18742 – 18750, 1989;
- Storozhenko S., Pauw P.D., Kushnir S., Montagu M.V., Inzé D. Identification of an *Arabidopsis thaliana* cDNA Encoding a HSP70-related Protein Belonging to the HSP110;SSE1 Subfamily. *FEBS Letters*, v. 390: p. 113 – 118, 1996;
- Straeten D.V.D., Rodrigues-Pousada R.A., Goodman H.M., Montagu M.V. Plant enolase: Gene Structure, Expression, and Evolution. *The Plant Cell*, v. 3: p. 719 – 735, 1991;
- Takano J., Miwa K., Yuan L., von Wirén N., Fujiwara T. Endocytosis and degradation of BOR1, a boron transporter of *Arabidopsis thaliana*, regulated by boron availability. *PNAS*, v. 102: p. 12276-12281, 2005;
- Tatusova T.A., Madden T.L. "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences". *FEMS Microbiology Letters*, v. 174: p. 247-250, 1999;
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, v. 22: p. 4673-4680, 1994;
- Trindade L.M., Horvath B.M., van Berloo R., Visser R.G.F. Analysis of genes differentially expressed during potato tuber life cycle and isolation of their promoter regions. *Plant Science*, v. 166: p. 423-433, 2004;
- Umeda M., Uchimiya H. Differential Transcript Levels of Genes Associated with Glycolysis and Alcohol Fermentation in Rice Plant (*Oryza sativa* L.) under Submergence Stresses. *Plant Physiology*, v. 106: p. 1015 – 1022, 1994;
- Vierling E. The Roles of Heat Shock Proteins in Plants. *Rev. Plant Physiology Plant Molecular Biology*, v. 42: p. 579-620, 1991;
- Wang K.L.C., Li H., Ecker J.R. Ethylene Biosyntheses and Signaling Networks. *The Plant Cell* (S): p. S131-S151, 2002;

- Yong WD, Link B, O'Malley R, Tewari J, Hunter CT, Lu CA, Li XM, Bleecker AB, Koch KE, McCann MC, McCarty DR, Patterson SE, Reiter WD, Staiger C, Thomas SR, Vermerris W, Carpita NC. Genomics of plant cell wall biogenesis. *Planta*, v. 221: p. 747-751, 2005;
- Zhang H., Wang J., Hwang I., Goodman H.M. Isolation and Expression of an *Arabidopsis* 14-3-3-like Protein Gene. *Biochimica et Biophysica Acta* v. 1266: p. 113-116, 1995.
- Zheng X.W., Chen X.W., Zhang X.H., Lin Z.Z., Shang J.J., Xu J.C., Zhai W.X., Zhu L.H. Isolation and identification of a gene in response to rice blast disease in rice. *Plant Molecular Biology*, v. 54: p. 99-109, 2004.

CAPÍTULO 5

ANÁLISE DIFERENCIAL DA EXPRESSÃO GÊNICA DURANTE O AMADURECIMENTO DO MAMÃO PAPAIA UTILIZANDO CROSS- SPECIES MICROARRAY

5.1. RESUMO

O uso de oligonucleotídeos de alta densidade (*chips*) para a análise transcriptômica de espécies vegetais tem sido amplamente empregado. Devido às escassas informações sobre os genomas de frutos, os *chips* comerciais englobam apenas as espécies de tomate, citrus e uva. Dessa maneira, a técnica de *Cross-Species Microarray* (*XSpecies Microarray*) é uma forte candidata para a análise do transcriptoma de outros frutos de interesse. Um chip de *Arabidopsis thaliana* (ATH1-121501) foi utilizado para hibridização com RNAs da polpa de frutos de mamão papaia verdes e maduros, a fim de estabelecer um panorama do transcriptoma do amadurecimento dessa fruta. Resultados preliminares mostraram que genes ligados ao metabolismo e transporte de açúcares, lipídeos e carotenóides, ligados à degradação de parede celular e alguns fatores de transcrição dependentes de hormônios vegetais pareceram apresentar diferenças de expressão durante o amadurecimento do mamão papaia. Os resultados mostram que a técnica de *Cross-Species Microarray* pode ser uma ferramenta importante na análise transcriptômica do amadurecimento do mamão com vista à identificação de genes importantes para a qualidade pós-colheita dessa fruta.

5.2. INTRODUÇÃO

Oligonucleotídeos de alta densidade (*chips*) representam uma ferramenta poderosa utilizada para a análise transcriptômica de várias espécies vegetais (LIPSHUTZ *et al.*, 1999). Os *chips*, que são preenchidos com oligonucleotídeos representando diversos genes de uma determinada espécie de vegetal, formam uma matriz para hibridização com RNAs. Um tipo de *chip* comercial padronizado e utilizado amplamente utiliza tecnologia GeneChip® (Affymetrix®). As hibridizações utilizando a tecnologia GeneChip® são reprodutíveis e são facilmente armazenadas para que as comparações possam ser feitas entre diferentes experimentos (CRAIGON *et al.*, 2004; HARMER *et al.*, 2000; ZHU; WANG, 2000). Um exemplo são os dados públicos de diferentes experimentos utilizando o vegetal modelo *Arabidopsis thaliana* (CRAIGON *et al.*, 2004). Entretanto, para o estudo de outros tipos de vegetais, são poucos os *chips* do tipo GeneChip® comercialmente disponíveis, que além da *Arabidopsis*, tomate, uva e citrus também apresentam formas comerciais de *chips*. Essa dificuldade em desenvolver *chips* específicos para frutos é devido a pouca informação genômica existente da espécie de interesse.

Uma solução para esse problema foi proposta por Ji *et al.* (2004), e aperfeiçoada por Hammond *et al.* (2005), autores esses que patentearam a técnica e a nomearam de *Cross-Species Microarray* (XSpecies Microarray, <http://affymetrix.arabidopsis.info/xspecies/>). Enquanto os primeiros autores utilizaram um GeneChip® de genes humanos e hibridizaram com RNAs de gado, porco e cachorro, os segundos autores utilizaram um GeneChip® de *Arabidopsis thaliana* e hibridizaram com RNA de *Brassica olerace*. A base da técnica é a proximidade filogenética das espécies estudadas, isto é, a diferença de bases dos

oligonucleotídeos nos *chips* teria pouco efeito na quantificação da hibridização dos RNAs de uma espécie no *chip* de outra espécie. Porém, verificou-se que era necessário fazer uma pré-normalização, hibridizando o *chip* comercial utilizado com o DNA genômico fragmentado da espécie de estudo. Usando de artefatos bioinformáticos, limites de intensidade de hibridização do DNA com o *chip* foram criados (*thresholds*) e, baseado nesses resultados, os valores de intensidade da hibridização dos RNAs com o *chip* foram normalizados (HAMMOND *et al.*, 2005). Dessa maneira, foi possível fazer uma análise transcriptômica, de espécies que não possuíam *chips* comerciais, abrangendo grande número de genes e sendo os resultados reprodutíveis quando comparados com os resultados obtidos utilizando outras técnicas de análise de expressão, como *Real Time-PCR* (HAMMOND *et al.*, 2006).

Nessa tese, a técnica foi conduzida a partir de um *chip* preenchido com oligonucleotídeos específicos de *Arabidopsis thaliana*, espécie que possui ordem filogenética semelhante ao mamão papaia (*Brassicales*). O protocolo experimental empregado na análise foi o desenvolvido por Hammond *et al.* (2005) e o *chip* utilizado para a análise foi o ATH1-121501 Gene-Chip[®] array (Affymetrix[®]), a partir da análise de mais de 22.500 oligonucleotídeos representativos de aproximadamente 24.000 genes de *Arabidopsis thaliana* (<http://www.affymetrix.com/products/arrays>).

5.3. MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

As amostras de polpa de mamão papaia analisadas no período foram referentes ao segundo dia pós-colheita (verde) e ao quarto dia pós-colheita (maduro) do grupo de frutos controle da Amostragem II, como exposto no **Capítulo 2 (Figura 4, página 34)**. As amostras de folhas de mamoeiro analisadas foram coletadas de plantas jovens, cultivar “Golden”, com aproximadamente três anos de idade.

Extração do DNA genômico e do RNA total

O DNA genômico de folhas jovens de mamoeiro foi extraído utilizando-se o método desenvolvido por Doyle e Doyle (1990), a partir de 100 mg de folhas. Para a extração do RNA total da polpa dos frutos das amostras utilizou-se o método desenvolvido por Lopez-Gómez e Gómez-Lim (1992), como apresentado no **Capítulo 3** página 67, e as amostras resultantes foram purificadas utilizando a coluna RNeasy®, presente no kit “RNeasy® Plant Mini Kit” (Qiagen®).

Quantificação e análise da qualidade de ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos foram quantificados por espectrofotometria utilizando o aparelho NanoDrop® ND-1000 (Nanodrop Technologies®), tendo como referência o fato de que a absorbância de uma amostra de 40 µg/mL de RNA ou 50 µg/mL de DNA a 260 nm deve ser igual a 1 (SAMBROOK *et al.*, 2000).

A análise da qualidade dos ácidos nucleicos foi feita com base na razão da leitura das absorbâncias a 260nm e 280nm (260 nm/280 nm), considerando que os valores de amostras puras devem ser 1,8 para DNA e 2,0 para RNA (SAMBROOK *et*

al., 2000). A análise da integridade dos ácidos nucleicos foi feita por eletroforese em gel de agarose 1% ou 1,5%, contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo em tampão Tris-acetato 0,02 M pH 8 e EDTA 0,0005 M ou tampão Tris-acetato 0,04 M pH 8 e EDTA 0,001 M (SAMBROOK *et al.*, 2000), realizada a voltagem constante (80V ou 100V) durante 25 ou 30 minutos.

Para as amostras de RNAs houve ainda uma segunda análise da quantidade, pureza e qualidade utilizando o aparelho “Agilent 2100 Bioanalyser” (Agilent Technologies®).

Hibridização com DNA genômico

O DNA genômico foi marcado com o kit “Bioprime DNA labelling System” (Invitrogen™) e posteriormente hibridizado ao chip ATH1-121501 por 16 horas a 45 °C utilizando protocolos padrões de hibridização desenvolvidos pela Affymetrix®. Após hibridização, o chip foi analisado com o aparelho “Affymetrix® G2500A Gene Array scanner” e um arquivo de intensidade das hibridizações contendo os dados de hibridização do DNA genômico com os oligos do *chip* foi gerado pelo *software* “Microarray Analysis Suite” (MAS Version 5.0; Affymetrix®). A análise foi feita através da contagem dos genes (*probe-sets*) representados por vários oligonucleotídeos (*probe-pairs*) com intensidades de hibridização diferentes quando analisados com um *script* desenvolvido em linguagem *Perl* (<http://www.perl.com>), disponível no endereço eletrônico <http://affymetrix.arabidopsis.info/xspecies>. Esse *script* permitiu criar arquivos de compatibilidade da espécie em análise (*Carica papaya*) e o *chip* utilizado de outra espécie (*Arabidopsis thaliana*), considerando os limites de intensidade (*thresholds*) estipulados pelo usuário, foi possível realizar a análise sob

condições mais ou menos estrigente (maior ou menor valor do *threshold*, respectivamente). Os valores de *threshold* variaram de 20 a 1000, sendo os dados gerados armazenados e utilizados na análise da hibridização do *chip* com os RNAs dos frutos verde e maduro.

Síntese dos cRNAs e hibridização com o chip

Aproximadamente 5 µg de RNA total foram incubados a 42 °C por 1 hora, junto com 200 unidades da enzima transcriptase reversa (“SuperScript II reverse transcriptase” Invitrogen™), para a síntese do DNA complementar simples fita. Foram utilizados 100 pmol de um *primer* oligo dT(24) com a seqüência promotora da enzima RNA polimerase (5'-T7 RNA polymerase), em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,3) contendo KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, ditioneitol (DTT) 10 mM e dNTPs 10 mM. Após síntese da primeira fita de DNA complementar, a segunda fita foi sintetizada utilizando 10 unidades da enzima DNA polimerase de *Escherichia coli* e 2 unidades de RNase H, em tampão Tris-HCl 25 mM (pH 7.5) contendo KCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, b-NAD⁺ 0,15 mM e dNTPs 10 mM. Essa reação foi incubada a 16 °C por 2 horas, e após esse período adicionaram-se 10 unidades da enzima T4 DNA polimerase e a reação foi incubada novamente a 16 °C por 5 minutos. A reação foi terminada adicionando-se EDTA 0,5 M e os produtos de cDNA dupla-fita foram purificados utilizando o “GeneChip® Sample Cleanup Module” (Affymetrix®). Após a purificação, os cDNAs foram submetidos a transcrição *in vitro* pela enzima T7 RNA polimerase utilizando o kit “Enzo BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit” (Enzo Life Sciences Inc.) em presença de nucleotídeos biotinilados para gerar RNAs complementares (cRNAs) biotinilados. Os cRNAs foram purificados utilizando

novamente o “GeneChip® Sample Cleanup Module” (Affymetrix®), sendo então fragmentados aleatoriamente por incubação a temperatura de 94 °C por 35 minutos, em tampão Tris-acetato 40 mM (pH 8,1) contendo acetato de potássio 100 mM e acetato de magnésio 30 mM, para gerar moléculas de aproximadamente 35 a 200 pb. Dois *chips* ATH1-121501 de *Arabidopsis thaliana*, um para cada grupo de RNA (de frutos verdes e maduros), foram hibridizados por 16 horas a 45 °C com 15 µg de cRNAs marcados e fragmentados, utilizando protocolos-padrão de hibridização desenvolvidos pela Affymetrix®. Após a hibridização, os *chips* foram corados com solução de straptavidina-ficoeritina, analisados com o aparelho “Affymetrix® G2500A Gene Array scanner” e, para cada hibridização, um arquivo de intensidade contendo os dados de hibridização dos cRNAs com os oligos do *chip* foi criado pelo *software* “Microarray Analysis Suite” (MAS Version 5.0; Affymetrix®).

Análise dos dados

Os arquivos de intensidade gerados tanto da hibridização do DNA genômico quanto da hibridização dos RNAs foram analisados com o *software* *GeneSpring* (Agilent Technologies), utilizando o algoritmo de pré-normalização *Robust Multichip Average* (RMA, IRIZARRY *et al.*, 2003). Durante a análise, os arquivos gerados da hibridização com os RNAs foram pré-normalizados utilizando os dados da hibridização do DNA genômico com o *chip* de *Arabidopsis thaliana* sem considerar um valor limite de intensidade (*threshold* igual a 0) e com a utilização de valores crescentes (*thresholds* 20, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 1000).

5.4. RESULTADOS

Integridade dos RNAs

Como etapa decisiva para a qualidade da análise de expressão gênica por *XSpecies Microarray*, as amostras de RNA total dos frutos verdes e maduros foram submetidas a uma avaliação de sua integridade por fluorescência utilizando o aparelho “2100 Bioanalyzer”. As **Figuras 10A e 10B** mostram os eletroferogramas gerados por essa análise. Os picos correspondentes aos RNAs ribossomais 18S e 28S (1 e 2) apresentaram área de gráfico e tempos de retenção característicos de uma amostra com integridade ideal para a análise por *Microarray* (<http://affymetrix.arabidopsis.info/QC/index.html>). A proporção ideal, em amplitude, entre o pico registrado para o RNA ribossomal 28S e o 18S (28S/18S), deve ser igual a dois. Os valores da razão para os RNAs dos frutos verdes e maduros foram 1,45 e 1,00, respectivamente. Apesar de não terem alcançado o valor máximo da razão entre os RNAs ribossomais, as amostras foram consideradas íntegras o suficiente para a análise por *Microarray*, pois não apresentaram um eletroferograma característico de uma amostra de RNA degradado exemplificado na **Figura 10C**. É de fundamental importância que as amostras de RNAs estejam íntegras, já que se os RNAs ribossomais apresentarem sinais de degradação, os RNAs mensageiros (mRNA), que representam de 1% a 2% do RNA total, muito provável já estariam degradados, inviabilizando assim a síntese de simples fita e dupla fita de DNA e a síntese *in vitro* dos RNAs complementares (cRNAs), utilizados na hibridização com o *chip* de *Arabidopsis thaliana*.

Figura 10. Avaliação da integridade de RNA por fluorescência. Os eletroferogramas apresentados mostram os picos correspondentes aos RNAs ribossomais 18S (1) e 28S (2). **A)** análise do RNA extraído de frutos verdes. **B)** análise do RNA extraído de frutos maduros. **C)** exemplo da análise de um RNA degradado. Os picos dos RNAs ribossomais dos gráficos **A** e **B** mostram a integridade do RNA analisado quando comparados com os picos dos RNAs ribossomais do gráfico **C**. As duas colunas ao lado dos gráficos **A** e **B** representam uma simulação computadorizada das bandas de RNAs dipostas em uma eletroforese em gel de agarose.

Hibridização do DNA e dos cRNAs com o chip ATH1-121501

Como pode ser notado na **Figura 11**, o DNA genômico hibridizou largamente com os oligonucleotídeos presentes no *chip* de *Arabidopsis*, observando-se que quanto maior o número do *threshold* utilizado, menor o número de *probe-pairs* e *probe-sets* retidos para análise. Isso se deve a definição de um *probe-set*, que é composto por vários *probe-pairs* (de 11 a 20), que por sua vez são compostos por dois *oligos* de 25 pares de base cada, sendo que um deles é o *perfect-match* (PM, com seqüência exata de parte de um gene de *Arabidopsis* em questão) e o outro é o *mismatch* (MM, com mesma seqüência do PM, porém uma das bases é diferente). Dessa maneira, quando a sonda de DNA hibridiza, tanto no PM quanto no MM ou em apenas um deles, o valor da intensidade do *probe-pair* é computado, e quando ultrapassa um valor de intensidade mínimo dos *probe-pairs*, computa-se um *probe-set* inteiro, referente ao gene de *Arabidopsis* em questão. Esses valores são analisados em conjunto pelo *script* do programa *Perl*, levando em consideração que quanto maior for a discrepância de sinais entre os *probe-pairs* de um *probe-set*, maior a possibilidade do DNA ter hibridizado de maneira inespecífica e, dessa maneira, eles são rejeitados, sempre utilizando os valores de *threshold* como referências. Portanto, seria esperado que utilizando um número maior de *threshold*, os números de *probe-pairs* e *probe-sets* retidos para a análise diminuiriam.

Figura 11. Número de *probe-sets* e *probe-pairs* retidos do chip ATH1-121501 de *Arabidopsis thaliana* após hibridização com DNA genômico de mamão papaia. O eixo das ordenadas à esquerda representa os *probe-sets* retidos (□) e o eixo das ordenadas à direita representa os *probe-pairs* retidos (○).

As hibridizações dos RNAs dos frutos verdes e maduros com o chip de *Arabidopsis* apresentaram boa intensidade (**Figura 12**). Utilizando os arquivos de normalização gerados pela hibridização do DNA genômico com o *chip* utilizando os valores de *thresholds*, arquivos denominados de *mask*, foram feitas as comparações dos arquivos de intensidade das hibridizações dos RNAs. O primeiro gráfico da **Figura 12** apresenta a comparação das intensidades das hibridizações dos RNAs dos frutos verdes e maduros não utilizando normalização alguma (**No mask**). A apresentação do gráfico foi feita dividindo os genes em oito *clusters* distintos (pré-definidos pelo usuário), e cada ponto representa um diferente *probe-set*, cujas cores

dos pontos refletem o valor logarítmico do sinal de intensidade proveniente da hibridização dos RNAs com os *probe-sets*, representando assim a expressão de cada gene (quanto mais vermelho, mais expressos e quanto mais azul, menos expressos). Como pode ser observada, a grande maioria dos genes, revelados pela intensidade do sinal de hibridização, se encontra com padrões de expressão compreendidos entre as duas retas limítrofes. Essas retas representam o limiar da diferença de expressão entre as amostras, sendo de 1,5 vezes para os frutos maduros (eixo das ordenadas) ou 1,5 vezes para frutos verdes (eixo das abscissas). Esse resultado mostra que é necessária uma normalização baseada na hibridização prévia do *chip* de *Arabidopsis* com DNA genômico de mamão papaia, a qual permite gerar diferentes *masks* que serão utilizados para excluir *probe-pairs* com hibridização inespecífica. Dessa maneira, essa normalização diminui os valores gerais de intensidade dos *probe-sets*, e as diferenças entre eles se tornam mais evidentes, como pode ser observado nos gráficos restantes da **Figura 12**, nos quais foram aplicados os *masks* com valores de *threshold* de 60, 100, 200, 400 e 1000 (*mask60*, *mask100*, *mask200*, *mask400* e *mask1000*, respectivamente).

As **Tabelas 4 e 5** mostram os principais genes diferencialmente expressos retidos pela análise dos RNAs de frutos verdes e maduros utilizando como valor de *threshold* 200 (*mask200*) e com possível relação com o amadurecimento e qualidade pós-colheita do mamão papaia. A intensidade média (soma das intensidades normalizadas dos *probe pairs*) de cada gene dos frutos verdes e maduros também são apresentados nas tabelas, sendo selecionados apenas os genes com valores de probabilidade menores que 5% pelo teste t de *Student* ($p < 0,05$). As identidades completas dos genes se encontram no Apêndice.

Figura 12. Sinal de intensidade dos genes (*probe-sets*) na hibridização dos RNAs dos frutos verdes e maduros com o chip ATH1-121501 de *Arabidopsis thaliana*. O software GeneSpring organizou os genes em oito diferentes *clusters*. O eixo das ordenadas dos gráficos de cada *cluster* é representado pela intensidade dos genes hibridizados com o RNA dos frutos maduros (*Ripe*). O eixo das abscissas dos gráficos de cada *cluster* é representado pela intensidade dos genes hibridizados com o RNA dos frutos verdes (*Unripe*). Cada valor de *threshold* utilizado está representado pelos valores dos diferentes *masks*. A régua ao lado direito dos gráficos representa a intensidade de hibridização dos *probe-sets* com os RNAs e expressados em cores e números. Vermelho: maior intensidade. Azul: menor intensidade.

Tabela 4. Prováveis genes com expressão > 1,5 vezes nos frutos verdes obtidos com *mask200*.*

Número do <i>probe-set</i>	Provável identidade	Intensidade Verde**	Intensidade Maduro**	Teste $t^{\dagger}$
247856_at	<i>Receptor-like protein kinase</i>	22,9	3,4	0,015
250977_at	<i>importin alpha-like protein</i>	13,7	6,6	0,030
253099_s_at	<i>Peroxidase-like protein</i>	10,2	5,3	0,045
266175_at	<i>NAM (no apical meristem)-like protein</i>	18,1	10,9	0,021
266464_at	<i>glutathione-conjugate transporter</i>	9,6	4,0	0,05
264325_at	<i>putative phosphoribosylanthranilate transferase</i>	12,4	3,8	0,035
261248_at	<i>calreticulin</i>	23,0	5,4	0,015

*A tabela completa se encontra no Apêndice.

Intensidade média dos PM e MM dos *probe-pairs* de cada *probe set*. $t^{\dagger}$ Teste paramétrico de probabilidade do tipo *Student* utilizando os frutos verdes e maduros.Tabela 5.** Prováveis genes com expressão > 1,5 vezes nos frutos maduros obtidos com *mask200*.*

Número do <i>probe-set</i>	Provável identidade	Intensidade Verde**	Intensidade Maduro**	Teste $t^{\dagger}$
247638_at	<i>arabinogalactan protein-like</i>	5,7	15,3	0,020
248718_at	<i>farnesyl diphosphate synthase precursor</i>	5,7	12,3	0,026
248780_at	<i>4-nitrophenylphosphatase-like protein</i>	20,3	34,6	0,007
249078_at	<i>phytochelatin synthase</i>	5,0	9,0	0,041
249541_at	<i>anthranilate N-benzoyltransferase –like protein</i>	70,9	118,2	0,001
249658_s_at	<i>N-glyceraldehyde-2-phosphotransferase-like protein</i>	8,9	17,1	0,017
249830_at	<i>dihydroorotate dehydrogenase precursor</i>	6,1	11,9	0,028
250958_at	<i>laccase precursor</i>	4,4	16,4	0,018
252005_at	<i>purple acid phosphatase-like protein</i>	4,9	21,9	0,012
252394_at	<i>heat shock protein-like hsp40</i>	7,1	13,4	0,023
252442_at	<i>dUTP pyrophosphatase-like protein</i>	6,6	11,7	0,028
252943_at	<i>cinnamyl-alcohol dehydrogenase CAD1</i>	9,4	34,3	0,007
259926_at	<i>putative DNA-3-methyladenine glycosylase I</i>	7,1	14,3	0,021

260392_at	<i>putative enolase</i>	15,5	28,3	0,009
261560_at	<i>acyl CoA thioesterase</i>	4,0	8,6	0,044
263306_at	<i>putative serine carboxypeptidase II</i>	4,8	8,0	0,048
263443_at	<i>putative fatty acid elongase</i>	13,2	21,2	0,013

*A tabela completa se encontra no Apêndice.

**Intensidade média dos PM e MM dos *probe-pairs* de cada *probe set*.

†Teste paramétrico de probabilidade do tipo *Student* utilizando os frutos verdes e maduros.

5.5. DISCUSSÃO

De acordo com os critérios de seleção estabelecidos na análise, os pontos acima ou abaixo das retas limítrofes podem ser candidatos a genes diferencialmente expressos durante o amadurecimento do mamão papaia. A diferença fica clara quando se considera o *mask100*, isto é, valor de *threshold* igual a 100, cujos pontos ficam cada vez mais distantes das retas limítrofes quando comparados com valores de *threshold* menores (**Figura 12**). Já a porcentagem de todos os genes considerados diferencialmente expressos antes da exclusão pelo teste de probabilidade, em comparação com os *prob-sets* retidos, tende a aumentar, com valores de 34,74%, 36,20% e 40,97% para os valores de *mask100*, *mask200* e *mask400*, respectivamente (**Figuras 12**). Entretanto, apesar da porcentagem de *probe-sets* ter aumentado, foram perdidos vários *probe-sets* representados pelo oitavo *cluster*, devido à provável perda de sinal decorrente do aumento de estringência na normalização com o DNA genômico, e devido também à análise estatística.

Como se pode observar nas **Tabelas 4 e 5**, o número de genes relevantes e passíveis de futuros estudos foi relativamente baixo quando comparado com o número de *probe-sets* retidos que representaram genes diferencialmente expressos (2072 *probe-sets*) de um total de 5723 *probe-sets* retidos (36,20%). Quando o teste t

de *Student* é aplicado, esses números são reduzidos para 163 *probe-sets* diferencialmente expressos de um total de 802 *probe-sets* retidos (20,32%). Um total de 24 genes (**Tabelas 4 e 5**) ligados ao metabolismo e transporte de açúcares, lipídeos e carotenóides, ligados à degradação de parede celular e fatores de transcrição dependentes de hormônios vegetais pareceram apresentar diferenças de expressão durante o amadurecimento e possível relação com a qualidade pós-colheita do mamão papaia.

O gene de uma enolase, com número de identificação 260392_at no chip de *Arabidopsis thaliana*, aumentou de expressão quase duas vezes nos frutos maduros. Como apresentado no **Capítulo 4**, foi possível isolar um gene de uma enolase de mamão papaia por *cDNA-AFLP*, cujo aumento de expressão dos frutos tratados com etileno condiz com o aumento de expressão nos frutos maduros alcançados pelo uso da técnica de *XSpecies Microarray*. Analisando-se o *probe-set* referente ao gene da enolase de *Arabidopsis* com identificação 260392_at, notou-se que as construções dos *probe-pairs* foram baseadas na seqüência de nucleotídeos depositada no GenBank com número de acesso de NM_106062 (https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/fullrecord.affx?pk=ATH1-121501%3A260392_AT). Utilizando a ferramenta de bioinformática disponível na internet, o “Blast-two-sequence” (TATUSOVA *et al.*, 1999) (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi), as seqüências de proteínas preditas de *Arabidopsis* e de mamão papaia foram alinhadas, resultando em um “score” de 84,4 *bits* e um “e-value” de $3e^{-31}$. Desse modo, esses resultados sugerem que a técnica de *XSpecies Microarray* foi eficiente não só na análise da expressão gênica durante o amadurecimento do mamão papaia, mas também por ter relacionado a função dos genes diferencialmente expressos com esse

amadurecimento, apesar de não ter isolado fragmentos de genes da espécie estudada, como o *cDNA-AFLP*.

Entretanto, com apenas uma hibridização de cada grupo de RNA, não se pode afirmar inequivocadamente que esses genes realmente apresentam diferenças de expressão nos frutos verdes e maduro, visto que a única análise estatística feita é a do próprio *software*, que analisa as diferenças de intensidades entre os *probe-pairs* de um *probe-set* nos diferentes grupos (teste paramétrico de probabilidade *t* de *Student*).

Hammond *et al.* (2005; 2006) destacaram que a análise baseada em apenas um experimento de hibridização não é suficiente para alcançar dados estatisticamente válidos para a comparação de genes diferencialmente expressos. Os autores concluíram que quanto maior o número de experimentos, mínimo em triplicata, maior o número de *probe-sets* retidos quando aplicada a normalização de forma mais rigorosa, isto é, com valores de *threshold* maiores. Hammond *et al.* (2006) constataram que o melhor valor de *threshold* para o experimento em questão foi o de 300 (*mask300*), pois os prováveis genes diferencialmente expressos em questão, quando analisados por *Real Time-PCR*, apresentaram correlações satisfatórias quando comparados com a análise por *XSpecies Microarray*. Isso demonstra a reprodutibilidade da técnica desde que efetuada a normalização rigorosa, sejam feitas as análises estatísticas dos *probe-sets* de cada replicata (no caso foi utilizado análise estatística ANOVA) e os dados resultantes de, no mínimo, triplicatas de experimento (HAMMOND *et al.*, 2005; 2006).

5.6. CONCLUSÃO

A técnica de *XSpecies Microarray* foi aplicada com sucesso na análise de transcritos de mamão papaia, mostrando-se tão efetiva quanto os trabalhos anteriormente relatados em plantas (HAMMOND *et al.*, 2005; 2006). Alguns genes interessantes, que potencialmente são alterados durante o amadurecimento, foram identificados, mostrando o potencial de aplicação no estudo do amadurecimento do mamão. Esse resultado é devido, em grande parte, à proximidade filogenética entre o mamão e a *Arabidopsis thaliana*, espécies que pertencem à mesma ordem filogenética (*Brassicales*). Entretanto, é necessário que novos experimentos sejam realizados, pois para o método ser reprodutível, é necessário efetuar, no mínimo, uma triplicata de experimento (HAMMOND *et al.* 2005, 2006). Com a caracterização da expressão de vários genes de *Arabidopsis*, torna-se mais fácil identificar a relação desses genes com o amadurecimento e a qualidade pós-colheita visando o isolamento desses genes no mamão papaia.

5.7. AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Graham B. Seymour pelos seis meses de trabalho em conjunto desenvolvido na *University of Nottingham – UK* (maio a novembro de 2006), ao professor Dr. Sean May e todos os técnicos da NASC (NOTTINGHAM ARABIDOPSIS STOCK CENTRE - UK) e a Jackie Humpreys pela ajuda nas instalações estudantis.

5.8. REFERÊNCIAS

- Craigon D.J., James N., Okyere J., Higgins J., Jotham J., May S. NASCArrays: a repository for microarray data generated by NASC's transcriptomics service. *Nucleic Acids Research*, v. 32: p. 575-577, 2004;
- Doyle, J.J. e Doyle J.L.. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v. 12: p. 13-15, 1990;
- Hammond J.P., Bowen H.C., White P.J., Mills V., Pyke K.A., Baker A.J.M., Whiting S.N., May S.T., Broadley M.R. A comparison of the *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi arvense* shoot transcriptomes. *New Phytologist*, v. 170: p. 239-260, 2006;
- Hammond J.P., Broadley M.R., Craigon D.J., Higgins J., Emmerson Z., Townsend H., White P.J., May S.T. Using genomic DNA-based probe-selection to improve the sensitivity of high-density oligonucleotide arrays when applied to heterologous species. *Plant Methods*, v. 1, 10 doi: 10.1186/1746-4811-1-10, 2005;
- Ji W, Zhou W, Gregg K, Yu N, Davis S, Davis S: A method for cross-species gene expression analysis with high-density oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Research*, v. 32, e93. doi:10.1093/ nar/gnh084, 2004;
- Lipshutz R.J., Fodor S.P.A., Gingeras T.R., Lockhart D.J. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature Genetics*, v. 21: p. 20-24. 1999;
- López-Gómez R., Gómez-Lim M.A.: A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *Hortscience*, v. 27: p. 440-442, 1992;
- Tatusova T.A., Madden T.L. "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences". *FEMS Microbiology Letters*, v. 174: p. 247-250, 1999;
- Wang X., Kreps J.A., Kay S.A. Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science*, v. 290: p. 2110-2113, 2000;
- Zhu T., Wang X. Large scale profiling of the Arabidopsis transcriptome. *Plant Physiology*, v. 124: p.1472-1476, 2000.

CAPÍTULO 6

CLONAGEM DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO DO TIPO MADS-BOX DE MAMÃO PAPAIA

6.1. RESUMO

Os fatores de transcrição são característicos por desempenhar papel importante na modulação da expressão gênica, porém são pouco estudados em frutos. Suas funções se estendem desde sinalizadores protéicos até reguladores diretos da transcrição de certas enzimas. Os fatores de transcrição do tipo MADS-BOX pertencem a uma vasta família, os quais em plantas, já foram amplamente estudados. Entretanto, outros fatores de transcrição, de famílias menores, como os do tipo SBP-BOX, vem sendo alvo de estudos em certos frutos, como é o caso da variedade mutante do tomate *cnr*. Esse trabalho teve por objetivo isolar, em mamão papaia, seqüências de fatores de transcrição com papel regulatório no amadurecimento. O isolamento de uma seqüência genômica de um provável fator de transcrição do tipo SBP-BOX de mamão papaia (*CpSPL*) sugere uma ortologia desses fatores de transcrição nos vegetais. Dois outros prováveis fatores de transcrição do tipo MADS-BOX também foram isolados em mamão papaia (*PAGL1* e *PAP1*), e uma diminuição do número de transcritos de ambos os genes foi observado quando analisados por *Real Time-PCR*. Esses resultados ilustram o potencial de uma abordagem baseada não só no estudo pontual de enzimas envolvidas nos processos bioquímicos, mas no estudo de elementos regulatórios do amadurecimento dos frutos.

6.2. INTRODUÇÃO

Os fatores de transcrição são proteínas que exercem sua função interagindo com moléculas de DNA ou de outras proteínas e agem, principalmente, na transcrição de genes e na tradução de proteínas. Os fatores de transcrição do tipo MADS-BOX, que tem essa denominação devido às quatro primeiras famílias isoladas e caracterizadas (MCM1, AGAMOUS, DEFICIENS e SRF-serum response factor), foram isolados em muitos organismos eucariotos (THEISSEN *et al.*, 1996) e bastante estudados em plantas (ALVAREZ-BUYLLA, 2000; PNUELI, 1994; REICHMANN; MEYEROWITZ, 1997; THEISSEN, 2001). Em tomate, foi caracterizado um grupo de fatores de transcrição do tipo MADS-BOX que teve expressão alterada durante o desenvolvimento do fruto (VICTORIA *et al.*, 2003). Outros tipos de fatores de transcrição, como os do tipo SBP-BOX (KLEIN *et al.*, 1996), são menos estudados, porém foram considerados de fundamental importância para o desenvolvimento das flores em *Arabidopsis thaliana* (CARDON *et al.*, 1997; 1999). Dessa maneira, muitos estudos são focados em fatores de transcrição relacionados com o desenvolvimento das plantas, porém pouco se sabe da atuação deles durante o amadurecimento de frutos.

Manning *et al.* (2006) concluíram que o fenótipo adquirido pelos frutos mutantes *cnr* (*colorless non-ripening*) de tomate é causado por uma mutação epigenética. Os frutos mutantes apresentam o desenvolvimento de pericarpo sem cor e não apresentam a redução da firmeza da polpa durante o amadurecimento (THOMPSON *et al.*, 1999). A hipermetilação da região promotora de um fator de transcrição, do tipo SBP-BOX (*LeSPL-CNR*), é responsável pela diminuição da expressão desse gene no amadurecimento dos frutos mutantes *cnr*, conferindo-lhes

o fenótipo peculiar de redução nos teores de carotenóides e a não diminuição da textura da polpa. O gene do fator de transcrição, quando inserido de forma *antisense* em frutos normais a fim de reduzir a expressão através do silenciamento do gene, resultou em segmentos com características dos frutos *cnr* (MANNING *et al.*, 2006). Quando o gene do fator de transcrição foi inserido de forma *sense* nos frutos mutantes *cnr* para que a expressão fosse aumentada, características de frutos normais foram adquiridas durante o amadurecimento (MANNING; SEYMOUR, 2006, resultados ainda não publicados).

Vrebalov *et al.*, (2002) sugeriram que um fator de transcrição do tipo MADS-BOX (*LeMADS-RIN*) poderia influenciar o amadurecimento do tomate. Utilizando como modelo o mutante *rin* do tomate, foi analisada a expressão do fator de transcrição durante o amadurecimento, revelando um aumento em frutos normais, enquanto que nos frutos mutantes *rin* a expressão foi quase nula. Quando isolado e caracterizado, o RNA desse fator de transcrição se mostrou ligado de forma quimérica a outro fator de transcrição do tipo MADS-BOX (*LeMADS-MC*), sendo esse último expresso de forma constitutiva durante o amadurecimento.

Outro fator de transcrição de tomate, denominado de *TAGL1* (VICTORIA *et al.*, 2003) e pertencente ao grupo MADS-BOX de fatores de transcrição, parece apresentar expressão alterada durante o amadurecimento do fruto (EDUARDO; SEYMOUR, 2006, resultados ainda não publicados). Já no trabalho realizado por Eriksson *et al.* (2004), foi mostrado que outro fator de transcrição do tomate do tipo MADS-BOX (*TDR4*) pode ter influência no amadurecimento de frutos normais, visto que sua expressão aumentou durante o desenvolvimento do fruto (VICTORIA *et al.*, 2003) e diminuiu durante o amadurecimento. Esses resultados sugerem que o grupo

de fatores de transcrição do tipo MADS-BOX pode desempenhar um papel fundamental no amadurecimento de frutos carnosos, como o tomate.

O mamão papaia, um fruto climatérico de grande importância comercial para o Brasil, é considerado um fruto carnoso e está entre as frutas com maior produção no país. Em contrapartida, os conhecimentos bioquímico-moleculares acerca da regulação do amadurecimento do mamão papaia ainda são limitados (DEVITT *et al.*, 2006). A evolução do conhecimento sobre o processo de amadurecimento desse fruto, especialmente o estudo de genes ortólogos de fatores de transcrição potencialmente relevantes para a regulação do amadurecimento, pode contribuir para ampliar o entendimento dos mecanismos regulatórios envolvidos e para o desenvolvimento de novos métodos para a minimização das perdas pós-colheita do fruto. Desse modo, esse trabalho teve por objetivo a identificação, em mamão papaia, de ortólogos de fatores de transcrição do tipo SBP-BOX e MADS-BOX.

6.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

As amostras de polpa de mamão papaia analisadas foram referentes ao segundo dia pós-colheita (verde) e ao quarto dia pós-colheita (maduro) do grupo de frutos controle (não-tratados) da Amostragem II, como exposto no **Capítulo 2 (Figura 4, página 34)**. As amostras de folhas de mamoeiro analisadas foram coletadas de plantas jovens, cultivar “Golden”, com aproximadamente três anos de idade.

Primers

Abaixo estão apresentadas as seqüências de *primers* utilizadas nos vários experimentos. O código de ambigüidades de ácidos nucleicos está apresentado de acordo com a IUPAC-IUB/GCG:

> oligo (dT₁₅): 5'-(T₁₅)VN-3'

>CCA_S1: 5'-ATGGAAACCAACAAATGGGAAGGC-3'

>CCAD_S1: 5'-ATGGAAASHAACAAADSGGAAGGC-3'

>CCA_R1: 5'-CTCTTAGCWTTCATCAAACCTCT-3'

>CCAD_R1: 5'-ATGRAAYTCRCACACTTTGTGKC-3'

>CCA2_S1: 5'-ATGGAAASHAACAAADSGGAAG-3'

>CCA2_R1: 5'-CTYCKYTTRGCWTTCATCAAACCTC-3'

>Rin1S: 5'-TGGRCTSCTMAAGAAAGCTTATG-3'

>Rin2S: 5'-AGAGGKARAGTWGARYTGAAGAG-3'

>Rin1R: 5'-CYTCHCCWAGMARRTGCCCTTG-3'

>Rin2R: 5'-TKYTGAAGTTCAGMAAGTTGATCA-3'

>Tag1f: 5'-AATCGACAAGTTACGTTCTGC-3'

>Tag1r: 5'-AGCTCVATCTCCCTYTTTTGC-3'

>Tdr4f: 5'-GTGATGCWGAGGTTGSTTTGA-3'

>Tdr4r: 5'-AGCWGGTTRTTTTGCTCCTGC-3'

>GSP2_AGL: 5'-GCTCTCATCGTCTTCTCAAGTCGTGGTC-3'

>GSP1_AGL: 5'-GCTTAAAGCACTCAGCGAATCCCCATC-3'

>GSP2_AP: 5'-GGGAATTCGATTGTGGTGCTGAGGTTG-3'

>GSP1_AP: 5'-AGAGCTTCCCTTTGGTGGAGAAGACG-3'

>M13F: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'

>M13R: 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'

>18SR: 5'-GCTGGATTACCGCGGCT-3'

>18SF: 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'

>PAGLf: 5'-AGCAAGAATCAGCAAAGCTGC-3'

>PAGLr: 5'-CGTTCAAGCCTATTCTCCAGTT-3'

>PAPf: 5'-CAAACGGAAACTGGAATCTGC-3'

>PAPr: 5'-GCATGAGTTGGTTCTTCCTTG-3'

Código de ambigüidades IUPAC-IUB/GCG:

M=A/C	R=A/G	W=A/T
S=C/G	Y=C/T	K=G/T
V=A/C/G	H=A/C/T	D=A/G/T
B=C/G/T	N=G/A/T/C	

Extração de RNA total e de DNA genômico

Para a extração do RNA total da polpa dos frutos das amostras caracterizadas no Brasil, utilizou-se o método descrito por Lopez-Gómez e Gómez-Lim (1992), como descrito no **Capítulo 3** página 67.

Para a extração do RNA total da polpa dos frutos, foram utilizadas duas diferentes metodologias: a primeira, a partir de 100 mg de polpa, utilizando o kit “RNeasy® Plant Mini Kit” (Qiagen®), e a segunda, também a partir de 100 mg de polpa, utilizando o método desenvolvido por Chang *et al.* (1993), sendo que os extratos resultantes desta extração foram tratadas com o kit “Turbo DNA-free™” (Ambion®) para eliminação do DNA remanescente.

Para a extração do DNA genômico da polpa dos frutos, utilizou-se o método desenvolvido por Chang *et al.* (1993), a partir de 200 mg de polpa. Para a extração do DNA genômico de folhas jovens de mamoeiro, utilizou-se o método desenvolvido por Doyle e Doyle (1990), a partir de 100 mg de folhas.

Quantificação e análise da qualidade de ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos foram quantificados por espectrofotometria utilizando o aparelho NanoDrop® ND-1000 (Nanodrop Technologies®), tendo como referência o fato de que a absorbância de uma amostra de 40 µg/mL de RNA ou 50 µg/mL de

DNA a 260 nm deve ser igual a 1 (SAMBROOK *et al.*, 2000). Para a análise por PCR quantitativo (*qPCR*), as amostras de RNA foram quantificadas fluoretricamente utilizando o kit “Quanti-iT™ RNA Assay Kit” (Invitrogen™).

A análise da qualidade dos ácidos nucléicos foi feita com base na razão da leitura das absorbâncias a 260nm e 280nm (260 nm/280 nm), considerando que os valores de amostras puras devem ser 1,8 para DNA e 2,0 para RNA (SAMBROOK *et al.*, 2000). A análise da integridade dos ácidos nucléicos foi feita por eletroforese em gel de agarose 1% ou 1,5%, contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo em tampão Tris-acetato 0,02 M pH 8 e EDTA 0,0005 M ou tampão Tris-acetato 0,04 M pH 8 e EDTA 0,001 M (SAMBROOK *et al.*, 2000), realizada a voltagem constante (80V ou 100V) durante 25 ou 30 minutos.

Síntese do DNA complementar (cDNA) fita-simples

A partir de 200 ng de RNA total e utilizando o *primer* oligo (dT₁₅), foi sintetizado o cDNA fita-simples através da técnica de transcrição reversa utilizando o kit “Reverse Transcriptase Core Kit” (Eurogentec, EGT Group), segundo as instruções do fabricante.

Análise de genes ortólogos aos fatores de transcrição LeSPL-CNR, LeMADS-RIN, TAGL1 e TDR4 de tomate

A fim de isolar genes similares aos fatores de transcrição *LeSPL-CNR*, *LeMADS-RIN*, *TAGL1* e *TDR4* de tomate (possíveis genes ortólogos), utilizaram-se amostras de cDNA dos frutos verdes e maduros, assim como DNA genômico, para materiais de partida em uma série de reações de PCR, utilizando os kits “GoTaq®

Flexi DNA Polymerase” (Promega®) e “Blue MegaMix®” (Microzone Limited) em um volume final de reação de 20 μ L. Diferentes combinações e concentrações de *primers*, concentrações de cDNA e DNA genômico, concentração de $MgCl_2$ e temperaturas de pareamento (ΔG) foram testados para as tentativas de amplificação dos possíveis genes ortólogos do tomate no mamão papaia. A programação padrão utilizada no termociclador foi de 95 °C / 5 min para incubação inicial, 35 ciclos a 95 °C / 30 s para desnaturação, ΔG / 30 s para pareamento dos *primers* e 72 °C / 1 min ou 1 min e 20 s para extensão, seguindo-se de uma incubação a 72 °C / 7 min para extensão final após os ciclos. As temperaturas de pareamento (ΔG) variaram entre 40 °C e 60 °C. A análise das reações de PCR foi feita por eletroforese em gel de agarose 1% ou 1,5%, contendo 0,5 μ g/ml de brometo de etídeo em tampão Tris-acetato 0,02 M pH 8 e EDTA 0,0005 M ou tampão Tris-acetato 0,04 M pH 8 e EDTA 0,001 M (SAMBROOK *et al.*, 2000), realizada a voltagem constante (80V ou 100V) durante tempos de 20 a 60 minutos.

Purificação e clonagem dos fragmentos

As bandas dos fragmentos amplificados por PCR foram recortadas com bisturi estéril e purificadas do gel de agarose utilizando o kit “Qiaquick® Gel Extraction” (Qiagen), sendo retomadas em 50 μ L de água estéril.

Os fragmentos purificados foram clonados utilizando o kit “pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems” (Promega®) segundo as instruções do fabricante. Para fazer a transformação de células competentes de *Escherichia coli* DH5 α TM-T1^R (One Shot® MAX Efficiency® DH5 α TM-T1^R Competente Cells, InvitrogenTM), 5 μ L das reações de ligação foram adicionadas a 100 μ L de bactérias competentes,

incubadas por 40 minutos em banho de gelo e tratadas a 42 °C durante 1 minuto, sendo imediatamente transferidas para o gelo por 2 minutos. Após adição de 100 µL de meio líquido Luria Bertani (LB) (SAMBROOK *et al.*, 2000) e incubação por 60 minutos a 37 °C, 30 µL de bactérias transformadas foram plaqueadas em meio sólido LB-ágar contendo ampicilina (100 µg / mL), IPTG 0,1M e X-Gal (1 mg / mL) em sua superfície e incubadas a 37°C durante 12 horas. Após a incubação das placas, cerca de cinco colônias foram escolhidas para confirmação da presença dos insertos nos vetores, realizada através de uma reação de PCR utilizando os *primers* M13F e M13R (95 °C / 5 min, 35 ciclos a 95 °C / 30 s, 58 °C / 30 s e 72 °C / 1 min). Após análise em gel de agarose, as colônias com os respectivos fragmentos clonados foram transferidas para meio LB líquido contendo ampicilina na mesma concentração anterior e incubados a 37 °C durante 12 horas para posterior extração do DNA plasmidial. Para a purificação dos plasmídeos foi utilizado o kit “Qiaprep® Miniprep” (Qiagen), sendo estes quantificados por espectrofotometria e analisados por eletroforese em gel de agarose.

Seqüenciamento e análise das seqüências

Alíquotas de 100 fmol a 250 fmol dos plasmídeos purificados foram utilizadas para seqüenciamento com os *primers* M13F ou M13R de acordo com o kit “CEQ™ DTCS Quick Start Kit” (Beckman Coulter®) (SANGER *et al.*, 1977) e utilizando uma programação de 35 ciclos a 95 °C / 30 s, 55 °C / 30 s e 72 °C / 80 s. As reações foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida no seqüenciador capilar “CEQ™ 8000 Genetic Analysis System” (Beckman Coulter®).

Os eletroferogramas gerados pela separação das reações de seqüenciamento nos capilares com géis de poliacrilamida foram analisados pelo

software “CEQ™ 8000 Genetic Analysis System” (Beckman Coulter®) para determinação das seqüências de bases das amostras de DNA. As seqüências de DNA obtidas foram submetidas à comparação com os dados do banco de seqüências de DNA, GenBank, por meio do *software* BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL *et al.*, 1990), disponível no endereço eletrônico www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. O alinhamento das seqüências foi feito utilizando a ferramenta “ClustalW” (THOMPSON; HIGGS; GIBSON, 1994) disponível na internet (<http://align.genome.jp/>).

Isolamento da seqüência parcial de cDNA por RACE

Após a comparação das seqüências obtidas com o banco de dados, aquelas que apresentaram similaridade com os genes dos fatores de transcrição *TAGL1* e *TDR4* de tomate foram submetidas às tentativas de isolamento das seqüências completas do cDNA por RACE (*Rapid Amplification cDNA End*), utilizando o kit “SMART™ RACE cDNA Amplification Kit” (Clontech Laboratories, Inc.), segundo as instruções do fabricante.

As reações para o isolamento das seqüências completas dos cDNAs foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose, e para aquelas que resultaram positivas, as bandas foram purificadas, clonadas e seqüenciadas em triplicata.

Análise da expressão gênica por PCR quantitativo (qPCR)

Os genes de mamão papaia similares aos fatores de transcrição *TAGL1* e *TDR4* de tomate tiveram a expressão analisada por PCR quantitativo (*qPCR*), utilizando o método de detecção de fluorescência em tempo real produzida a partir

da reação de PCR combinada à transcrição reversa (*Real Time* RT-PCR) (ERIKSSON *et al.*, 2004).

Através das seqüências obtidas pela amplificação com os *primers* degenerados, novos *primers* foram planejados utilizando a ferramenta *primer 3 input*, disponível no endereço eletrônico <http://frodo.wi.mit.edu/> (ROZEN; SKALETISKY, 2000). O critério de seleção dos *primers* foi baseado nos seguintes parâmetros: I) temperaturas de dissociação (T_m) de aproximadamente 60 °C; II) diferença entre as T_m dos *primers* de no máximo 1 °C; III) os *primers* deveriam amplificar uma seqüência (*amplicon*) entre 75 e 200 pb; IV) ausência de formação de *primers-dimers* ou *hairpins*. Outra etapa do planejamento dos *primers* consistiu na avaliação das seqüências dos *amplicons* pelo programa *mfold* disponível no endereço eletrônico <http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/dna-form1.cgi> (ZUCKER, 2003) para que o pareamento *amplicon-primer* não fosse afetado por interações inter-moleculares do próprio *amplicon* (*hairpins*) nas extremidades 5' e 3'.

As amostras de RNA utilizadas no experimento de *qPCR* foram as extraídas dos frutos verdes e maduros supracitadas. Para as reações *qPCR*, foram utilizadas alíquotas de 1 µL de cDNA equivalente à transcrição reversa de 20 ng de RNA total extraído. O kit utilizado para a análise foi o “*qPCR MasterMix Plus for SYBR® Green No ROX*” (Eurogentec, EGT Group), adicionando o corante de referência ROX apenas no momento de efetuar a reação e segundo as instruções do fabricante. As reações de PCR, em quadruplicata, foram conduzidas no termociclador MX3005P® (Stratagene®) e os resultados obtidos foram analisados utilizando o respectivo *software*. Para cada conjunto de reações foi efetuado um controle negativo, o qual continha todos os reagentes exceto o cDNA (*No Template Control*, NTC). A programação padrão utilizada no termociclador foi de 50 °C / 2 min para ativação da

enzima UDG, 95 °C / 10 min para inativação da enzima UDG e ativação da enzima *Taq* polimerase, 50 ciclos a 95 °C / 15 s para desnaturação, 60 °C / 20 s para pareamento dos *primers* e 72 °C / 40 s para extensão, seguido pela determinação da temperatura da curva de dissociação (*melting curve*, T_m) dos *amplicons*. A temperatura de curva de dissociação do *amplicon* gerado, que deveria ser a mesma para todas as reações, mostrou a pureza do produto formado.

Para cada gene analisado foi traçada uma curva de eficiência da reação de PCR, cujo valor corresponde à proporção de moléculas do gene-alvo que estão sendo duplicadas em cada ciclo, e o valor quadrado R da reta (R^2), que representa a qualidade da reta, sendo o valor máximo igual a um. Uma nova amostragem, constituída pela mistura de todas as amostras de cDNA sintetizados, foi utilizada para a avaliação das diluições de cDNA quanto à amplificação do gene-alvo, cujo valor da inclinação da reta foi utilizado para calcular a eficiência da reação de PCR. A comparação da expressão gênica foi feita de forma relativa entre os valores de concentração inicial dos genes nos frutos verdes, considerado grupo de referência, e nos frutos maduros. Após a normalização com o gene controle (ribossomal 18S), o resultado foi expresso em porcentagem de expressão do grupo de frutos maduros em relação ou grupo de frutos verdes.

6.4. RESULTADOS

Gene SQUAMOSA PROMOTER BINDING de mamão papaya (CpSPL)

Apenas as amostras de DNA genômico extraído de folhas jovens de mamoeiro resultaram na amplificação de um fragmento com aproximadamente 500 pb. A otimização da técnica se deu pela utilização de 10 ng de DNA genômico como

material de partida e 1 μ M dos *primers* CCAD_S1 e CCA_R1 em tampão 1X “GoTaq® Flexi DNA Polymerase” (Promega®) contendo $MgCl_2$ 3 mM, dNTP 0,2 mM e 5 unidades de *Taq* polimerase. A programação do termociclador utilizada na reação de PCR foi a mesma descrita nos MATERIAIS E MÉTODOS, porém com temperatura fixa de pareamento dos *primers* de 49,9 °C.

Após purificação, clonagem, seqüenciamento e análise da seqüência, um fragmento de 531 pb foi obtido. A análise da seqüência mostrou um íntron de 200 pb, e a análise da região codificadora parcial (com 331 pb) utilizando a ferramenta tBLASTX indicou similaridade da seqüência, denominada *CpSPL* (*Carica papaya* *SBP-Like Gene*), com o gene de um fator de transcrição *SBP* de algodão (*Gossypium hirsutum*), com *score* 116 e *e-value* 3e-26. A seqüência apresentou também similaridade com o gene SPL5 (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE 5) de *Arabidopsis thaliana*, com *score* 92.7 e *e-value* 2e-19.

Ensaio para o isolamento de um gene ortólogo ao gene LeMADS-RIN de tomate

As tentativas de amplificação de genes ortólogos ao gene *LeMADS-RIN* de tomate não resultaram em amplificações específicas tanto a partir de cDNA quanto DNA genômico (*primers* Rin). Os tamanhos esperados dos fragmentos a serem amplificados por todas as combinações possíveis dos *primers* Rin1S, Rin1R, Rin2S e Rin2R foram de 400 a 500 pb, sendo que apenas algumas bandas menores foram amplificadas utilizando o DNA genômico como material de partida. Essas bandas apresentaram tamanhos moleculares menores que o esperado e quando seqüenciadas não apresentaram similaridade alguma com o gene *LeMADS-RIN* de tomate.

Gene AGAMOUS-LIKE 1 de mamão papaia (PAGL1)

Uma amplificação de um fragmento de aproximadamente 400 pb foi obtida utilizando como material de partida cDNA de frutos verdes e maduros equivalente à transcrição reversa de 4 ng de RNA total, 0,5 μ M dos *primers* Tagl1f e Tagl1r em tampão 1X “GoTaq® Flexi DNA Polymerase” (Promega®) contendo MgCl₂ 3 mM, dNTP 0,2 mM e 5 unidades de *Taq* polimerase. A programação do termociclador utilizada na reação de PCR foi a mesma descrita nos MATERIAIS E MÉTODOS, porém com temperatura fixa de pareamento dos *primers* de 51,6 °C.

A análise preliminar utilizando o programa tBLASTX mostrou que a sequência isolada, denominada *PAGL1* (*Papaya* AGAMOUS-LIKE GENE 1), apresentou similaridade com o gene *CAG1* (AGAMOUS LIKE GENE) de pepino (*Cucumis sativus*), com valores de *score* e *e-value* de 321 e 3e-85, respectivamente, e apresentou também similaridade com o gene MADS1 (MADS-BOX GENE 1) de pêssgo (*Prunus dulcis*), com valores de *score* e *e-value* de 316 e 9e-84, respectivamente.

Com base na sequência parcial do gene *PAGL1* isolada, os *primers* GSP1_AGL e GSP2_AGL foram desenvolvidos para serem utilizados nas tentativas de isolamento da sequência completa de cDNA por RACE. Através da análise das sequências obtidas, conseguiu-se isolar grande parte da sequência codificadora do gene *PAGL1*, além da sequência não-traduzida na porção 3' (3'-*Untranslated Region*, 3-UTR), conhecida como região de extensão carboxi-terminal (região C) (THEISSEN *et al.*, 2000). A **Figura 13** mostra a organização da sequência parcial do cDNA (741 pb) do gene *PAGL1*, combinando as informações do fragmento inicial com as dos fragmentos obtidos por 5'-RACE e 3'-RACE. A região codificadora, aparentemente incompleta, apresentou 615 pb, e a sequência 3'-UTR apresentou

126 pb, com o provável sinal de poliadenilação sublinhado na posição 677 pb e o provável *stop* códon indicado ao final da seqüência por um asterisco.

```

1  AATCGACAAGTTACGTTCTGCAAGAGAAGAAATGGATTGCTGAAGAAAGCTTATGAGCTG
   N R Q V T F C K R R N G L L K K A Y E L

61 TCTGTTCTGTGCGACGCTGAAGTTGCTCTCATCGTCTTCTCAAGTCGTGGTCGGCTCTAC
   S V L C D A E V A L I V F S S R G R L Y

121 GAGTACTCGAATAACAACATAAGATCAACAATAGACCGGTATAAAAAGGCATGTTCTGAT
   E Y S N N N I R S T I D R Y K K A C S D

181 AGCTCAGCTACAACCTTCTGTTACAGAAATTAATGCTCAGTACTATCAGCAAGAATCAGCA
   S S A T T S V T E I N A Q Y Y Q Q E S A

241 AAGCTGCGGCAACAAATTCAAATGCTACAGAACTCTAATAGGCATTTGATGGGGGATTTCG
   K L R Q Q I Q M L Q N S N R H L M G D S

301 CTGAGTGCTTTTAAGCGTGAAGGAGCTAAAACAACCTGGAGAATAGGCTTGAACGCGGCATT
   L S A L S V K E L K Q L E N R L E R G I

361 ACCCGGATCAGGTCTAAGAAGCATGAAATGTTGCTAGCTGAAATCGAATACTTACAGAAA
   T R I R S K K H E M L L A E I E Y L Q K

421 AGGGAGATTGAGCTGGAAAATGAAAGCGTGTGTCTTCGGACTAAGATAGCAGAAGTGGAG
   R E I E L E N E S V C L R T K I A E V E

481 AGATCACTCCAAGTAAACATGGTTACAGGGCCAGAGCTGAATGCAATCCAGGCATTAGCT
   R S L Q V N M V T G P E L N A I Q A L A

541 TCTCGCAACTTCTTTATTGAGAACGAAACTACCTACTCACACGGCCCTGACAAGAAGATT
   S R N F F I E N E T T Y S H G P D K K I

601 CTCCATCTTGGGTAActcggttgagacggacgagctctgccgattgcccctcaagatatat
   L H L G *

661 atatatatatatatagactaaatatccatttgatttgatttcgagaacatgtatgatgtt
701 gatgttttacgtttatcagctgccatcataattattactg(a)18

```

Figura 13. Seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos do gene *PAGL1*. A seqüência codificadora e os aminoácidos estão destacados em letras maiúsculas. Os aminoácidos deduzidos estão apresentados pelo código de uma letra e estão abaixo do primeiro nucleotídeo de cada códon. O *stop* códon está representado por um asterisco. O provável sinal de poliadenilação está sublinhado na parte 3'-UTR.

Para a análise da expressão do gene *PAGL1* por PCR quantitativo (*qPCR*), foi considerado primeiramente a análise do gene normalizador (18S ribossomal). Foram analisadas as curvas de amplificação e dissociação do *amplicon* gerado (**Figuras**

14A e **14B**). Apenas um produto foi amplificado com temperatura de dissociação de 81,6 °C, e tomando-se os valores obtidos de eficiência de reação e de coeficiente de reta RqS (109,7% e 0,998, respectivamente, **Figura 14C**), pode-se afirmar que as reações de PCR para o gene normalizador se deram em condições adequadas, resultando em boa eficiência de amplificação do produto.

A análise da expressão do gene *PAGL1* em mamão papaia foi feita utilizando os *primers* PAGLf e PAGLr e, através da comparação das curvas de amplificação e dissociação do *amplicon* gerado (**Figuras 14D** e **14E**), pode-se concluir que as reações foram efetivas na amplificação de apenas um produto, com temperatura de dissociação de 78,9 °C. Os valores obtidos da eficiência das reações de PCR e do coeficiente de reta RqS gerado pelas amplificações foram 153,0% e 0,992, respectivamente (**Figura 14F**). Utilizando o *software* MX3005P® (Stratagene®), foi aplicada a ferramenta “*Comparative Quantitation Relative Quantity Plate*”, que calcula a quantidade inicial de DNA presente nas amostras antes de serem iniciados os ciclos de PCR, cálculos feitos através das curvas de eficiência das reações, normalizando os cálculos com os valores obtidos da amplificação do 18S. Adotando como base o valor 1 para a expressão do gene no grupo de frutos verdes, considerado o grupo referência, a comparação da expressão gênica foi feita de forma relativa entre os valores de concentração inicial de transcritos do gene nos frutos verdes e nos frutos maduros. O resultado obtido foi que o gene *PAGL1* teve 44% de expressão no grupo de frutos maduros quando comparados com os verdes, indicando uma diminuição da expressão desse gene durante o amadurecimento.

Figura 14. Análise por *Real Time* RT-PCR dos genes 18S e *PAGL1*. Os gráficos mostram as curvas de amplificação dos genes (A e D), as curvas de temperatura de fusão dos *amplicons* (B e E) e as retas relacionadas à eficiência das reações de PCR (C e F). Os gráficos A, B e C são referentes ao gene ribossomal 18S. Os gráficos D, E e F são referentes ao gene *PAGL1*. As reações de controle negativo (NTC) estão apresentadas nas curvas de amplificação dos genes e nas curvas de temperatura de fusão dos *amplicons*. As equações logarítmicas, os valores da eficiência das reações e os valores de RqS estão apresentados nos gráficos C e F.

Gene APETALA 1 de mamão papaia (PAP1)

Uma amplificação de um fragmento de aproximadamente 400 pb foi obtida utilizando como material de partida cDNA de frutos verdes e maduros equivalente à transcrição reversa de 20, 2 ou 0,4 ng de RNA total, 0,5 μ M dos *primers* Tdr4f e Tdr4r em tampão 1X “GoTaq® Flexi DNA Polymerase” (Promega®) contendo MgCl₂ 3 mM, dNTP 0,2 mM e 5 unidades de *Taq* polimerase. A programação do termociclador utilizada na reação de PCR foi a mesma descrita nos MATERIAIS E MÉTODOS, porém com temperatura fixa de pareamento dos *primers* de 53,7 °C.

A análise preliminar utilizando o programa tBLASTX mostrou que a sequência isolada, nomeada de PAP1 (*Papaya* APETALA GENE 1), apresentou similaridade com o gene *AP1* (APETALA GENE 1) de uva (*Vitis vinifera*), com valores de *score* e *e-value* de 159 e 2e-57, respectivamente, e apresentou também similaridade com o gene *FUL* (FRUITFULL GENE) de tabaco (*Nicotiana tabacum*) com valores de *score* e *e-value* de 243 e 6e-62, respectivamente.

Com base na sequência parcial do gene *PAP1* isolada acima descrita, os *primers* GSP1_AP e GSP2_AP foram desenvolvidos para serem utilizados nas reações de RACE para a tentativa de isolamento da sequência completa de cDNA do gene. Através da análise das sequências obtidas, conseguiu-se isolar grande parte da sequência codificadora do gene *PAP1*, além da sequência não-traduzida na porção 5' (5'-*Untranslated Region*, 5'-UTR). A **Figura 15** mostra a organização da sequência de nucleotídeos do cDNA (637 pb) isolada do gene *PAGL1*, cuja sequência parcial codificadora (566 pb) e a sequência de aminoácidos deduzidos estão apresentadas em letras maiúsculas, e a sequência não codificadora 5'-UTR apresentada em letras minúsculas (171 pb). A sequência codificadora aparentemente não está completa, visto que apesar do o aminoácido inicial ser uma

metionina (códon ATG), ela não apresenta um códon de terminação.

```

1  acgcggggggccccctttccccggattaatcttgggtcacacacccgaaaattcaaaaggggt
61  ttttccatttcgccgtatgtatatatatatacatatacaatattttccatacaaaagat
121  acccagagaaattaactcgttttcttcttcatctagattttccatttttaagtttctttctt
181  cgtatactgacttttttggtcaagtggatttaatcggatcgtgaaggtgaagATGGGGAGA
                                     M G R

241  GGCAGAGTTCAGTTGAAGAGGATAGAGAACAAGATCAACAGACAGGTGACTTTTTCTAAG
      G R V Q L K R I E N K I N R Q V T F S K

301  AGAAGGTCTGGTTTGCTCAAGAAAGCACATGAGATCTCTGTTCTCTGTGATGCTGAGGTT
      R R S G L L K K A H E I S V L C D A E V

361  GCTTTGATCGTCTTCTCCACCAAAGGGAAGCTCTTTGAATATTCTACAGATTCTGTCATG
      A L I V F S T K G K L F E Y S T D S C M

421  GAGAGAATACTTGAACGGTACGAGAGATACTCATACACAGATCAGAGGCAGACTGTCACA
      E R I L E R Y E R Y S Y T D Q R Q T V T

481  AATGAAATTGGACCAAACGGAAACTGGAATCTGCAGTATGCAAAGCTGAAGGCTAGAATT
      N E I G P N G N W N L Q Y A K L K A R I

541  GAAGTGTTCAGAGAAATGAAAGGCATTTTCTGGGAGAGGATCTTGATTCTTTGAGTCTG
      E V L Q R N E R H F L G E D L D S L S L

501  AAAGAGCTTCAAAGTTTGAGCATCAGCTTGATTCTGCACTTAAACATGTCAGGTCAAGG
      K E L Q S L E H Q L D S A L K H V R S R

561  AAGAACCAACTCATGCTTGAGTCCATTTTCAGAGCTTCAGAAAAGGGACAAAGCATTGCAA
      K N Q L M L E S I S E L Q K R D K A L Q

621  GAGCAAAACAACCAGCT
      E Q N N Q

```

Figura 15. Seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos do gene *PAP1*. A seqüência codificadora e os aminoácidos estão destacados em letras maiúsculas. Os aminoácidos deduzidos estão apresentados pelo código de uma letra e estão abaixo do primeiro nucleotídeo de cada códon.

Analisando-se os gráficos de amplificação do gene *PAP1* (**Figura 16D**) e da curva de dissociação T_m do *amplicon* gerado (**Figura 16E**), pode-se afirmar que as reações de PCR foram eficientes na amplificação de apenas um produto, com temperatura de dissociação de 78,7 °C. Os valores obtidos da eficiência das reações de PCR e do coeficiente de reta RqS gerados pelas amplificações foram 93,8% e

0,988, respectivamente (**Figura 16F**). Utilizando o mesmo *software* e a mesma ferramenta descrita anteriormente para o gene *PAGL1*, o resultado obtido foi que o gene *PAP1* teve 28,8% de expressão no grupo de frutos maduros quando comparados com os verdes, sugerindo que o gene *PAP1* teve sua expressão reduzida no grupo de frutos maduros.

6.5. DISCUSSÃO

CpSPL

Fatores de transcrição do tipo *SPL* (*SBP-Like*) apresentam o domínio protéico conservado SBP-BOX (SQUAMOSA BINDING PROTEIN-BOX), o qual é responsável pela interação proteína-DNA típica dos fatores de transcrição desse tipo (KLEIN *et al.*, 1996, CARDON *et al.*, 1999). Em *Arabidopsis thaliana*, os fatores de transcrição do tipo *SPL* estão agrupados em uma única família de 16 membros, sendo que o gene *SPL3*, quando expresso de forma constitutiva em linhagens de plantas transgênicas, é responsável pelo fenótipo antecipado de maturação das flores (CARDON *et al.*, 1997). Manning *et al.* (2006) isolaram um gene de tomate, o qual possui o domínio protéico SBP-BOX (*LeSPL-CNR*), que é expresso de forma não-constitutiva durante o amadurecimento do fruto. Esse gene apresenta alta similaridade com três membros da família de fatores de transcrição *SPL* de *Arabidopsis thaliana*: *SPL3* (número de acesso BT005443), *SPL4* (números de acesso BT004391 e NM_104194) e *SPL5* (números de acesso BT003714 e NM_112390).

Figura 16. Análise por *Real Time* RT-PCR dos genes 18S e *PAP1*. Os gráficos mostram as curvas de amplificação dos genes (A e D), as curvas de temperatura de fusão dos *amplicons* (B e E) e as retas relacionadas à eficiência das reações de PCR (C e F). Os gráficos A, B e C são referentes ao gene ribossomal 18S. Os gráficos D, E e F são referentes ao gene *PAP1*. As reações de controle negativo (NTC) estão apresentadas nas curvas de amplificação dos genes e nas curvas de temperatura de fusão dos *amplicons*. As equações logarítmicas, os valores da eficiência das reações e os valores de RqS estão apresentados nos gráficos C e F.

De acordo com a **Figura 17**, o alinhamento da sequência codificadora do gene *CpSPL* com as sequências de alguns genes *SPL* de *Arabidopsis thaliana* e com o gene *LeSPL-CNR* de tomate mostra um domínio SBP-BOX comum entre as sequências, além de alguns aminoácidos similares ou semelhantes exteriores ao domínio. A alta similaridade mostrada na **Figura 17** pode ser tomada como um indício de que a sequência isolada de mamão papaia (*CpSPL*) corresponde a um gene ortólogo do *LeSPL-CNR* do tomate. Baseado na sequência genômica, os *primers* SPLf, SPLr, SPL1F, SPL1R, SPL2F e SPL2R foram desenvolvidos e testados para amplificação de cDNA, porém as reações utilizando material dos frutos verdes e maduros como material de partida não resultaram em amplificação alguma.

Figura 17. Alinhamento das sequências parciais de aminoácidos deduzidas das sequências dos genes *LeSPL-CNR* de tomate (*cnr_protein*), *CpSPL* de mamão papaia (*C. papaya*) e dos genes de *Arabidopsis thaliana* das famílias SPL5 (BT003714 e NM 112390), SPL4 (BT004391 e NM 104194) e SPL3 (BT005443). Os aminoácidos idênticos estão destacados em fundo preto e letra branca, os aminoácidos similares estão destacados em fundo cinza e letra branca e os aminoácidos similares estão destacados em fundo branco e letra preta. A região do domínio conservado SBP-BOX está sublinhada.

Apesar da alta similaridade do clone genômico *CpSPL* com a família *SPL* não foi possível o isolamento do cDNA desse gene nos dois estágios dos frutos analisados, apesar de todas as tentativas utilizando PCR com diferentes *primers* e diferentes concentrações de *primers*, $MgCl_2$ e cDNA, assim como a utilização de diferentes temperaturas de pareamento de *primers*. Dessa maneira, pode-se especular que a expressão do gene *CpSPL* não se dá de forma similar à expressão durante o amadurecimento do tomate, ou ainda que a expressão não é significativa nos frutos de mamão papaia dos dois estágios de maturação analisados (verdes e maduros). Como alternativa, poderiam ser analisados novos pontos durante o amadurecimento do mamão papaia, ou utilizar outras técnicas para o isolamento de seqüências ortólogas ao *LeSPL-CNR* durante o amadurecimento do mamão papaia, como a hibridização de uma sonda radioativa em uma biblioteca de cDNA sintetizados de mRNA extraídos de diferentes estágios de amadurecimento do fruto.

Finalmente, não se pode excluir a possibilidade de que a seqüência isolada do DNA genômico não constitua um gene ou seqüência expressa, apesar da grande similaridade com aquelas de outros organismos e da provável presença de uma região codificadora. Para isso, é necessário prosseguir nas tentativas de clonagem a partir do cDNA, como mencionado acima.

Le-MADS-RIN

Em um único relato de isolamento de um gene ortólogo ao *LeMADS-RIN*, Vrebalov *et al.* (2002) isolaram de morango (gene *FvMADS-9*) um ortólogo do gene de tomate utilizando biblioteca de cDNA hibridizada com uma sonda codificando parte da seqüência do gene do tomate. Essa seqüência de morango pareceu ter a sua expressão aumentada nos frutos e a análise filogenética mostrou uma relação

evolutiva semelhante ao gene *LeMADS-RIN* (VREBALOV *et al.*, 2002).

Utilizando cDNA e DNA genômico de mamão papaia não foi possível isolar um fragmento similar ao gene *LeMADS-RIN* de tomate. Uma série de alternativas foram testadas, tais como diferentes *primers* e diferentes concentrações de *primers*, de MgCl₂, de DNA genômico e cDNA, assim como a utilização de diferentes temperaturas de pareamento de *primers*. Desse modo, pode-se especular que não haja um gene ortólogo de mamão papaia com grau de similaridade alto, ou com longos trechos contínuos de alta similaridade, para permitir a amplificação com os *primers* utilizados. Talvez uma abordagem semelhante à empregada por Vrebalov *et al.* (2002), utilizando a hibridização de uma sonda radioativa em uma biblioteca de cDNA, obtida de RNAs extraídos de diferentes estágios de amadurecimento do morando, poderia ser uma alternativa interessante para a descoberta de um possível gene ortólogo ao *LeMADS-RIN*.

PAGL1

Fatores de transcrição do tipo MADS-BOX fazem parte de uma família extensa e bem caracterizada em muitos vegetais (THEISSEN *et al.*, 2001). Esses genes, quando presente nas plantas, possuem os domínios conservados MADS-BOX (região M) e K-BOX (região K), além de uma região pouco conservada presente entre essas duas regiões, chamada de *intervention region* (região I) (THEISSEN *et al.*, 2001). Os estudos utilizando tomate como fruto modelo mostraram que certos genes do tipo MADS-BOX são diferencialmente expressos durante o desenvolvimento do fruto (VICTORIA *et al.*, 2003), porém pouco se sabe acerca da expressão de genes do tipo MADS-BOX durante o amadurecimento do tomate. Em contrapartida, resultados prévios obtidos com o gene *TAGL1* de tomate

mostram que a sua expressão aumenta durante o amadurecimento do fruto (EDUARDO; SEYMOUR, 2006; resultados ainda não publicados).

A análise da **Figura 18**, a qual apresenta o alinhamento dos aminoácidos deduzidos da seqüência codificadora parcial do gene *PAGL1* com as seqüências codificadoras de outros fatores de transcrição do tipo MADS-BOX, indica os domínios protéicos conservados MADS-BOX e K-BOX, assim como a região não-conservada *Intervention region*. Como pode ser observado, o gene isolado *PAGL1* apresentou similaridade com o fator de transcrição *TAGL11* de tomate, com “score” de 295 *bits* e “e-value” de $5e^{-77}$ quando analisados pela ferramenta de bioinformática disponível na internet, o “Blast-two-sequence” (TATUSOVA *et al.*, 1999, www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi). Esse resultado sugere que a seqüência isolada de mamão papaia não seja ortóloga ao gene *TAGL1* de tomate como era de se esperar, e sim ortólogo ao gene *TAGL11* de tomate (89 % de identidade), fator de transcrição com expressão diminuída durante o desenvolvimento do tomate, porém o seu envolvimento com o amadurecimento do fruto ainda não está estabelecido (VICTORIA *et al.*, 2003). Ao menos no caso do mamão papaia, o gene ortólogo parece sofrer uma diminuição durante o amadurecimento. Com base nesses resultados é bastante provável que o gene isolado em mamão papaia, que codifica um fator de transcrição do tipo MADS-BOX, desempenhe função similar, ainda que desconhecida, àquela desempenhada pelo gene *TAGL11* de tomate.

O gene *PAGL1*, isolado em distintos estágios de amadurecimento do mamão papaia, pode representar um novo grupo de fatores de transcrição do tipo MADS-BOX que possam estar relacionados com o amadurecimento de frutos carnosos. Essa perspectiva é importante para o prosseguimento de estudos de genes que

apresentam sua expressão alterada abaixo da cascata regulatória do hormônio etileno durante o amadurecimento de frutos.

<i>A.thaliana</i> AGL11	1	-----REQILR	MGRGKIEIKRIENS	TNRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVAL
<i>C.papaya</i> PAGL1	1	-----	NRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVAL	
<i>C.sativus</i> CAG1	1	-----	MGRGKIEIKRIENTTNRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVAL	
<i>P.dulci</i> MADS1	1	-----	MGRGKIEIKRIENTTNRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVAL	
<i>V.vinifera</i> MADS5	1	-----	MGRGKIEIKRIENTTNRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVAL	
<i>L.esculentum</i> TAGL11	1	AYLIHSTHSDRSIRS	MGRGKIEIKRIENN	TNRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVAL
<hr/>				
<i>A.thaliana</i> AGL11	52	IVFSTRGRLYEYANNIR	STIERYKKACSDS	INTSTVCEINAAYYQQESAKLRQQIQITIQ
<i>C.papaya</i> PAGL1	31	IVFSSRGRLYEYSNNIR	STIRYKKACSDSSATTS	VTEINAQYYQQESAKLRQQIQIMLQ
<i>C.sativus</i> CAG1	46	IVFSSRGRLYEYSNN	IKTTIERYKKACSDSSATTS	SVTEINTQYYQQESAKLRQQIQIMLQ
<i>P.dulci</i> MADS1	46	IVFSSRGRLYEYSNNIR	NTIEGYKKACSDSSGSTS	ITEINAQYYQQESAKLRQQIQIMLQ
<i>V.vinifera</i> MADS5	46	IVFSSRGRVYEYSNNIK	STIRYKKAS	SDSINGGFTMEINAQYYQQESAKLRQQIQIMLQ
<i>L.esculentum</i> TAGL11	61	IVFSTRGRLYEYSNNV	KATIERYKKATAETSSAY	TQELNAQFYQQESKLRQQIQIMMQ
<hr/>				
<i>A.thaliana</i> AGL11	112	NSNRNLMGDSLSSLSVKELKQ	ENRLEKAI	SRIRSKKHEILLVEIENAKREIELDNENI
<i>C.papaya</i> PAGL1	91	NSNRHLMGDSLALS	SVKELKQLENRLERG	ITRIRSKKHMLLAIEYLOKREIELENE
<i>C.sativus</i> CAG1	106	NSNRHLMGDSLAL	TVKELKQLENRLERG	ITRIRSKKHMLLAIEYLOKREIELENE
<i>P.dulci</i> MADS1	106	NSNRHLMGDALS	ILSVKELKQLENRLERG	INRIRSKKHMLLAIEYLOKREIELENE
<i>V.vinifera</i> MADS5	106	NSNRHLMGDSL	ASLTVKELKQLENRLERG	ITRIRSKKHEILLAEIEYLOKREIELENE
<i>L.esculentum</i> TAGL11	121	NNRHLVGEGLSSLNV	VELKQLENRLERG	ITRIRSKKHEATLAETDLHKREIQLEENNA
<hr/>				
<i>A.thaliana</i> AGL11	172	YLRTKIAEVERYQOHHHQ	MVSGSEINATEALASRN	YFAHSTMTAGSGSGNGGSYSDDPKK
<i>C.papaya</i> PAGL1	151	CLRTKIAEVERSLOVN	--MVIGPELNATQALASRN	FEIENETTYSHG-----PDKK
<i>C.sativus</i> CAG1	166	CLRTKIAEVERYQOAN	--MVSGPELNATQALASRN	FEFSPNIMEPAGP---VSYSHQDKK
<i>P.dulci</i> MADS1	166	CLRTKISEVERLQOAN	--MVGPELNATQALAS	RNEFSONNMEGG-----ATYPQQDKK
<i>V.vinifera</i> MADS5	166	YLRTKIAEVERLQOAN	--MVSTHEFNATQALVSRN	FEFQPNMIEGGSTG-----YPLHDKK
<i>L.esculentum</i> TAGL11	181	FLRSKIAENERLQELSM	MPSGGEYNAFQOYLARN	MLQLNMETALPS---YDPLSPDKK
<hr/>				
<i>A.thaliana</i> AGL11	232	ILHLG		
<i>C.papaya</i> PAGL1	200	ILHLG		
<i>C.sativus</i> CAG1	221	ILHLG		
<i>P.dulci</i> MADS1	217	ILHLG		
<i>V.vinifera</i> MADS5	219	VLHLG		
<i>L.esculentum</i> TAGL11	238	R----		

Figura 18. Alinhamento das seqüências parciais de aminoácidos deduzidas das seqüências dos genes que possuem o domínio MADS-BOX de *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana*_AGL11, [U20182.1](#)), mamão papaia (*C.papaya*_PAGL1), pepino (*C.sativus*_CAG1, [AF022377.1](#)), pêssego (*P.dulci*_MADS1, [AY947462.1](#)), uva (*V.vinifera*_MADS5, [AF373604.1](#)), tomate (*L.esculentum*_TAGL11, [AY098736.2](#)). Os aminoácidos idênticos estão destacados em fundo preto e letra branca, os aminoácidos similares estão destacados em fundo cinza e letra branca e os aminoácidos similares estão destacados em fundo branco e letra preta. O domínio conservado MADS-BOX (M) está sublinhado com linha cheia e o domínio conservado K-BOX (K) está sublinhado com linha pontilhada. O asterisco indica a região I (*Intervention region*).

PAP1

A **Figura 19**, que apresenta o alinhamento dos aminoácidos deduzidos da sequência codificadora parcial do gene *PAP1* com as seqüências codificadoras de outros fatores de transcrição do tipo MADS-BOX, indica os domínios protéicos conservados MADS-BOX e K-BOX, assim como a região não conservada *intervention region*. Como pode ser observado, o gene isolado *PAP1* apresentou similaridade com o fator de transcrição *TDR4* do tomate. Dessa maneira, pode-se sugerir que o gene *PAP1* isolado de mamão papaia parece ser um gene ortólogo ao gene de *TDR4* tomate, gene com função ainda desconhecida, porém com sua expressão já caracterizada em distintas fases de desenvolvimento e amadurecimento do tomate (ERIKSSON *et al.*, 2005; PNUELI *et al.*, 1991, VICTORIA *et al.*, 2003).

Aparentemente, o gene *PAP1* de mamão papaia, quando analisado por *qPCR* utilizando *Real Time* RT-PCR, apresentou padrão de expressão semelhante aos padrões de expressão do gene *TDR4* descritos na literatura. Eriksson *et al.* (2005) observaram que a expressão do gene *TDR4*, o qual aumenta sua expressão durante a antese do fruto (PNUELI *et al.*, 1991), aumentou durante o desenvolvimento do tomate e diminuiu durante o amadurecimento, quando analisados por *qPCR* utilizando *Real Time* RT-PCR. Contudo, Victoria *et al.* (2003) mostraram que o gene *TDR4* de tomate teve sua expressão diminuída durante o desenvolvimento do fruto, não havendo detecção do transcrito desse gene em frutos maduros. Essa discrepância entre os dois trabalhos pode ser efeito das técnicas de caracterização da expressão do gene, pois os segundos autores utilizaram RT-PCR semi-quantitativo, técnica menos sensível que a de *Real Time* RT-PCR.

Considerando-se a similaridade das seqüências *PAP1* e *TDR4* através do

alinhamento das proteínas e os resultados adquiridos da expressão gênica, é bastante provável que o gene *PAP1* isolado de mamão papaia seja um gene ortólogo ao gene *TDR4* de tomate.

<i>M.domestica_MADS2</i>	241	PNMLLP	AWIVRH	LNE	MGRGRV	QLKRIEN	KINRQVT	FSKRRS	GLLKKA	HEISVLC	DAEVL	
<i>N.tabacum_FUL_gene</i>	1	-----	-----	-----	MGRGRV	QLKRIEN	KINRQVT	FSKRRS	GLLKKA	HEISVLC	DAEVL	
<i>L.esculentum_TDR4</i>	1	-----	-----	-----	MGRGRV	QLKRIEN	KINRQVT	FSKRRS	GLLKKA	HEISVLC	DAEVL	
<i>P.dulci_MADS2</i>	1	-----	-----	-----	MGRGRV	QLKRIEN	KINRQVT	FSKRRS	GLLKKA	HEISVLC	DAEVL	
<i>P.persica_MADS6</i>	1	-----	-----	-----	MGRGRV	QLKRIEN	KINRQVT	FSKRRS	GLLKKA	HEISVLC	DAEVL	
<i>V.vinifera_AP1</i>	1	-----	-----	-----	MGRGRV	QLKRIEN	KINRQVT	FSKRRS	GLLKKA	HEISVLC	DAEVL	
<i>C.papaya_PAP1</i>	1	-----	-----	-----	MGRGRV	QLKRIEN	KINRQVT	FSKRRS	GLLKKA	HEISVLC	DAEVL	
<i>A.thaliana_AGL8</i>	1	-----	-----	-----	MGRGRV	QLKRIEN	KINRQVT	FSKRRS	GLLKKA	HEISVLC	DAEVL	
<i>M.domestica_MADS2</i>	301	IVFSTK	GKLF	FEYAT	TDSCMER	ILERYE	RYSYAE	RQLVAT	TDHSC	PGSWT	LEHAKL	KARLEV
<i>N.tabacum_FUL_gene</i>	46	IVFSTK	GKLF	FEYAT	TDSCMER	ILERYE	RYSYAE	RQLVAT	TDHSC	PGSWT	LEHAKL	KARLEV
<i>L.esculentum_TDR4</i>	46	IVFSTK	GKLF	FEYAT	TDSCMER	ILERYE	RYSYAE	RQLVAT	TDHSC	PGSWT	LEHAKL	KARLEV
<i>P.dulci_MADS2</i>	46	IVFSTK	GKLF	FEYST	TDSCMER	ILERYE	RYSYSE	KQLLA	NDHES	TGSWT	LEHAKL	KARLEV
<i>P.persica_MADS6</i>	46	IVFSTK	GKLF	FEYST	TDSCMER	ILERYE	RYSYSE	KQLLA	NDHES	TGSWT	LEHAKL	KARLEV
<i>V.vinifera_AP1</i>	46	IVFSTK	GKLF	FEYST	TDSCME	ILERYE	RYSYAE	RQLTA	TDPE	SGCNW	LEYSKL	KAKTEL
<i>C.papaya_PAP1</i>	46	IVFSTK	GKLF	FEYST	TDSCMER	ILERYE	RYSYT	DQRQT	VTN	IGPNC	NWN	LQYAKL
<i>A.thaliana_AGL8</i>	46	IVFSSK	GKLF	FEYST	TDSCMER	ILERYE	RYLYS	DKQLV	G	RDVSQ	SENW	LEHAKL
<i>M.domestica_MADS2</i>	361	LQRNQR	HYTG	EDLDSL	STKELQ	NLEHQ	LDSAL	KHIRS	SKNQL	MHE	SISELQ	KKDKALQEQ
<i>N.tabacum_FUL_gene</i>	106	LQRNQR	HYTG	EDLDSL	STKELQ	NLEHQ	LDSAL	KHIRS	SKNQL	MHE	SISELQ	KKDKALQEQ
<i>L.esculentum_TDR4</i>	105	LQRNQR	HYVG	EDLDSL	STKELQ	NLEHQ	LDSAL	KHIRS	RKNQL	MHE	SISELQ	KKDKALQEQ
<i>P.dulci_MADS2</i>	105	LQRNCS	HFMG	EDLDSL	SLKELQ	NLEQ	QLD	SAPKH	IRS	RKNQ	VMM	ESISELQ
<i>P.persica_MADS6</i>	105	LQRNCS	HFMG	EDLDSL	SLKELQ	NLEQ	QLD	SAPKH	IRS	RKNQ	VMM	ESISELQ
<i>V.vinifera_AP1</i>	105	LQRNCS	HFMG	EDLDSL	SLKELQ	NLEQ	QLD	SAPKH	IRS	RKNQ	VMM	ESISELQ
<i>C.papaya_PAP1</i>	106	LQRNER	HFLG	EDLDSL	SLKELQ	NLEH	QLD	SAL	KHVR	S	RKNQ	LM
<i>A.thaliana_AGL8</i>	105	LENNKR	NFMG	EDLDSL	SLKELQ	NLEH	QLD	AATKS	IRS	RKNQ	AM	ESISELQ
<i>M.domestica_MADS2</i>	421	NNQLCK	KVKERE	---	KE	LAQON	QRE	QQNQ	ELNS	PSFI	FQQQLD	SPNLG
<i>N.tabacum_FUL_gene</i>	166	NNQLCK	KVKERE	---	KE	LAQON	QRE	QQNQ	ELNS	PSFI	FQQQLD	SPNLG
<i>L.esculentum_TDR4</i>	165	NNQLSK	KVKERE	---	KE	VAQON	Q	---	WE	INS	SSFV	LPQQLD
<i>P.dulci_MADS2</i>	165	NNLLAK	KVKEKE	KE	KALAP	QAE	SWEQ	QVQ	NQGL	DCS	STLL	PEAL
<i>P.persica_MADS6</i>	165	NNLLAK	KVKEKE	KE	KALAP	QAE	SWEQ	QVQ	NQGL	DCS	STLL	PEAL
<i>V.vinifera_AP1</i>	165	NNMLAK	KEKEKE	---	KT	VAQ	QTHWE	QQNH	G	LNT	SSFLL	POOL
<i>C.papaya_PAP1</i>	166	NNQ	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>A.thaliana_AGL8</i>	165	NNSLKK	TKERE	---	KKTG	Q	QEG	LV	Q	CNS	SSSV	LLPQYCV

Figura 19. Alinhamento das seqüências parciais de aminoácidos deduzidas das seqüências dos genes que possuem o domínio MADS-BOX de maçã (*M.domestica_MADS2*, U78948.1), tabaco (*N.tabacum_FUL_gene*, DQ534202.1), tomate (*L.esculentum_TDR4*, AY098732.1), pêssgo (*P.dulci_MADS2*, AY947463.1) damasco (*P.persica_MADS6*, AY705973.1), uva (*V.vinifera_AP1*, AY538746.1), mamão papaia (*C.papaya_PAP1*), *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana_AGL8*, NM 125484.2). Os aminoácidos idênticos estão destacados em fundo preto e letra branca, os aminoácidos similares estão destacados em fundo cinza e letra branca e os aminoácidos similares estão destacados em fundo branco e letra preta. O domínio conservado MADS-BOX (M) está sublinhado com linha cheia. O domínio conservado K-BOX (K) está sublinhado com linha pontilhada. O asterisco indica a região I (*Intervention region*).

6.6. CONCLUSÃO

O isolamento de três genes de mamão papaia ortólogos aos fatores de transcrição previamente caracterizados em tomate pode contribuir para o entendimento mais aprofundado dos mecanismos de regulação do amadurecimento dessa fruta. Apesar do gene *CpSPL*, aparentemente não ser transcrito na polpa dos frutos verdes e maduros, o isolamento dessa sequência genômica pode ser o início da busca de genes ortólogos ao *LeSPL-CNR* de tomate, gene este regulatório dos metabolismos da lamela média e carotenóides nos tomates com fenótipo recessivo *cnr*. Já os prováveis fatores de transcrição do tipo MADS-BOX isolados de mamão papaia, apesar de funções desconhecidas, podem fazer parte de um complexo controle transcriptômico do amadurecimento. O isolamento desses genes revela o potencial dessa nova abordagem baseada no estudo de genes com potencial regulatório do amadurecimento de frutos.

6.7. AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Graham B. Seymour pelos seis meses de trabalho em conjunto desenvolvido na *University of Nottingham – UK* (maio a novembro de 2006), ao Dr. Mervin Poole pelas preciosas dicas laboratoriais e a Jackie Humpreys pela ajuda nas instalações estudantis.

6.8. REFERÊNCIAS

Alexander L., Grierson D. Ethylene Biosyntheses and Action in Tomato: a Model for Climateric Fruit Ripening. *Journal of Experimental Botany*, v. 53: p. 2039-2055, 2002;

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215: p. 403-407, 1990;
- Alvarez-Buylla E., Liljegren S., Pelaz S., Gold S., Burgeff C., Ditta G. Vergara F., Yanofsky M. MADS-box Gene Evolution Beyond Flowers: Expression in Pollen, Endosperm, Guard Cells, Roots and Trichomes. *The Plant Journal*, v. 24: p. 457-466, 2000;
- Cardon G., Höhmann S., Klein J., Nettesheim K., Saedler H. and Huijser P. Molecular characterization of the Arabidopsis SBP-box genes. *Gene*, v. 237: p. 91-104, 1999;
- Cardon G., Höhmann S., Nettesheim K., Saedler H. and Huijser P. Functional analysis of the Arabidopsis thaliana SBP-box gene SPL3: a novel gene involved in the floral transition. *Plant Journal*, v. 12: p. 367-377, 1997;
- Chang S., Puryear J., Cairney J. A Simple and Efficient Method for Isolating RNA from Pine Trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 11: p. 113-116, 1993;
- Devitt L.C., Sawbridge T., Holton T.A., Mitchelson K., Dietzgen R.G. Discovery of genes associated with fruit ripening in *Carica papaya* using expressed sequence tags. *Plant Science*, v. 170: p. 256-363, 2006;
- Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Focus*, v. 12: p. 13-15, 1990;
- Eriksson E., Bovy A., Manning K., Harrison L., Andrews J., De Silva J., Tucker G., Seymour G. Effect of the *Colorless non-ripening* Mutation on Cell Wall Biochemistry and Gene Expression during Tomato Fruit Development and Ripening. *Plant Physiology*, v. 136: p. 4184-4197, 2004;
- Fillatti J., Kiser J., Rose B., Cornai L., in Tomato Biotechnology, Nevins D., Jones R., Eds., Liss, New York, p. 199-210, 1987;
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, p. 571-607, 2005;
- Giovannoni J. Genetic Regulation of Fruit Developing and Ripening. *Plant Cell*, v. 16: p. S170-S180, 2004;
- Giovannoni J. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology*, v. 52: p. 725-749, 2001;
- Klein J., Saedler H. and Huijser P. A new family of DNA binding proteins includes

- putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene SQUAMOSA. *Molecular Genetics*, v. 250: p. 7-16, 1996;
- Lincon J., Fischer R. Regulation of Gene Expression by Ethylene in Wild-Type and *rin* Tomato (*Lycopersicon. esculentum*) *Fruit Plant Physiology*, v. 88: p. 370-374, 1988;
- López-Gómez R., Gómez-Lim M.A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *Hortscience*, v. 27: p. 440-442, 1992;
- Manning K., Tör M., Poole M., Hong Y., Thompson A., King G., Giovannoni J., Seymour G. A Naturally Occuring Epigenetic Mutation in a Gene Encoding an SBP-box Transcription Factor Inhibits Tomato Fruit Ripening. *Nature genetics*, v. 38: p. 948-952, 2006;
- Pnueli L., Abu-Abeid M., Zamir D., Nacken W., Schwarz-Sommer Z., Lifschitz E. The MADS box Gene Family in Tomato: Temporal expression during floral development, conserved secondary structures and homology with homeotic genes from *Antirrhinum* and *Arabidopsis*. *Plant Journal*, v. 1: p. 255-266, 1991;
- Pnueli L., Hareven D., Rounsley S., Yanofsky M., Lifschitz E. Isolation of the tomato AGAMOUS Gene *TAG1* and analysis of its homeotic role in transgenic plants. *Plant Cell*, v. 6: p. 163-173, 1994;
- Reichmann J., Meyerowitz E. MADS-domain Proteins in Plant Development. *Biology Chemistry*, v. 378: p. 1079-1101, 1997;
- Rozen S., Skaletsky H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, p. 365-386, 2000;
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniats T. Molecular cloning: A laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York USA, 2000;
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminatin inhibitors. *PNAs*, v. 74: p. 5463-5467, 1977;
- Seymour G., Taylor J., Tucker G. Biochemistry of fruit ripening. Chapman & Hall, London, 1993;
- Taylor J. and Tucker G. Fruit Ripening In: *Biochemistry of Plants*, Tucker G. and Grierson D., Chapman & Hall, London. p. 1-51, 1987;
- Theissen G. Development of Floral Organ Identity: Stories from the MADS House.

- Current Opinion in Plant Biology*, v. 4: p. 75-85, 2001;
- Theissen G., Kim J., Saedler H. Classification and Phylogeny of the MADS-box Multigene Family Suggest Defined Roles of MADS-box Gene Subfamilies in the Morphological Evolution of Eukaryotes. *Journal Molecular Evolution*, v. 43: p. 484-516, 1996;
- Thompson A., Tör M., Barry C., Vrebalov J. Molecular and Genetic Characterization of a Novel Pleiotropic Tomato-Ripening Mutant. *Plant Physiology*, v. 120: p. 383-389, 1999;
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, v. 22: p. 4673-4680, 1994;
- Tigchelaar E., McGlasson W., Buescher R. Genetic Regulation of Tomato Fruit Ripening. *Hortscience*, v. 13: p. 508-513, 1978;
- Victoria B., Claudia B., Cecília D., Mauricio H., Silvana B., Estela V., Eduardo Z. MADS-box Genes Expressed During Tomato Seed and Fruit Development. *Plant Molecular Biology*, v. 52: p. 801-815, 2003;
- Vrebalov J., Ruezinsky D., Padmanabhan V., White R., Medrano D., Drake R., Schuch W., Giovannoni J. A MADS-Box Gene Necessary for Fruit Ripening at the Tomato *Ripening-Inhibitor* (Rin) Locus. *Science*, v. 296: p. 343-346, 2002;
- Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, v. 31: p. 3406-3415, 2003.

CAPÍTULO 7

ATIVIDADE E EXPRESSÃO DA ENZIMA

ENDOPOLIGALACTURONASE DURANTE O AMADURECIMENTO DO

MAMÃO PAPAIA

7.1. RESUMO

O mamão papaia é um fruto carnoso que tem como principal característica o amolecimento da polpa durante o amadurecimento. A enzima endopoligalacturonase (endo-PG, EC 3.2.1.15) é apontada como a principal enzima responsável pela desestruturação da lamela média e parede celular de frutos carnosos, e a análise diferencial da expressão gênica por *Differential Display-PCR* revelou que o gene de uma endo-PG apresentou a expressão estimulada durante o amadurecimento do mamão. Assim, esse trabalho teve por objetivo a clonagem desse gene e o acompanhamento de sua expressão e atividade durante o amadurecimento do fruto. De acordo com os resultados, a endo-PG de mamão papaia respondeu prontamente ao estímulo hormonal com etileno tanto endógeno quanto exógeno. O aumento da atividade e da quantidade de transcritos desse gene está diretamente relacionado com o amolecimento da polpa do mamão. O isolamento da seqüência completa de cDNA mostrou alta similaridade com endopoligalacturonases de outros frutos e vegetais, e a proteína predita apresentou 373 aminoácidos com peso molecular de 39,3 KDa, um ponto isoeletrico (pI) provável de 9,01 e uma sinalização para ação extra-celular, o que reforça a idéia de que essa seja uma seqüência de um gene envolvido com o amaciamento da polpa e, portanto, relacionado com a qualidade pós-colheita do fruto.

7.2. INTRODUÇÃO

Durante o amadurecimento do mamão papaia, uma das principais mudanças ocorridas no fruto é o amolecimento da polpa. Frutos carnosos, como é o caso do mamão, possuem a polpa constituída de células parenquimatosas, de características poliédricas ou alongadas com paredes primárias sem espessamento secundário, conferindo elasticidade ao tecido. Elas são separadas entre si pela lamela média ou por espaços intercelulares (BRETT; WALDRON, 1996), formando assim a parede celular primária do tipo I (CARPITA; GIBEAUT, 1993). Esse tipo de parede celular é composta por dois tipos de matrizes, uma celulósica (microfibrilar ou cristalina) e outra péctica (amorfa). Enquanto que na matriz microfibrilar os espaços inter-moleculares são reduzidos devido à compactação molecular (de celulose, principalmente) a matriz péctica se apresenta de forma oposta, isto é, as moléculas de homo e ramnogalacturonanos estão ligadas entre si de forma aleatória e com espaços inter-moleculares maiores que a matriz celulósica (BRUMMELL; HARPSTER, 2001; YONG *et al.*, 2005). Dessa maneira, o efeito enzimático hidrolítico nos galacturonanos da lamela média desestabilizaria de forma mais pronunciada a organização celular. Como os galacturonanos são formados por “esqueletos” de ácido poligalacturônico, uma enzima que teria esse efeito desestabilizador seria aquela que pudesse agir de forma aleatória entre os galacturonanos, no caso a enzima endopoligalacturonase (endo-PG, EC 3.2.1.15). A endo-PG catalisa a hidrólise das ligações α -1-4 de ácido poligalacturônico dos homogalacturonanos, a princípio desesterificados, de forma randômica (BRUMMELL; HARPSTER, 2001). Alguns grupos conseguiram isolar em mamão papaia alguns genes que podem estar ligadas à desestruturação celular da polpa durante o

amadurecimento (CHEN; PAULL, 2003; OTHMAN *et al.*, 1998,), além da caracterização da atividade enzimática de várias enzimas relacionadas com o amolecimento da polpa (ALI *et al.*, 1998; 2004; LAZAN *et al.*, 1995; 2004; SOH *et al.*, 2006). Entretanto, não há relatos de isolamento de uma seqüência de cDNA completa de PG e estudos mais detalhados acerca da expressão dessa enzima em mamões. Dessa maneira, é apresentado neste Capítulo a caracterização de uma seqüência completa de cDNA de uma endopoligalacturonase previamente isolada por *Differential Display-PCR* (**Capítulo 3**). Além disso, foi investigada a relação entre a atividade enzimática, a transcrição de espécies de mRNA e o amolecimento da polpa do mamão papaia durante seu amadurecimento.

7.3. MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras e firmeza da polpa

As amostras utilizadas nos experimentos descritos nesse capítulo foram provenientes dos frutos da amostragem II caracterizados no **Capítulo 2** (**Figura 4**, página 33). As medidas da firmeza da polpa dos frutos de mamão papaia foram efetuadas de acordo com os métodos descritos no **Capítulo 2**.

Medida da atividade da poligalacturonase

As proteínas foram extraídas segundo Lazan *et al.* (1995) com pequenas modificações. Um grama de amostra de mamão papaia previamente triturada em nitrogênio líquido foi homogeneizada em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 4,6) gelado, contendo NaCl 1 M, EDTA 13 mM, β -mercaptoetanol 10 mM,

polivinilpirrolidona 40 (PVP-40) 1% (m/v) e antipaina 25 μ M. O sobrenadante foi recuperado por centrifugação (15.000g, 4 °C, 30 minutos), filtrado em uma camada de tecido *miracloth* (Calbiochem) e dialisado por 12 horas utilizando membrana de celulose com exclusão molecular de 12.000 Da a 14.000 Da contra tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5) contendo NaCl 0,1 M.

A atividade enzimática foi medida segundo Karakurt e Huber (2003) com pequenas modificações. Vinte microlitros do extrato dialisado foram homogeneizados em 100 μ L de tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,5) contendo 1 mg de ácido poligalacturônico previamente lavado com etanol 80%. A quantidade de ácido galacturônico produzido foi determinada pelo método de detecção de açúcares redutores utilizando 2-cianoacetamida em tampão borato pH 9 (HONDA *et al.*, 1982). Uma curva padrão de concentração de ácido galacturônico foi traçada e a atividade da enzima poligalacturonase foi estimada através da quantidade de ácido galacturônico produzido por miligrama de proteína extraída, por minuto. O branco da reação foi obtido através da mistura do extrato enzimático inativado por fervura com o meio reacional acima descrito, seguido pela detecção dos açúcares redutores presentes.

Northern Blotting

Para efetuar a análise de transcritos do gene da endo-PG de mamão papaia, um *Northern Blot* foi realizado. Os RNAs totais utilizados na análise foram derivados dos frutos controle, tratados com etileno e tratados com 1-MCP da *amostragem II*, compreendendo do segundo até o quinto dia pós-colheita e somando-se o sétimo dia pós-colheita.

Dez microgramas de RNA total foram separados em gel de agarose 1,2 % em tampão MOPS-NaOH 0,02 M (pH 7,0), contendo formaldeído 2,2 M, de acordo com Sambrook *et al.* (1989). As amostras foram primeiramente incubadas para desnaturação a 65 °C por 15 minutos, resfriadas em gelo e adicionadas de tampão para corrida contendo MOPS-NaOH 0,02 M (pH 7,0), formaldeído 2,2 M, formamida 50 %, azul de bromofenol 0,0125 % e glicerol 4,5 % de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Para estimativa do tamanho do RNA hibridizado com a sonda foi utilizado o RNA Marker 0,2-10 Kb (Sigma[®]), tendo este passado pelo mesmo tratamento que as amostras. A separação das amostras de RNA se deu por eletroforese conduzida em tampão MOPS-NaOH 0,02 M (pH 7,0), realizada a 45 V por 1 hora e 30 minutos. Após eletroforese, o RNA foi transferido por capilaridade para uma membrana de “nylon” (Hybond[™]-N+, Amersham Biosciences[®]) de acordo com Sambrook *et al.* (1989), e nela fixado permanentemente por exposição a radiação ultra-violeta (120000 mJ/cm²) em uma câmara Hoefer[®] UVC 500. A confirmação da transferência do RNA (inclusive dos padrões) e análise de sua integridade foram feitos com coloração da membrana com azul de metileno 0,04 % em tampão acetato de sódio 0,5 M pH 5,2.

O fragmento de endo-PG isolado por *DD-PCR* isolado no **Capítulo 3**, o clone *CpPG*, com fragmento inserido no plasmídeo pCR[®]4-TOPO[®] (Invitrogen[™]), foi utilizado para síntese da sonda radioativa. Efetuou-se um PCR utilizando 1 µM de cada um dos *primers* M13 *foward* e M13 *reverse* em tampão Tris-HCl 20 mM (pH 8,4) na presença de 20 µM de dNTP contendo KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM e 1 unidade da enzima *Taq* polimerase em um total de 20 µL de reação. O programa utilizado foi de 25 ciclos a 94 °C / 30 s, 55 °C / 30 s e 72 °C / 1 min. A análise da

reação de PCR foi feita por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo em tampão Tris-fosfato 0,09 M pH 8 e EDTA 0,002 M (SAMBROOK *et al.*, 1989), realizada a 80 V durante 25 minutos. A banda correspondente ao fragmento amplificado foi cortada do gel e purificada utilizando o kit “GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification” (Amersham Biosciences®), sendo o DNA retomado em 50 µL de água estéril. A sonda marcada radioativamente foi sintetizada utilizando o kit “Ready-to-Go DNA Labelling Beads” (Amersham Biosciences®) a partir de 50 ng de DNA do fragmento de poligalacturonase, seguindo as instruções do fabricante, e foi purificada por cromatografia de filtração em gel em coluna AutoSeq™ G50 (Amersham Biosciences®).

Para a hibridização com a sonda, a membrana de “nylon” foi bloqueada por incubação em 25 mL de solução de pré-hibridização contendo 5 X SSC (citrato de sódio 0,75 M pH 7 e NaCl 0,75 M), 5 X solução de Denhardt, SDS 0,5% e 500 µg de DNA não-homólogo (DNA de salmão) durante 2 horas a 65 °C. Após esse período a sonda desnaturada foi adicionada à solução e a membrana foi incubada a 65 °C durante 12 horas para hibridização. Terminada essa etapa, a membrana foi lavada em 2 X SSC (citrato de sódio 0,3 M pH 7 e NaCl 0,3 M) e SDS 0,1% durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguida de lavagem final com uma solução contendo 1 X SSC (citrato de sódio 0,15 M pH 7 e NaCl 0,15 M) e SDS 0,1% durante 15 minutos a 65 °C. Terminada a lavagem, a membrana foi retirada da solução, envolta em filme plástico e exposta a filme radiográfico a -80 °C, sendo este revelado após 16 horas de exposição.

Isolamento da sequência completa de cDNA da endo-PG

Após a comparação da sequência da PG de mamão papaia isolada por *DD-PCR* (**Capítulo 3**) com o banco de dados, foi sintetizado um par de *primers* (GSP2_PG: 5'-GCGCGAGGATCAAATCGTGGGGGAGAC-3', GSP1_PG: 5'-CGTACACGGACGCTCTGGGCTGCAATC-3') para a tentativa de isolamento da sequência completa do cDNA por RACE (*Rapid Amplification cDNA End*), utilizando o kit “SMART™ RACE cDNA Amplification Kit” (Clontech Laboratories, Inc.), segundo as instruções do fabricante.

As reações para o isolamento das sequências completas dos cDNAs foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose, clonadas e seqüenciadas em triplicata (SANGER *et al.*, 1977), de maneira similar ao descrito para os fatores de transcrição, mencionado no **Capítulo 5**. O alinhamento das sequências foi feito utilizando a ferramenta “ClustalW” (THOMPSON; HIGGS; GIBSON, 1994) disponível na internet (<http://align.genome.jp/>).

7.4. RESULTADOS

Medida da atividade da endo-PG

A **Figura 20** apresenta os efeitos dos tratamentos com etileno e 1-MCP sobre a atividade da poligalacturonase e a firmeza da polpa dos frutos. Quando analisados em conjunto, os gráficos da atividade enzimática e da firmeza da polpa mostram uma correlação interessante. No grupo de frutos controle, no mesmo dia em que a atividade da poligalacturonase aumentou quase três vezes, a textura da polpa diminuiu aproximadamente seis vezes (4º dia pós-colheita). A atividade enzimática continuou alta nos próximos dias enquanto a textura da polpa foi reduzida a níveis

próximos do zero. Já no grupo de frutos tratados com etileno, a textura da polpa também foi reduzida aproximadamente seis vezes no mesmo dia em que a atividade enzimática aumentou aproximadamente três vezes (3º dia pós-colheita), porém a atividade da poligalacturonase diminuiu no próximo dia (4º dia pós-colheita) e um novo aumento foi observado no 5º dia pós-colheita. Em contrapartida, a textura da polpa dos frutos já se encontrava reduzida a níveis muito baixos desde o primeiro aumento da atividade da poligalacturonase (3º dia pós-colheita). Já no grupo de frutos tratados com 1-MCP, a firmeza da polpa dos frutos pareceu diminuir discretamente durante o amadurecimento, porém essa redução não foi suficiente a ponto de tornar os frutos adequados para o consumo. A atividade da poligalacturonase pareceu seguir essa mesma tendência, não apresentando um valor máximo que pudesse ser comparado àquele observado para a atividade enzimática no grupo de frutos controle. Comparando os dados da atividade da poligalacturonase e da firmeza da polpa dos frutos apresentados nas figuras, é possível considerar que a enzima poligalacturonase, ao atuar na despolimerização da parede celular da polpa do mamão papaia, tenha contribuído para a redução da firmeza da polpa.

Northern Blotting

Analisando-se a **Figura 21**, observa-se no grupo de frutos controle que no dia em que a textura da polpa foi reduzida e ocorreu o aumento da atividade da PG (quarto dia pós-colheita), os níveis de mRNA de poligalacturonase, de tamanho aproximado de 1,5 quilobases (Kb), aumentaram. A **Figura 21** revela que logo após o tratamento com etileno (segundo dia e meio pós-colheita), já há indícios de

transcrição de espécies de mRNA. Coincidentemente nesse ponto de análise a textura da polpa dos frutos começou a diminuir, apresentando os menores valores no terceiro dia pós-colheita, culminando com a maior expressão do mRNA da endo-PG. O tratamento dos frutos com 1-MCP inibiu a transcrição de espécies de mRNA da enzima pectinolítica de mamão papaia estando associado à manutenção da textura da polpa dos frutos tratados com este competidor de etileno.

Figura 20: Efeito do tratamento com etileno e 1-MCP na firmeza da polpa durante o amadurecimento do mamão papaia. Os gráficos mostram a relação entre a queda da firmeza da polpa dos frutos e o aumento da atividade da enzima poligalacturonase. Grupo de frutos controle (CONTROLE, □). Grupo de frutos tratados com etileno (ETILENO, ○). Grupo de frutos tratados com 1-MCP (1-MCP, △). Atividade da poligalacturonase efetuada segundo Karakurt e Huber (2003) com pequenas modificações (μg de ácido galacturônico mg proteína $^{-1}$ minuto $^{-1}$; gráficos em barras, ordenadas da esquerda). Medida da textura da polpa efetuada com texturômetro (N cm^2 ; gráficos em linha, ordenadas da direita). A linha vertical tracejada dos dois últimos gráficos indica o fim do tratamento com etileno e com 1-MCP. D.P.C.: Dias Pós-Colheita. As barras verticais representam o erro padrão. ($n=4$).

Figura 21. *Northern Blotting* de endopoligalacturonase de mamão papaia. O RNA extraído de cada amostra foi submetido a eletroforese desnaturante com formaldeído, transferido para uma membrana carregada positivamente e hibridizado com a sonda radioativa sintetizada a partir de um fragmento de endopoligalacturonase de mamão papaia. O filme radiográfico foi exposto durante 16 horas e revelado para visualização dos fragmentos hibridizados com aproximadamente 1,5 quilobases (Kb). Amostras de RNA do grupo de frutos controle (CONTROLE). Amostras de RNA do grupo de frutos tratados com etileno (ETILENO). Amostras de RNA do grupo de frutos tratados com 1-MCP (1-MCP). Os RNAs ribossomais (rRNA) foram corados com azul de metileno logo após a transferência para a membrana, demonstrando a integridade do material e a presença de iguais quantidades aplicadas no gel. D.P.C.: Dias Pós-Colheita.

Isolamento da sequência completa de cDNA da endo-PG (CpPG)

Com base na sequência parcial do gene da enzima endo-PG de mamão papaia isolada por *DD-PCR*, cujo gene foi denominado *CpPG* (*Carica papaya polygalacturonase*), os *primers* GSP1_PG e GSP2_PG foram desenvolvidos para

serem utilizados para tentativas de isolamento da sequência completa do cDNA por RACE. A **Figura 22** mostra a foto de um gel de agarose das reações de PCR 5'-RACE e 3'-RACE, cujas bandas de aproximadamente 1000 pb e 600 pb, respectivamente, foram isoladas para o seqüenciamento dos fragmentos. Através da análise das seqüências obtidas dos dois fragmentos, conseguiu-se deduzir a seqüência codificadora completa do gene *CpPG*, além das seqüências não-traduzidas nas extremidades do cDNA.

Figura 22. Eletroforese em gel de agarose de reações de amplificação por PCR do gene *CpPG* utilizando o *primer* GSP1_PG para a reação 5'-RACE (**A**) e GSP2_PG para a reação 3'-RACE (**B**) em combinação com o *Universal Primer Mix* (UPM). Amostras de cDNA de frutos maduros foram utilizadas para as reações do tipo RACE. **P**) Padrão de peso molecular representados à esquerda pelos valores de tamanhos de algumas bandas.

A **Figura 23** mostra a combinação dos dados gerados por PCR 5'-RACE e 3'-RACE com a seqüência parcial isolada por *DD-PCR*, na qual é possível observar a organização da seqüência de nucleotídeos do cDNA (1556 pb) do gene *CpPG*, sendo a seqüência deduzida de aminoácidos apresentada em letras maiúsculas. A seqüência 5'-UTR, com 102 pb, e a seqüência 3'-UTR, com 313 pb, estão apresentadas na figura em letras minúsculas e os dois prováveis sinais de

poliadelilação, posicionados em 1420 pb (ATTAAA) e em 1539 pb (AATAAA), estão sublinhados na seqüência 3'-UTR. A seqüência completa do gene *CpPG* está de acordo com o tamanho molecular do fragmento anteriormente estimado por *Northern Blot* (1,5 Kb).

A proteína formada pela seqüência deduzida de aminoácidos a partir da seqüência codificadora (1119 pb) do gene *CpPG* possui 373 aminoácidos. Utilizando a ferramenta *TargetP 1.1* (EMANUELSSON *et al.*, 2000) disponível no endereço eletrônico <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP> para verificar a provável localização subcelular, o resultado foi indicativo de que a proteína possui um peptídeo sinal para ser transportado para fora da célula (*secretory pathway*), o que seria de se esperar, já que a poligalacturonase atua despolimerizando moléculas de pectina presentes na lamela média dos frutos (SEYMOUR *et al.*, 1993). A seqüência foi analisada ainda pela ferramenta *SignalP 3.0* (BENDTSEN *et al.*, 2004), disponível no endereço eletrônico <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> para verificar possíveis peptídeos de clivagem, a qual mostrou como principal resultado um sítio de clivagem posicionado entre os aminoácidos *Ala35* e *Thr36*, representado na **Figura 23** por um seta vertical. Com base nesse resultado, a proteína madura, com 373 aminoácidos, foi submetida à análise com a ferramenta *ProtParam* (GASTEIGER *et al.*, 2005), disponível no endereço eletrônico <http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>, que indicou um peso molecular de 39,3 KDa e um ponto isolelétrico (pI) provável de 9,01.

```

1  aattcgatttctaatacgactcactaagggcaagcagtggtatcaacgcagagtacgcggg
61  aactccccatcttctttcacacaactcattcctctccgatcacATGGAATTGGGTCACTCA
                                     M E L G H S
121 ACAATGACGACAATCCGCTCTCACAACCTCCTCCTCCTCCTCCCCCTCCTCCTCCTC
    T M T T I R S H N L L L L L L L P L L L L L
181 TCATCCTCTGCCAACCCATCCTCCGCCACATCAACCCACAACGTCGTGGCCTACGGAGCC
    S S S A N P S S A T S T H N V V A Y G A
                                     ↑
241 AAACCCGGCGGCACCACTGACTCCAGGCAGGCCTTTTTATCCGCCTGGA AAAACGCGTGT
    K P G G T T D S R Q A F L S A W K N A C
301 GCGTCTGCCCGCCCGGCCACTCTCTATGTGCCGCGAGGGAAGTTCTTGCTGGCCGGTAGG
    A S A R P A T L Y V P R G K F L L A G R
361 ATTGTTTTTCGATGGAGAATGCAGGAACAGTAAATGGTGGTGCGTATAGATGGAACCTC
    I V F D G E C R N S K M V V R I D G T L
421 GTGGCGCCGGCGGATTACAGGGTTCTTAAAGATGGTGGGTACTGGGTTTTGTTTCAGAAC
    V A P A D Y R V L K D G G Y W V L F Q N
481 GTTAATGGACTCTCGGTTTATGGTGGAGTTCTTGATGGCCGTGGGTCTGGCTTGTTGGGAT
    V N G L S V Y G G V L D G R G S G L W D
541 TGCAAGAAGGCTGGCCATAGCTGCCCCCTTTGGAGCTACGTCAATCGGGTTTCTCAACTCC
    C K K A G H S C P F G A T S I G F L N S
601 CGGAACATAGTGATCGACGGGTTAACGTCGTTAAACAGCCAGGTATTTACATCGTTATC
    R N I V I D G L T S L N S Q V F H I V I
661 TACGGCTGCAACAACGTGAAGCTTCAAGGCACGAAAGTCTCAGCCTCCGGCGTCAGCCCC
    Y G C N N V K L Q G T K V S A S G V S P
721 AACACCGACGGAATCCACGTCCAGATGTCATCCCATGTCAACATCCTCTCTCCACCATC
    N T D G I H V Q M S S H V T I L S S T I
781 GCCACCGGCGACGACTGCGTCTCCATCGGCCCGGCACTTCCACTCTCTGGATCGAAAAC
    A T G D D C V S I G P G T S T L W I E N
841 ATGGCTTGTTGGCCCCGGCCACGGCATAAGCGTCGGGAGTCTCGGAAAATACTCTAACGAG
    M A C G P G H G I S V G S L G K Y S N E
901 CCCGGCGTACAAAACGTGACGGTTAAAGTGTCAGCTTTACTGGAACCCAAAATGGCGCG
    P G V Q N V T V K S V S F T G T Q N G A
961 AGGATCAAATCGTGGGGGAGACCCAGTAATGGTTTTGCTAAAAATATTATCTTTCAACAT
    R I K S W G R P S N G F A K N I I F Q H
1021 GTAACGATGAACAATGTCCAGAACCCTATTGTTATTGATCAGAACTACTGTCCGGGAAAC
    V T M N N V Q N P I V I D Q N Y C P G N
1081 GTCAGGTGCCCCGGGAAGATCTCCGGGATCAAAGTTAGTGATGTAACGTATGAGGATATT
    V R C P G K I S G I K V S D V T Y E D I
1141 CATGGCTCGTCGGCGACGGAAGTCGCCGTGAATTTTGATTTGGCAGGCCCCAGAGCGTCC
    H G S S A T E V A V N F D L A G P R A S
1201 GTGTACGGGGATAAAGTTGCGTAATgtgagactcagttataaaaaatcagaaggcggaagc
    V Y G D K V A *
1261 ttcgtgcaaacatgccggcgggacggtgtccggaacggttcagcccaatagttgcttggtg
1321 atgatgggaattttttattcatgatggaaattagaattttaaaaaaagaaaatatgtatgtg
1381 ttgaagctatgtaattagtgataattttggttggtgtagagattaaagtaatttagttgg
1441 attttagtgtgttttgatgtgatttgagaaaaaatggaaaagaaaattattgttagttca
1501 taaataaattaataacaattgtttgcctataaagagtcgaataaaaaatcgaattc (a) 18

```

Figura 23. Seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos do gene *CpPG*. A seqüência dos aminoácidos estão destacados em letras maiúsculas. Os aminoácidos deduzidos estão apresentados pelo código de uma letra e estão abaixo do primeiro nucleotídeo de cada códon. O stop códon está representado por um asterisco. Os dois prováveis sinais de poliadenilação estão sublinhados na parte 3'-UTR. O provável sítio de clivagem da proteína predita está representado por uma seta vertical entre os aminoácidos Ala35 e Thr36.

7.5. DISCUSSÃO

Relação da atividade e transcrição da endo-PG com a queda da textura

Quando são comparados os dados de atividade enzimática, firmeza da polpa e *Northern Blot* da enzima endo-PG, pode-se observar que a diminuição da firmeza da polpa acompanhou o aumento de transcritos e de atividade da enzima poligalacturonase, pelo menos quando analisados os frutos controle e tratados com etileno. Já no grupo de frutos tratados com 1-MCP não foi observado um decréscimo significativo na firmeza da polpa dos frutos assim como não houve um aumento no número de transcritos e na atividade da enzima, reforçando a hipótese de que a enzima poligalacturonase esteja, de fato, relacionada com a queda da firmeza da polpa. Apenas no 4º dia pós-colheita, para o grupo de frutos tratados com etileno, houve uma atividade um pouco menor diferindo daquela observada durante o amadurecimento dos frutos do grupo controle. Uma vez que os níveis de transcritos não acompanharam a atividade enzimática, não se pode descartar que essa diferença seja consequência apenas das condições de ensaio enzimático, ou da amostra em questão, sem qualquer significado real.

Outro dado interessante pertinente à análise dos gráficos é a aparente regulação da enzima pelo hormônio etileno. Os resultados da atividade enzimática e da expressão do gene *CpPG* de mamão papaia, quando comparados com os gráficos de produção endógena de etileno (**Capítulo 2**), mostram que a expressão do gene e a atividade enzimática aumentaram nos frutos controle quando ocorreu um aumento na produção de etileno. Foi notado também que mediante o tratamento com etileno a expressão do gene e a atividade enzimática aumentaram e o tratamento com um inibidor da resposta desse hormônio (1-MCP) a expressão do

gene e a atividade enzimática permaneceram inalteradas. Esses resultados corroboram a hipótese de que a transcrição da enzima seja regulada pelo hormônio etileno e que esta tem papel fundamental no amolecimento da polpa durante o amadurecimento do mamão papaia, afetando a qualidade pós-colheita e a vida de prateleira do fruto.

Seqüência completa de cDNA da endo-PG de mamão papaia

A **Figura 24** mostra o alinhamento da proteína deduzida pela região codificadora do gene *CpPG*, mostrando uma alta similaridade com poligalacturonases de outros frutos e espécies vegetais. Fazendo uso do software rpsBLAST (MARCHLER-BAUHER *et al.*, 2005), o qual procura domínios protéicos conservados (disponível no endereço eletrônico www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), foi obtido um “*e-value*” de $9e^{-64}$ para o domínio conservado (sublinhado na **Figura 24**) das enzimas glicosil-hidrolases da família 28, que inclui a poligalacturonase (EC: 3.5.1.15). Esse baixo valor de “*e-value*” representa que o domínio protéico da seqüência isolada apresenta alta probabilidade de ser uma enzima glicosil-hidrolase, mostrando que a seqüência isolada é de uma provável poligalacturonase de mamão papaia com ação na despolimerização de pectinas.

C.papaya	1	MELGHSTMTTIRSHN	LLLLLLP	LLLLSS	SSANP	SSAT	STHN	VAY	GAKP	GGT	TDSR	QAF	LSA	WKN	ACAS	AR	PATLY	VP	GRK
A.thaliana	1	-----	MHSS	LLIVL	FLLS	VSS	---	SSS	QTYN	IL	SY	GAKP	DGKT	DST	KAF	TVL	WK	KACAS	VKPV
D.carota	1	-----	VSS	LYL	LIFF	LN	ST	SSAM	TYN	IL	IF	GAKS	GG	QSD	SSK	AL	LKAW	GAACAT	TKPATI
L.esculentum	1	-----	MKINN	PFSS	ILLIS	FFS	IFF	KSIAD	VFL	NV	IF	GAKS	DNKTD	SSY	AFL	SAW	DLACN	SSK	SS
P.communis	1	----	MANPK	SLSY	PAAAV	FALL	LMMA	ISI	NVDAA	AVT	FS	SSL	GAKAD	GSTD	STKAF	LSAW	SNACAS	VNP	AVIY
C.melo	1	-----	MMV	VV	IL	IF	ALL	LK	KHAL	TAAAG	GGLT	FD	IVNL	GAKP	DGKT	DASH	LQSAW	ARACS	ST
																			VASTVY
																			VP
																			GRK
C.papaya	81	FLLAGR	VFDGE	CRNSK	MVVR	IDGTL	VAPAD	YRV	LKDG	GYW	LFQ	NV	GLS	VYGG	VLDGR	SG	LWD	CKK	AGH
A.thaliana	65	FLLRSI	IFDGE	KCKRKS	VTFRI	QGT	LVAP	SDYRV	ICKEN	YWIL	FQ	HLD	GIS	VYGG	VLD	AQCA	SLWS	CKRKS	SGK
D.carota	66	FLLKNV	FYEGH	CRNGAI	ITIR	V	DGTL	VAPSD	YN	VIG	SS	GNW	KFE	RVT	GV	SIY	GGT	L	DQGT
L.esculentum	72	FLVKQ	AYFKG	KCN	NNPI	I	FRIDG	SIVAP	FDYN	VIG	NEKN	WILFQ	GVD	GV	SVI	YGG	NLD	QGS	SLWT
P.communis	76	FLLGNA	VFSGP	CNNNA	ITFRI	AGTL	VAPSD	YRV	IGNAG	NWILFQ	HV	NGVT	IS	GGV	L	DQGT	GLWD	CK	SSGK
C.melo	69	FYVQ	S	N	F	I	G	P	C	N	Y	N	S	I	T	E	L	I	G
																			SG
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS
																			IG
																			AT
																			CS

Figura 24. Alinhamento das seqüências parciais de aminoácidos deduzidas das seqüências dos genes que codificam a enzima poligalaturonase de mamão papaia (*C.papaya*), *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana*), cenoura (*D.carota*), tomate (*L.esculentum*), pêra (*P.cummunis*) e melão (*C.melo*). Os aminoácidos idênticos estão destacados em fundo preto e letra branca, os aminoácidos similares estão destacados em fundo cinza e letra branca e os aminoácidos similares não destacados em fundo branco e letra preta. O domínio conservado das enzimas glicosil-hidrolases da família 28 está sublinhado.

A tentativa de alinhamento das proteínas truncadas deduzidas das outras duas seqüências parciais de poligalaturonase de mamão papaia depositadas no GenBank (números de acesso [CAA69207](#) e [CAD44275](#)) com a seqüência da

proteína deduzida do gene *CpPG*, resultou em baixa similaridade entre elas, principalmente no domínio conservado entre as várias poligalacturonases já isoladas. Com base no alinhamento de aminoácidos de seqüências de outras espécies vegetais, uma árvore filogenética foi traçada utilizando a ferramenta ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994), disponível do endereço eletrônico <http://align.genome.jp/>. Como pode ser observado na **Figura 25**, a seqüência de poligalaturonase de mamão papaia *CpPG* se assemelha àquelas de frutos e leguminosas, porém se distancia de uma das seqüências de mamão papaia (CAD:44275) previamente depositadas no banco de dados, indicando que a enzima *CpPG* isolada no projeto representa uma nova seqüência da enzima endo-PG de mamão papaia, apesar da aparente divergência com as outra seqüências de mamão. Esse é um resultado bastante interessante, uma vez que essa seqüência corresponde a um gene fortemente induzido durante o amadurecimento e que pode ter relação direta com o amaciamento da polpa. Além disso, as demais seqüências de poligalacturonases foram depositadas por outros autores em 2003 e 2005 e, além de parciais, ainda não resultaram em dados publicados.

A análise da árvore filogenética permitiu observar também a proximidade da enzima do fruto traduzida pelo gene *CpPG* com a da planta *Arabidopsis thaliana*, ambas espécies pertencentes à mesma ordem filogenética (*Brassicales*), como discutido no **Capítulo 5** para a análise por *XSpecies Microarray*. Esse resultado confirma ainda mais a proximidade das duas espécies, o que pode auxiliar nos estudos com o mamão papaia, uma vez que os dados sobre a planta-modelo são muito bem estudados e muito mais abundantes.

Figura 25. Filograma mostrando a relação entre a proteína predita do gene *CpPG* e outras poligalaturonases. A árvore filogenética foi calculada utilizando o programa ClustalW baseada no alinhamento dos aminoácidos deduzidos de cada gene. As seqüências já depositadas no banco de dados de algumas poligalacturonases utilizadas para a comparação foram: *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana*, NP_191544), damasco (*P.persica*, AAC64184), pêra (*P.communis*, CAH18935), cenoura (*D.carota*, BAC87792), tomate (*L.esculentum*, AAC28947), melão (*C.melo*, AAC26510), arroz (*O.sativa*, NP_001043617), morango (*F.ananassa*, AAP37458), dois tipos de nabo (*B.napus*, AAP37458 e *B.rapa*, CAD21651), uva (*V.vinifera*, AAK81876) e mamão papaia (CAD:44275).

7.6. CONCLUSÃO

O gene *CpPG* isolado de mamão papaia, correspondente a uma provável endo-PG, pode ter papel fundamental no amolecimento da polpa dos frutos. Esse é o primeiro relato de isolamento da seqüência de cDNA completa desse tipo de gene de mamão, uma vez que os anteriormente depositados no GenBank estavam

incompletos. O gene *CpPG* pareceu ser etileno-responsível, e os níveis de transcritos e atividade estiveram fortemente relacionados com a diminuição da textura da polpa. Além disso, as análises das seqüências sugeriram uma destinação extra-celular para a enzima, o que torna ainda mais provável relacionar esse gene com a principal enzima hidrolítica de constituintes de parede celular e lamela média, amolecendo a polpa e afetando assim a qualidade pós-colheita do mamão papaia.

7.7. AGRADECIMENTOS

À aluna Graziela Conti pela ajuda nas medidas de atividade da enzima poligalacturonase.

7.8. REFERÊNCIAS

- Ali Z.M., Chin L.H., Lazan H. A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits. *Plant Science*, v. 167: p. 317-327, 2004;
- Ali Z.M., Ng S.Y., Othman R., Goh L.Y., Lazan H. Isolation, characterization and significance of papaya beta-galactanases to cell wall modification and fruit softening during ripening. *Physiologia Plantarum*, v. 104: p. 105-115, 1998;
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215: p. 403-407, 1990;
- Bendtsen, J. D.; Nielsen, H.; von Heijne, G.; Brunak, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal Molecular Biology*, v. 340: p. 783-795, 2004;
- Brett C, Waldron K. Physiology and Biochemistry of plants cell walls. London. Unwin Hyman, p. 194, 1996;
- Brummell D.A., Harpster M.H. Cell Wall Metabolism in Fruit Softening and Quality and Its Manipulation in Transgenic Plants. *Plant Molecular Biology*, v. 47: p. 311-340, 2001;

- Carpita NC, Gibeaut DM. structural models of primary cell walls in flooring plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.*, v. 3: p. 1-30, 1993;
- Chen Y.T., Lee Y.R., Yang Y.T., Wang Y.T., Yang S.F., Shaw J.F. A novel ACC oxidase gene (CO-ACO2) associated with late stage fruit ripening and leaf senescence. *Plant Science*, v. 164: p. 531-540, 2003;
- Emanuelsson, O.; Nielsen, H.; Brunak, S.; von Heijne, G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.*, v. 300; p. 1005-1016, 2000;
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press, p. 571-607, 2005;
- Honda S., Nichimura Y, Takahashi M, Chiba H, Kakei K. A Manual Method for the Spectrophotometric Determination of Reducing Carbohydrates with 2-cyanoacetamide. *Analytical Biochemistry*, v. 19: p. 194-199, 1982;
- Karakurt Y., Huber D.J. Activities of Several Membrane and Cell-wall Hydrolases, Ethylene Biosynthetic Enzymes, and Cell Wall Polyuronide Degradation during Low-temperature Storage of Intact and Fresh-cut Papaya (*Carica papaya*) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, v. 28: p. 219-229, 2003;
- Lazan H., Ng S.Y., Goh L.Y., Ali Z.M. Papaya beta-galactosidase/galactanase isoforms in differential cell wall hydrolysis and fruit softening during ripening. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 42: p. 847-853, 2004;
- Lazan H., Selamat M.K., Ali Z.M. Beta-galactosidase, polygalacturonase and pectinesterase in differential softening and cell-wall modification during papaya fruit ripening. *Physiologia Plantarum*, v. 95: p. 106-112, 1995;
- López-Gómez R., Gómez-Lim M.A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *Hortscience*, v. 27: p. 440-442, 1992;
- Marchler-Bauer A., Anderson J., Cherukuri P., DeWeese-Scott C., Geer L., Gwadz M., He S., Hurwitz D., Jackson J., Ke Z., Lanczycki C., Liebert C., Liu C., Lu F., Marchler G., Mullokandov M., Shoemaker B., Simonyan V., Song J., Thiessen P., Yamashita R., Yin J., Zhang D., Bryant S. CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res.*, v. 3: p. 192-196, 2005;

- Othman R., Choo T.S., Ali Z.M., Zainal Z., Lazan H. A full-length beta-galactosidase cDNA sequence from ripening papaya. *Plant Physiology*, v. 118: p. 1102, 1998;
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York USA, 1989;
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS*, v. 74: p. 5463-5467, 1977;
- Seymour G., Taylor J., Tucker G. Biochemistry of fruit ripening. Chapman & Hall, London, 1993;
- Soh C.P., Ali Z.M., Lazan H. Characterisation of an alpha-galactosidase with potential relevance to ripening related texture changes. *Phytochemistry*, v. 67: p. 242-254, 2006;
- Taylor J. and Tucker G. Fruit Ripening In: Biochemistry of Plants, Tucker G. and Grierson D., Chapman & Hall, London. P. 1-51, 1987;
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, v. 22: p. 4673-4680, 1994;
- Yong W.D., Link B., O'Malley R., Tewari J., Hunter C.T., Lu C.A., Li X.M., Bleecker A.B., Koch K.E., McCann M.C., McCarty D.R., Patterson S.E., Reiter W.D., Staiger C., Thomas S.R., Vermerris W., Carpita N.C. Genomics of plant cell wall biogenesis. *Planta*, v. 221: p. 747-751, 2005.

CAPÍTULO 8

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

As análises da expressão gênica durante o amadurecimento do mamão papaia culminaram no isolamento de seqüências parciais de vários genes com variação de expressão, e que podem estar relacionados com a qualidade pós-colheita do fruto. Para isso, foram empregadas três diferentes técnicas de análise da expressão diferencial de genes, as quais, apesar das limitações individuais, geraram resultados que podem ser considerados complementares e contribuem para o estabelecimento de um panorama da expressão gênica que pode ser relacionado com a qualidade pós-colheita do mamão papaia. Ao longo do desenvolvimento do projeto foram empregadas técnicas em nível crescente de complexidade, sendo que a análise por *XSpecies Microarray* só foi possível por meio de um estágio no exterior entre os meses de Maio e Novembro de 2006, na Universidade de *Nottingham*, Reino Unido, sob supervisão do Dr. Graham B. Seymour.

Além disso, com base na experiência alcançada pelo grupo do Dr. Seymour no estudo do controle genético do amadurecimento, em tomates, também foram iniciados estudos relativos ao isolamento de potenciais fatores de transcrição do mamão papaia (*CpSPL*, *PAGL1* e *PAP1*), considerados ortólogos de genes regulatórios previamente caracterizados em tomate. Essa é uma abordagem inovadora e interessante e sabe-se que, ao menos em tomates, um desses fatores de transcrição está relacionado com a síntese de carotenóides e metabolismo da lamela média, o que também pode ser válido para o mamão. Além disso, os genes *PAGL1* e *PAP1* apresentaram diferenças de expressão durante o amadurecimento

do mamão papaia, e a comparação da expressão dos genes de enzimas pontuais com a expressão desses fatores de transcrição pode contribuir futuramente para o descobrimento de sinalizações moleculares atribuídas às mudanças ocasionadas pelo amadurecimento do mamão papaia. Possíveis estudos de expressão gênica, utilizando o sistema *VIGS* (*Virus Induced Gene Silence*), podem contribuir para o entendimento da funcionalidade desses fatores de transcrição e da relação entre suas funções com a qualidade pós-colheita do mamão papaia.

Com relação às técnicas de análise diferencial da expressão gênica utilizadas nessa tese, é possível fazer algumas considerações que podem ser úteis no desenvolvimento de outros estudos do amadurecimento de frutos, como resumido na tabela seguinte.

Tabela 6. Comparação das técnicas de análise de expressão gênica empregadas no trabalho.

TÉCNICA	HABILIDADE	TEMPO	\$\$\$
<i>DD-PCR</i>	+	++++	++
<i>cDNA-AFLP</i>	++	++++	++
<i>XSpecies</i>	+++	+	++++++

A técnica *Differential Display-PCR* não demandou muitos gastos e foi relativamente simples, porém apresentou um demasiado tempo de análise além de baixa reprodutibilidade e muitos falsos positivos. Em razão disso, outra técnica (*Northern Blot* Reverso) se fez necessária para a confirmação da expressão diferencial dos fragmentos isolados. Apesar do grande número de combinações de *primers* utilizados, foram isolados, clonados e seqüenciados 17 fragmentos diferencialmente expressos, dos quais três apresentaram identidade provável e

funções que podem estar relacionadas com a qualidade pós-colheita dos frutos. Analisando-se o número total de fragmentos amplificados pela técnica com os fragmentos potencialmente relacionados com a qualidade pós-colheita, a *DD-PCR* apresentou uma eficiência de 16,7%. Esse número não difere muito do que é apresentado na literatura a respeito da *DD-PCR* e, no entanto, rendeu um resultado extremamente interessante para o projeto. Um dos três fragmentos isolados correspondeu a uma endo-PG que, além de inédita, parece guardar relação estreita com o climatério e, principalmente, com o amaciamento da polpa dos frutos. Considerando o propósito do projeto, de buscar seqüências de genes que podem ser relevantes para a qualidade pós-colheita do mamão, a aplicação da *DD-PCR*, apesar de pouco eficiente, foi muito produtiva.

A técnica *cDNA-AFLP* também não apresentou alto custo, porém demandou um maior domínio das técnicas de biologia molecular além de um demasiado tempo de análise. Até o momento, a *cDNA-AFLP* permitiu o isolamento, clonagem e seqüenciamento de 82 fragmentos diferencialmente expressos, dos quais 23 deles apresentaram identidade provável e funções que podem estar relacionadas com a qualidade pós-colheita dos frutos. Dessa maneira, a técnica de *cDNA-AFLP* apresentou uma eficiência de aproximadamente 28% na tentativa de isolamento de genes relacionados à qualidade pós-colheita do mamão papaia. É provável que esse número seja bastante ampliado, uma vez que os 82 fragmentos analisados constituem pouco mais de 15% do total de fragmentos derivados de transcritos já isolados dos géis e que ainda não foram seqüenciados. Apesar de nenhuma das seqüências isoladas por *cDNA-AFLP* ter merecido uma análise mais aprofundada, e resultado em informações interessantes, como aquelas originadas da endo-PG, os resultados obtidos até o momento permitem recomendar fortemente seu uso como

alternativa à *DD-PCR*. A *cDNA-AFLP* resultou em maior número de fragmentos derivados de transcritos e menor número de falsos positivos.

Em contraposição a essas técnicas mais simples, mencionadas anteriormente, a *XSpecies Microarray* apresentou um tempo de análise curto, porém apresentou um custo mais elevado e um maior domínio das técnicas de biologia molecular, além de disponibilidade de equipamentos específicos. Utilizando um limiar de *threshold* 200 (*mask200*) e probabilidade $p < 0,05$, a técnica permitiu a identificação de 163 genes diferencialmente expressos durante o amadurecimento, dentre eles 24 genes que podem ter uma relação mais estreita com a qualidade pós-colheita do mamão papaia, apresentando uma eficiência de 15%. Esses resultados ainda são de alcance limitado, uma vez que, como comentado no **Capítulo 5**, são necessários mais experimentos. Contudo, mostram o potencial de aplicação dessa técnica no estudo do amadurecimento do mamão papaia que, em razão da relativa proximidade filogenética com *Arabidopsis thaliana*, pode se beneficiar da disponibilidade de chips comerciais e amplo acervo de dados de seqüências gênicas. Os dados obtidos podem ser tomados como um exemplo bem-sucedido da aplicação da *XSpecies Microarray* e encorajam fortemente a continuidade desse tipo de estudo em mamões.

O conjunto de resultados apresentados nessa tese constitui uma tentativa bem-sucedida de iniciar o mapeamento de genes com expressão alterada durante o amadurecimento do mamão papaia. O seqüenciamento dos fragmentos já isolados e a caracterização da expressão dos respectivos genes constituem um amplo manancial a ser explorado, o que contribuirá para ampliar o entendimento acerca das bases moleculares da qualidade do mamão papaia.

APÊNDICE

Tabela 7. Prováveis genes com expressão > 1,5 vezes nos frutos verdes obtidos com *mask200*.

Número do <i>probe set</i>	Provável identidade	Intensidade Verde*	Intensidade Maduro*	Teste $t^{\dagger}$
244963_at	<i>PSII cytochrome b559</i>	12,5	6,2	0,034
244969_at	<i>ribosomal protein S18</i>	18,5	8,8	0,020
244976_at	<i>cytochrome B6</i>	17,9	11,3	0,021
244997_at	<i>RNA polymerase beta subunit-2</i>	19,2	12,6	0,019
245002_at	<i>PSII D2 protein</i>	21,5	13,9	0,016
245003_at	<i>PSII 43 KDa protein</i>	20,1	8,0	0,018
245006_at	<i>PSI P700 apoprotein A2</i>	21,7	12,8	0,016
245012_at	<i>NADH dehydrogenase D3</i>	9,6	5,0	0,050
245013_at	<i>ATPase epsilon subunit</i>	108,6	60,0	0,002
245014_at	<i>ATPase beta subunit</i>	31,4	17,8	0,010
245023_at	<i>PSII I protein</i>	17,1	5,2	0,022
246131_at	<i>MOLYBDOPTERIN BIOSYNTHESIS CNX1 PROTEIN ; supported by cDNA: gi_1263313_gb_L47323.1_ATHCNX1R</i>	9,8	3,8	0,048
247043_at	<i>protein kinase, 41K (EC 2.7.1.-) (pir S71172) ; supported by cDNA: gi_166818_gb_L05562.1_ATHPROKINB</i>	11,9	3,1	0,037
247055_at	<i>putative protein similar to unknown protein (emb CAB81597.1)</i>	10,1	6,7	0,046
247655_at	<i>zinc finger protein Zat12 ;supported by full-length cDNA: Ceres:40576.</i>	11,5	6,6	0,039
247856_at	<i>receptor-like protein kinase</i>	22,9	3,4	0,015
248464_at	<i>putative protein similar to unknown protein (gb AAF43949.1)</i>	9,6	6,0	0,049
249957_at	<i>putative protein predicted proteins, Arabidopsis thaliana;supported by full-length cDNA: Ceres:37828.</i>	10,7	5,0	0,043
250977_at	<i>importin alpha - like protein importin alpha, Oryza sativa, EMBL:AB006788</i>	13,7	6,6	0,030

251016_at	<i>pathogenesis related protein - like pathogenesis-related protein 1.2, Triticum aestivum, EMBL:AJ007349)</i>	12,6	4,2	0,034
252720_at	<i>putative protein predicted protein, Arabidopsis thaliana</i>	12,7	7,1	0,033
252767_at	<i>ring-box protein-like ring-box protein 1 - Homo sapiens, EMBL:AF140598</i>	10,5	3,7	0,044
253099_s_at	<i>peroxidase - like protein peroxidase, Arabidopsis thaliana, gb:X98314</i>	10,2	5,3	0,045
253745_at	<i>putative protein the C-terminus of the RNA-directed DNA polymerase - Arabidopsis thaliana retrotransposon Ta11-1, PIR2:S65812</i>	13,2	7,6	0,032
255627_at	<i>Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 93818.</i>	18,6	7,0	0,020
257484_at	<i>unknown protein</i>	10,0	5,8	0,047
257804_at	<i>protein kinase, putative similar to somatic embryogenesis receptor-like kinase GB:AAB61708 from [Daucus carota]</i>	9,9	6,3	0,047
257885_at	<i>S1 self-incompatibility protein, putative similar to S1 self-incompatibility protein GB:CAA52380 [Papaver rhoeas] (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91 (6), 2265-2269 (1994))</i>	11,2	4,7	0,040
259589_at	<i>unknown protein</i>	16,8	1,1	0,023
259678_at	<i>putative 30S ribosomal protein S13 similar to putative 30S ribosomal protein S13, chloroplast precursor GB:P42732 [Arabidopsis thaliana]</i>	22,3	9,5	0,016
260419_at	<i>putative protein kinase contains Pfam profile: PF00069 Eukaryotic protein kinase domain</i>	10,2	5,5	0,045
261248_at	<i>calreticulin, putative similar to GB:AAF06346 from [Vitis vinifera]</i>	23,0	5,4	0,015
263538_at	<i>hypothetical protein predicted by genefinder;supported by full-length cDNA: Ceres:119045.</i>	13,2	3,9	0,032
264325_at	<i>putative phosphoribosylanthranilate transferase</i>	12,4	3,8	0,035
265585_at	<i>CDC27/NUC2-like protein TPR-repeat protein</i>	11,5	5,0	0,038
266175_at	<i>NAM (no apical meristem)-like protein</i>	18,1	10,9	0,021
266464_at	<i>glutathione-conjugate transporter AtMRP4 identical to GB:AJ002584; supported by cDNA: gi_7716582_gb_AF243509.1_AF243509</i>	9,6	4,0	0,050
266601_at	<i>hypothetical protein predicted by genscan</i>	9,6	4,1	0,050

*Intensidade média dos PM e MM dos *probe-pairs* de cada *probe set*.

†Teste paramétrico de probabilidade do tipo *Student* utilizando os frutos verdes e maduros.

Tabela 8. Prováveis genes com expressão > 1,5 vezes nos frutos verdes obtidos com *mask200*.

Número do <i>probe-set</i>	Provável identidade	Intensidade Verde*	Intensidade Maduro*	Teste $t^{\dagger}$
244920_s_at	<i>NADH dehydrogenase subunit 3 Protein sequence</i>	10,1	16,0	0,019
244970_at	<i>ribosomal protein L20</i>	9,5	14,3	0,022
244978_at	<i>RNA polymerase alpha subunit</i>	17,5	31,7	0,007
245048_at	<i>orf within trnK intron</i>	11,6	19,8	0,014
245164_at	<i>mitochondrial chaperonin (HSP60)</i>	13,3	28,2	0,009
245199_at	<i>Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 7434.</i>	14,9	23,1	0,011
245576_at	<i>hypothetical protein</i>	10,6	20,0	0,014
259678_at	<i>putative 30S ribosomal protein S13, chloroplast precursor GB:P42732 [Arabidopsis thaliana]</i>	5,5	10,3	0,034
246018_at	<i>Expressed protein; supported by full-length cDNA: Ceres: 103171.</i>	5,5	16,7	0,017
246146_at	<i>receptor-like protein kinase, Arabidopsis thaliana, EMBL:M84659;supported by full-length cDNA: Ceres:206658.</i>	6,9	15,1	0,020
246156_at	<i>putative protein predicted proteins from various species; supported by full-length cDNA: Ceres: 17786.</i>	10,8	24,4	0,011
246189_at	<i>ABI3-interacting protein 2;supported by full-length cDNA: Ceres:30983.</i>	13,8	38,2	0,006
246391_at	<i>unknown protein ; supported by cDNA: gi_16648790_gb_AY058172.1_</i>	4,3	8,3	0,046
246400_at	<i>hypothetical protein contains similarity to T-box domain GI:5931592 from [Cynops pyrrhogaster]</i>	9,9	18,1	0,016
246512_at	<i>putative phytochelatin synthetase - Arabidopsis thaliana, EMBL:AJ006787</i>	17,3	34,1	0,007
247212_at	<i>putative protein similar to unknown protein (gb AAF17687.1);supported by full-length cDNA: Ceres:250647.</i>	1,9	7,9	0,050
247350_at	<i>unknown protein</i>	2,4	9,5	0,038
247363_at	<i>unknown protein</i>	28,4	54,5	0,004
247596_at	<i>putative protein predicted protein, Drosophila melanogaster</i>	6,0	9,5	0,038
247638_at	<i>arabinogalactan protein - Pop14A9, Populus alba x Populus tremula, EMBL:AF183809;supported by full-length cDNA: Ceres:15239.</i>	5,7	15,3	0,020
247770_at	<i>putative protein predicted proteins, Arabidopsis thaliana</i>	31,5	55,6	0,004

247840_at	putative protein protein x 0001, Homo sapiens, EMBL:AF117231	17,0	31,2	0,008
247900_at	60S acidic ribosomal protein P3; supported by full-length cDNA: Ceres: 8695.	5,3	11,2	0,030
248103_at	ubiquitin-like protein SMT3-like ; supported by full-length cDNA: Ceres: 13697.	5,8	13,2	0,024
248252_at	putative protein similar to unknown protein (emb CAB71094.1)	3,7	12,9	0,025
248256_at	developmental protein SINA (seven in absentia)	6,9	12,8	0,025
248340_at	putative protein similar to unknown protein (dbj BAA83359.1)	5,7	8,7	0,044
248350_at	putative protein similar to unknown protein (sp Q38737); supported by full-length cDNA: Ceres: 6760.	5,1	16,5	0,018
248469_at	putative protein similar to unknown protein (pir T07182)	3,3	8,7	0,043
248718_at	farnesyl diphosphate synthase precursor (gb AAB49290.1); supported by cDNA: gi_1872499_gb_U80605.1_ATU80605	5,7	12,4	0,026
248780_at	4-nitrophenylphosphatase-like protein; supported by full-length cDNA: Ceres:37055.	20,3	34,6	0,007
249003_at	putative protein contains similarity to small nuclear ribonucleoprotein; supported by full-length cDNA: Ceres: 10879.	4,7	11,8	0,028
249078_at	phytochelatin synthase (gb AAD41794.1); supported by cDNA: gi_14532653_gb_AY039951.1_	5,0	9,0	0,041
249267_at	putative protein contains similarity to 24 kDa seed maturation protein; supported by cDNA: gi_14334529_gb_AY035169.1_	5,7	14,0	0,022
249541_at	anthranilate N-benzoyltransferase -like protein anthranilate N-benzoyltransferase (EC 2.3.1.144), clove pink, PIR:T10717	70,9	118,2	0,001
249555_at	putative protein predicted protein, rice; supported by full-length cDNA: Ceres:206856.	11,7	17,8	0,016
249587_at	putative protein copper homeostasis factor, Arabidopsis thaliana, PIR:T47741	19,2	31,0	0,008
249658_s_at	N-glyceraldehyde-2-phosphotransferase-like	9,0	17,2	0,017
249830_at	dihydroorotate dehydrogenase precursor (dihydroorotate oxidase) (sp P32746) ; supported by cDNA: gi_16448_emb_X62909.1_ATPYRD	6,2	11,9	0,028
250113_at	putative protein similar to unknown protein (pir T01798)	17,0	39,6	0,006
250211_at	unknown protein; supported by cDNA: gi_15215581_gb_AY050319.1_	5,0	8,2	0,048
250224_at	putative protein similar to unknown protein (emb CAB87702.1); supported by full-length cDNA: Ceres:105472.	7,6	13,3	0,024
250409_at	putative protein 110K5.11, unknown protein, Sorghum bicolor, EMBL:AF124045; supported by cDNA: gi_13605727_gb_AF361845.1_AF361845	12,8	24,8	0,010
250667_at	40S ribosomal protein S4 ; supported by full-length cDNA: Ceres:13813.	33,8	66,5	0,003
250958_at	laccase precursor - like laccase precursor, common tobacco, PIR:JC5229	4,4	16,4	0,018

250961_at	<i>putative protein various predicted proteins, Arabidopsis thaliana</i>	6,3	23,4	0,011
250962_at	<i>putative protein various predicted proteins, Arabidopsis thaliana</i>	4,3	8,0	0,049
250983_at	<i>putative protein In2, Zea mays, EMBL:X58573</i>	4,6	8,3	0,047
251103_at	<i>putative protein protein phosphatase type 2C - Saccharomyces cerevisiae, EMBL:U72346</i>	3,6	8,3	0,047
251220_at	<i>cytochrome c oxidase subunit 5c-like - Oryza sativa, EMBL:AB027123;supported by full-length cDNA: Ceres:14169.</i>	6,5	11,7	0,028
251429_at	<i>dynamain-like protein 4 (ADL4) ; supported by cDNA: gi_6651400_gb_AF180733.1_AF180733</i>	10,5	32,7	0,007
251442_at	<i>putative protein multisynthetase complex auxiliary component p43 - Cricetulus griseus, EMBL:AF021800;supported by full-length cDNA: Ceres:28016.</i>	37,7	59,7	0,003
251529_at	<i>ATP-dependent RNA helicase-like - Xenopus laevis, PIR:S13654;supported by full-length cDNA: Ceres:4158.</i>	7,9	29,5	0,008
251556_at	<i>putative protein predicted proteins, Methanococcus janaschi;supported by full-length cDNA: Ceres:7883.</i>	8,8	14,7	0,021
251926_at	<i>60S RIBOSOMAL PROTEIN L36 homolog - Schizosaccharomyces pombe, swissprot:Q92365;supported by full-length cDNA: Ceres:267357.</i>	3,6	8,7	0,043
251944_at	<i>ABC transporter -like protein breast cancer resistance protein (BCRP), Homo sapiens, EMBL:AF098951</i>	5,2	8,6	0,044
252005_at	<i>purple acid phosphatase-like protein, Glycine max, EMBL:AF200824</i>	4,9	22,0	0,012
252016_at	<i>putative protein predicted protein, Arabidopsis thaliana</i>	8,6	13,1	0,024
252049_at	<i>putative protein putative and hypothetical proteins in Arabidopsis thaliana</i>	3,6	8,6	0,044
252106_at	<i>putative glutamate receptor putative GLR2, Arabidopsis thaliana, EMBL:AF079999</i>	14,2	28,8	0,008
252394_at	<i>heat shock protein-like hsp40, Homo sapiens, PIR2:JN0912</i>	7,2	13,5	0,023
252442_at	<i>dUTP pyrophosphatase-like protein - Lycopersicon esculentum,PIR2:JQ1599; supported by cDNA: gi_13878142_gb_AF370334.1_AF370334</i>	6,6	11,7	0,028
252502_at	<i>copper transport protein - like protein Arabidopsis thaliana,PID:g1082054</i>	6,6	10,5	0,033
252643_at	<i>acidic ribosomal protein P2 -like, maize, PIR:S54179</i>	8,1	14,0	0,022
252926_at	<i>H⁺-transporting ATPase 16K chain P2, vacuolar; supported by full-length cDNA: Ceres:31833.</i>	32,1	72,2	0,003
252943_at	<i>cinnamyl-alcohol dehydrogenase CAD1 ;supported by full-length cDNA: Ceres:34593.</i>	9,5	34,3	0,007
253056_at	<i>SHORT-ROOT (SHR)</i>	0,7	11,3	0,030
253200_at	<i>vacuolar H⁺-transporting ATPase 16K chain ;supported by full-length cDNA: Ceres:24998.</i>	42,6	73,2	0,003
253280_at	<i>poly(A)-binding protein non-consensus TA donor splice site at exon 2, polyadenylate-</i>	4,2	9,2	0,040

	<i>binding protein - Triticum aestivum (common wheat), PIR:T06979; supported by cDNA: gi_304108_gb_L19418.1_ATHPAB2A</i>			
253491_at	<i>RNA lariat debranching enzyme, Caenorhabditis elegans, PID:g1794215; supported by cDNA: gi_13877596_gb_AF370499.1_AF370499</i>	4,7	12,2	0,027
253606_at	<i>putative protein component of aniline dioxygenase (GMP synthase like protein - Acinetobacter sp., PID:d1013698; supported by full-length cDNA: Ceres: 37987.</i>	6,3	10,5	0,033
253759_at	<i>AIM1 protein ; supported by cDNA: gi_16648890_gb_AY059815.1_</i>	111,8	240,5	0,001
253849_at	<i>putative protein 150-kD protein, Dictyostelium discoideum, gb:U49332</i>	4,4	8,7	0,043
253918_at	<i>putative protein; supported by full-length cDNA: Ceres: 10313.</i>	11,6	17,5	0,016
254164_at	<i>putative protein; supported by full-length cDNA: Ceres:20769.</i>	5,2	8,7	0,044
254180_at	<i>putative protein hin1 protein homolog, Oryza sativa, PIR:T02662</i>	58,1	88,0	0,002
254370_at	<i>L1 specific homeobox gene ATML1/ovule-specific homeobox protein A20</i>	3,0	8,0	0,049
254376_at	<i>putative protein; supported by cDNA: gi_15028268_gb_AY046049.1_</i>	2,8	8,1	0,048
254954_at	<i>hypothetical protein; supported by full-length cDNA: Ceres:1732.</i>	6,4	10,4	0,034
255546_at	<i>putative CHP-rich zinc finger protein similar to several A. thaliana CHP-rich proteins</i>	1,6	8,7	0,044
255576_at	<i>predicted protein of unknown function similar to F3D13.4 similar to M. truncatula MtN21, GenBank accession number Y15293; supported by full-length cDNA: Ceres:40560.</i>	12,3	67,7	0,003
255656_at	<i>putative protein (fragment) DNA-binding protein PD3, chloroplast - Pisum sativum, PID:e274741</i>	13,8	26,2	0,010
256098_at	<i>unknown protein similar to 6-phosphogluconolactonase-like protein GI:10177902 from [Arabidopsis thaliana]</i>	4,5	12,0	0,027
256141_at	<i>lysine and histidine specific transporter, putative similar to lysine and histidine specific transporter GI:2576361 from [Arabidopsis thaliana]</i>	4,9	9,0	0,041
256196_at	<i>hypothetical protein predicted by genemark.hmm</i>	22,7	44,6	0,005
256274_at	<i>GTPase, putative contains Pfam profile: PF01926 GTPase of unknown function</i>	6,6	12,8	0,025
256452_at	<i>hypothetical protein predicted by genemark.hmm; supported by full-length cDNA: Ceres:10873.</i>	50,7	77,7	0,002
256609_at	<i>hypothetical protein predicted by genemark.hmm</i>	10,9	20,2	0,014
256631_at	<i>At14a-like protein similar to At14a protein GB:AAD26355 GI:4589123 [Arabidopsis thaliana]</i>	9,1	16,5	0,018
256650_at	<i>hypothetical protein contains similarity to transporter proteins; supported by cDNA: gi_15810468_gb_AY056273.1_</i>	5,0	8,4	0,045
256696_at	<i>unknown protein</i>	9,5	16,0	0,018
256706_at	<i>auxin-independent growth promoter, putative similar to GB:A44226 from [Nicotiana</i>	3,0	8,0	0,049

	<i>tabacum</i>] (Science 258 (5086), 1350-1353 (1992))			
256977_at	hypothetical protein predicted by genemark.hmm, similar to putative retroelement pol polyprotein GB:AAD17409 from <i>[Arabidopsis thaliana]</i>	4,2	11,6	0,029
257038_at	longevity factor-like protein similar to LAG1Ce-1 GB:AAD16893 from <i>[Caenorhabditis elegans]</i> ; supported by full-length cDNA: Ceres:123372.	4,1	12,7	0,025
257319_at	hypothetical protein	11,6	20,5	0,013
257339_s_at	ATP synthase subunit 9	9,4	22,1	0,012
257608_at	longevity factor-like protein similar to LAG1Ce-1 GB:AAD16893 from <i>[Caenorhabditis elegans]</i> ; supported by full-length cDNA: Ceres:123372.	8,5	16,1	0,018
257766_at	chaperonin, putative similar to CHAPERONIN CPN60-2, MITOCHONDRIAL PRECURSOR GB:Q05046 from <i>[Cucurbita maxima]</i> ; supported by full-length cDNA: Ceres:38045.	3,9	8,1	0,048
257821_at	Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 7337.	5,6	12,8	0,025
257822_at	rotamase FKBP (ROF1) identical to rotamase FKBP (ROF1) GB:U49453 <i>[Arabidopsis thaliana]</i> ; supported by cDNA: gi_1354206_gb_U49453.1_ATU49453	4,0	9,6	0,038
257863_at	hypothetical protein similar to GRAB1 protein GB:CAA09371 <i>[Triticum sp.]</i>	1,4	11,0	0,031
258618_at	Expressed protein; supported by cDNA: gi_1289319_gb_U53221.1_ATU53221	6,4	13,4	0,024
258634_at	putative RNA-binding protein contains Pfam profile: PF00076 RNA recognition motif. (a.k.a. RRM, RBD, or RNP domain)	8,9	13,8	0,023
258742_at	hypothetical protein predicted by genscan+; supported by full-length cDNA: Ceres:21672.	13,9	29,1	0,008
258776_at	putative T-complex protein 1, ETA subunit similar to T-complex protein 1, ETA subunit GB:P80313 <i>[Mus musculus]</i>	3,2	9,6	0,038
258814_at	putative short-chain type dehydrogenase/reductase similar to short-chain type dehydrogenase/reductase GB:Q08632 <i>[Picea abies]</i> ; supported by cDNA: gi_14326546_gb_AF385727.1_AF385727	4,9	8,6	0,044
259426_at	hypothetical protein contains similarity to 1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase (AtPIP5K1) GI:3702691 from <i>[Arabidopsis thaliana]</i>	1,3	8,3	0,047
259447_s_at	ADP-ribosylation factor, putative similar to ADP-ribosylation factor GI:166586 from <i>[Arabidopsis thaliana]</i>	10,1	15,2	0,020
259526_at	hypothetical protein	19,5	31,8	0,007
259576_at	RING zinc finger protein, putative contains Pfam profile: PF00097: Zinc finger, C3HC4 type (RING finger)	6,4	11,7	0,029
259674_at	thaumatin-like protein similar to thaumatin-like protein GB:AAB71214 <i>[Arabidopsis thaliana]</i> ; Pfam HMM hit: Thaumatin family	3,3	8,2	0,047
259840_at	photosystem I subunit VI precursor identical to photosystem I subunit VI precursor <i>[Arabidopsis thaliana]</i> GI:5734524; supported by full-length cDNA: Ceres:1440.	12,5	26,2	0,010

259926_at	putative DNA-3-methyladenine glycosylase I (TAG I) GB:P05100 [Escherichia coli]; supported by cDNA: gi_14334651_gb_AY034999.1	7,2	14,4	0,021
260392_at	putative enolase similar to ENOLASE (2-PHOSPHOGLYCERATE DEHYDRATASE) GB:P15007 from [Drosophila melanogaster]; supported by cDNA: gi_14334609_gb_AY034978.1	15,6	28,3	0,009
260424_at	putative receptor-like protein kinase contains Pfam profiles: PF00560 leucine rich repeat (5 copies), PF00069 eukaryotic protein kinase domain	71,6	108,0	0,002
260454_at	RING-H2 zinc finger protein (ATL3) GB:AF132013 (Arabidopsis thaliana); supported by cDNA: gi_4928396_gb_AF132013.1_AF132013	32,3	71,7	0,003
260577_at	hypothetical protein predicted by genefinder and genscan	4,1	12,5	0,026
260854_at	CCAAT-box binding factor HAP3 homolog identical to GB:AAC39488 GI:3282674 from [Arabidopsis thaliana]	5,1	9,1	0,041
260907_at	hypothetical protein predicted by genscan+	2,5	9,4	0,039
261125_at	zinc finger protein 2, putative similar to GB:AAD33770 from [Arabidopsis thaliana]; supported by cDNA: gi_15081720_gb_AY048253.1	3,3	8,1	0,048
261231_at	unknown protein ; supported by cDNA: gi_13605832_gb_AF367315.1_AF367315	27,1	61,9	0,003
261301_at	hypothetical protein predicted by genemark.hmm	8,7	20,5	0,013
261329_at	hypothetical protein predicted by genemark.hmm	6,6	11,1	0,031
261463_at	hypothetical protein predicted by genscan+	11,2	20,2	0,014
261489_at	hypothetical protein contains similarity to cytochrome c oxidase subunit I GI:5678701 from [Loligo pealei]; supported by full-length cDNA: Ceres: 314.	1,8	8,8	0,043
261560_at	acyl CoA thioesterase, putative similar to HIV-Nef GB:AAB71665 GI:2318125 from [Homo sapiens]	4,1	8,7	0,044
262399_at	unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:33047.	4,0	14,1	0,022
262419_at	hypothetical protein identical to hypothetical protein GB:AAD50051 GI:5734786 from [Arabidopsis thaliana]; supported by cDNA: gi_15081691_gb_AY048238.1	14,9	23,8	0,011
262443_at	Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 103581.	39,5	71,0	0,003
262483_at	putative translation initiation factor IF2 Except for first 311 amino acids, 41% identical to translation initiation factor IF2 [Bacillus subtilis] (gi 124209) Location of ests H3F7T7 (gb W43659), 173N7T7 (gb H36495), and 177D2T7 (gb H36282); supported by cDNA: gi_13605888_gb_AF367343.1_AF367343	5,0	8,3	0,047
262685_at	unknown protein ; supported by cDNA: gi_15724323_gb_AF412102.1_AF412102	4,4	8,6	0,044
263267_at	putative vacuolar proton-ATPase 16 kDa proteolipid identical to GB:L44581	48,6	87,2	0,002
263306_at	putative serine carboxypeptidase II	4,9	8,1	0,048

263443_at	<i>putative fatty acid elongase; supported by full-length cDNA: Ceres:115769.</i>	13,3	21,2	0,013
263945_at	<i>hypothetical protein predicted by genefinder</i>	5,7	10,1	0,035
264038_at	<i>putative ubiquinone biosynthesis protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:18785.</i>	10,7	21,5	0,012
264096_at	<i>Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 2681.</i>	20,8	32,6	0,007
264170_at	<i>Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 2681.</i>	6,9	12,4	0,026
264516_at	<i>unknown protein</i>	14,6	27,1	0,009
264606_at	<i>unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:98340.</i>	10,4	17,8	0,016
264850_at	<i>unknown protein similar to F5J6.8 and C. elegans C42D8.3;supported by full-length cDNA: Ceres:2578.</i>	63,2	100,5	0,002
264953_at	<i>alcohol dehydrogenase identical to alcohol dehydrogenase Gl:469467 from (Arabidopsis thaliana); supported by full-length cDNA: Ceres: 4033.</i>	16,5	32,2	0,007
265005_at	<i>Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 1860.</i>	6,9	19,2	0,014
265299_at	<i>putative retroelement pol polyprotein contains a Zn-finger CCHC type domain (prosite:QDOC50158) and a DDE integrase signature motif</i>	12,7	19,9	0,014
265772_at	<i>putative protein kinase contains a protein kinase domain profile (PDOC00100); supported by cDNA: gi_14335115_gb_AY037237.1_</i>	10,5	25,7	0,010
265900_at	<i>unknown protein</i>	19,7	44,3	0,005
266017_at	<i>unknown protein ; supported by cDNA: gi_14517479_gb_AY039575.1_</i>	7,8	12,5	0,026
266062_at	<i>putative diacylglycerol kinase</i>	6,0	9,5	0,038
266105_at	<i>putative transport protein SEC61 beta-subunit; supported by cDNA: gi_13878102_gb_AF370314.1_AF370314</i>	5,1	8,3	0,046
266125_at	<i>putative GATA-type zinc finger transcription factor</i>	7,4	14,9	0,020
266201_at	<i>similar to MtN3 protein;supported by full-length cDNA: Ceres:20810.</i>	6,4	12,7	0,025
266206_at	<i>unknown protein; supported by full-length cDNA: Ceres: 3359.</i>	11,7	18,2	0,016
266338_at	<i>putative ligand-gated ion channel subunit ; supported by cDNA: gi_6644387_gb_AF210701.1_AF210701</i>	8,1	12,8	0,025
266392_at	<i>late embryogenesis abundant M10 protein identical to GB:AF076979</i>	2,0	7,9	0,050
266603_at	<i>hypothetical protein predicted by genscan and genefinder</i>	6,8	10,4	0,034
267179_at	<i>putative ADP ribosylation factor 1 GTPase activating protein; supported by cDNA: gi_14334619_gb_AY034983.1_</i>	11,9	27,4	0,009
267235_at	<i>unknown protein</i>	28,8	75,9	0,003
267368_at	<i>citrate synthase similar to GB:X17528, supported by full-length cDNA: Ceres:16528.</i>	11,7	20,7	0,013

267378_at	<i>hypothetical protein</i>	7,7	12,3	0,027
267443_at	<i>hypothetical protein predicted by genefinder;supported by full-length cDNA: Ceres:248560.</i>	21,0	34,9	0,007
267526_at	<i>photosystem II reaction center 6.1KD protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:34999.</i>	5,5	9,5	0,038

*Intensidade média dos PM e MM dos *probe-pairs* de cada *probe set*.

†Teste paramétrico de probabilidade do tipo *Student* utilizando os frutos verdes e maduros.