

# Expressão transcricional da sacarose-fostato sintase e da ADP-glicose pirofosforilase em tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L.) armazenados sob diferentes condições de armazenamento

Inês Angélica Cordeiro Gomes<sup>1</sup>, Marcio Roggia Zanuzo<sup>2</sup>, César Valmor Rombaldi<sup>3</sup>, Eugenia Jacira Bolacel<sup>4</sup> e Marcos Antonio Bacarin<sup>5</sup>

## Introdução

A batata é a hortaliça de maior importância econômica no Brasil, sendo a fritura uma das formas preferenciais de preparo, tanto comercial quanto doméstica [1]. O armazenamento de tubérculos em baixas temperaturas inibe a brotação, reduz o ataque microbiano e a perda de peso [2]. Porém, essa condição de armazenamento resulta no acúmulo de açúcares redutores, o que deixa os tubérculos inadequados para produção de batata frita [3, 4].

Os açúcares redutores são suscetíveis, juntamente com as proteínas, à ocorrência de reação de Maillard que resulta no escurecimento não enzimático reduzindo a aceitação comercial [5].

A atividade de enzimas que atuam na rota dos açúcares tem mostrado um mecanismo de elucidação para tal fato. Quando os tubérculos de batata são expostos a baixas temperaturas (entre 8 e 10°C) verifica-se aumentos na atividade de algumas enzimas envolvidas na biodegradação do amido, bem como aumentos na atividade de enzimas envolvidas na síntese da sacarose. Com a biodegradação, comprova-se acúmulo de metabólitos, principalmente de sacarose e açúcares redutores (glicose e frutose). Dentre estas enzimas, estão a sacarose sintase (SS), a sacarose-fostato sintase (SFS), UDP-glicose pirofosforilase (UDPG-PPi), ADP-glicose pirofosforilase (ADPG-PPi) e a invertase ácida sóluvel. A SS pode atuar reversivelmente tanto na síntese como na hidrólise da sacarose, provavelmente participando da síntese de amido e de polissacarídeos da parede celular, hidrolisando a sacarose formada via fotossíntese e permitindo a formação de açúcares nucleotídeos como a ADP-glicose e UDP-glicose. A ADP-glicose pirofosforilase é a enzima-chave que regula a síntese de amido nos cloroplastos. Existem fortes evidências de que a síntese da sacarose é catalisada pela enzima sacarose-fostato sintase (SPS) [6, 7].

Este trabalho teve como objetivo verificar a expressão transcricional das enzimas ADP-glicose pirofosforilase (ADPG-PPi) e sacarose-fostato sintase (SPS) em

tubérculos de batata armazenados por 60 dias a 4°C.

## Material e Métodos

### A. Processamento dos tratamentos

Foi utilizado o clone C 1786-6-84 produzida no campo experimental da Embrapa-Clima Temperado, Pelotas-RS. Após a colheita, os tubérculos foram imediatamente transferidos para o Laboratório de Metabolismo Vegetal do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas, classificados e armazenados em câmara refrigerada com temperatura de 4°C, umidade relativa de aproximadamente 85%, em ausência de luz, onde permaneceram por 60 dias. Antes do armazenamento foram coletadas amostras para determinação das expressões transcricionais das enzimas ADP-glicose pirofosforilase (ADPG-PPi) e sacarose-fostato sintase (SPS) antes do armazenamento. Decorrido os 60 dias de armazenamento os tubérculos foram descascados, triturados e divididos em três sub-amostras de aproximadamente 10g de massa fresca, sendo as mesmas imediatamente congeladas e liofilizadas por aproximadamente 20 horas até obter massa constante.

### B. Extração de RNA e síntese de cDNA.

As amostras liofilizadas foram conduzidas ao Laboratório de Biotecnologia de Alimentos do Departamento de Ciências e Tecnologia Agroindustrial da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal de Pelotas para extração do RNA

Aproximadamente 3mg de amostra liofilizada foram transferidos para microtubos tipo eppendorf de 1,5mL, aos quais foram adicionados 800µl de Trizol<sup>®</sup> Reagent (GibcoBRL) e homogeneizados em aparelho Vortex<sup>®</sup> em capela de fluxo laminar. Em seguida, os microtubos foram mantidos em temperatura ambiente durante 5 minutos. Após este período, acrescentou-se 140µl de fenol-clorofórmio-isoamílico (24:25:1, v/v) e manteve-se o material em temperatura ambiente por 3 minutos. Centrifugaram-se os microtubos por 15 minutos à 12000

1. Estudante Doutorado PPG - Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Brasil, 96010-900. E-mail: iacgomes\_ib@ufpel.edu.br

2. Estudante Doutorado PPG - Ciências e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Brasil, 96010-900;

3. Prof. Titular, Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, DCTA/FAEM, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Brasil, 96010-900;

4. Prof. Adjunto, Laboratório de Cultura de Células e Tecidos de Plantas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Brasil, 96010-900;

5. Prof. Adjunto, Laboratório de Metabolismo Vegetal de Plantas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Brasil, 96010-900;

Apoio financeiro: CNPq e FAPERGS.

g a 4°C. A fase superior (sobrenadante) foi recuperada (aproximadamente 400µl), aos quais adicionaram-se 350µl de isopropanol gelado (-20°C), e aguardou-se 10 minutos à temperatura ambiente. Na seqüência, centrifugou-se por 10 minutos a 12000 g, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi recuperado com 800µl de etanol 75% (v/v) gelado (-20°C). Repetiu-se a centrifugação por 5 minutos a 10000 g. O sobrenadante foi eliminado e deixou-se o pellet secar. O pellet foi dissolvido em 50µl água ultra-pura estéril, previamente tratada com DEPC 0,01% (µ/v). Os microtubos foram incubados por 10 minutos a 55°C-60°C e em seguida, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 260nm e 280nm.

A reação de RT-PCR foi realizada utilizando-se amostras de mRNA extraídos dos tubérculos e oligonucleotídeos específicos para a ADPG-PPi e SPS, com auxílio do Kit comercial *Super Script™ First-Strand System for RT-PCR* (Invitrogen), segundo protocolo do fabricante.

Os oligonucleotídeos específicos para ADPG-PPi e SFS utilizados na reação de RT-PCR, foram definidos com auxílio do programa Clustal W, através do alinhamento de seqüências de 20-22 nucleotídeos das extremidades 5' e 3' de genes ortólogos. Verificou-se a viabilidade desses oligonucleotídeos relacionada à porcentagem de C/G, temperatura de anelamento (Tm) e ausência de auto-complementariedade. Estes oligonucleotídeos foram submetidos à confirmação de identidade com auxílio do programa BlastN, no banco de dados do NCBI e sintetizados pela Invitrogen® (Tab. 1).

O produto de amplificação obtido da reação de RT-PCR foi identificado por meio de eletroforese em gel de 0,7% agarose em tampão TBE 0,5x, submetido à corrente de 100 V por 50 minutos, tendo como marcador de peso molecular 1kb DNA ladder Invitrogen®, todos acrescidos de tampão de carregamento. As bandas foram visualizadas por meio de coloração com brometo de etídio (0,01 ng/µl) sobre luz ultravioleta.

## Resultados e Discussão

A análise espacial e temporal da transcrição é um aspecto preliminar importante na genômica funcional. A análise da expressão gênica em nível genômico consiste em diversas abordagens iniciais para a caracterização em larga escala das funções gênicas [8] Os resultados obtidos permitiram verificar que, por ocasião do armazenamento (60 dias a 4°C) não houve detecção de mRNAs da ADPG-PPi (Fig. 1, colunas 1 e 2). Após 60 dias de armazenamento a 4°C, houve expressão de mRNAs dessa enzima, indicando que as baixas temperaturas controlam a expressão deste gene (Fig. 1, colunas 3, 4 e 5). O fragmento de 250 kb era esperado em função dos oligonucleotídeos selecionados.

Quando se avaliou a expressão de SPS, verificou-se que, na instalação do experimento, houve detecção de mRNAs dessa proteína, embora em baixíssima intensidade (Fig. 2, colunas 1 e 2). Durante o armazenamento houve transcrição e, aos 60 dias a 4°C detectamos maiores quantidades de mRNAs dessa

enzima, gerando fragmentos de aproximadamente 500 kb, (Fig. 2, colunas 3 e 4).

Observa-se ainda que a SFS pode estar se expressando mesmo que em baixa expressão, antes do armazenamento. Porém, com a manutenção em baixa temperatura (4°C) por 60 dias, a expressão aumenta, contudo, em menor intensidade que o verificado para a ADPG-PPi (Fig. 1). Bassinello [9], determinando a distribuição de sacarose-fosfato sintase e sacarose sintase em bananas durante o amadurecimento, verificou que a atividade máxima da SPS ocorre aos 21 dias pós-colheita, coincidindo com o teor máximo de sacarose.

O fato de ter havido incremento de mRNAs de ADPG-PPi e de SPS durante o armazenamento, sugere que, nesse genótipo pode haver aceleração da bioconversão de amido em sacarose e em açúcares redutores.

## Agradecimentos

Os autores agradem ao MCT/CNPq e FAPERGS pelo financiamento do projeto e pela concessão de bolsa de estudo, e à Embrapa Clima Temperado (Dr. Arione da Silva Pereira) pelo fornecimento dos tubérculos.

## Referências

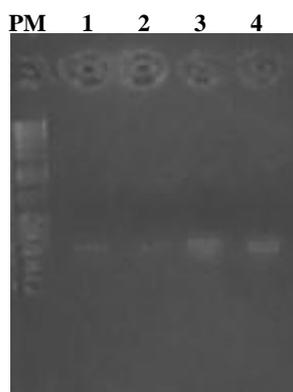
- [1] ZORZELLA, C. et al. 2003. Caracterização física, química e sensorial de genótipos de batata processados na forma de chips. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.6, p.15-24.
- [2] BREYNER P.; ZABEAU M. Genome wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes. *Curr Opin Plant Biol.* 4: 136-42.
- [3] BURTON, W. G. 1989. *The Potato*. Longman Scientific and Technical, Harlow. 742 p.
- [4] VLIET, W. F.; SCHRIEMER, W. H. 1960. The sugar accumulation of potatoes kept at low temperature, as studied in a small selection of samples of Dutch varieties. *European Potato Journal*, v.3, p.263-271.
- [5] DAVIES, H.V.; VIOLA, R. 1992. Regulation of sugar accumulation in stored potato tubers. *Postharvest News and Information*, v.3, p.97-100.
- [6] COELHO, A. R. et al. 1999. Qualidade de batata (*Solanum tuberosum* L.) para fritura, em função dos níveis de açúcares redutores e de amido, durante o armazenamento refrigerado e à temperatura ambiente com atmosfera modificada. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.23, n.4, p.899-910.
- [7] HUBBARD, N. L.; HUBER, S. C.; PHARR, D. M. 1989. Sucrose phosphate synthase and acid invertase as the determinants of sucrose concentration in developing Muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruits. *Plant Physiol.*, v. 91, p.1527-1534.
- [8] CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. 1995. Starch transformation during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 43, n. 2, p. 347-351.
- [9] BASSINELLO, P. Z.; FIORAVANTE A. P.; NASCIMENTO, J. R. O.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. 1999. Distribuição de sacarose-fosfato sintase e sacarose sintase em bananas durante o amadurecimento. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* Campinas, v.19, n.1, p. Jan./Apr.

**Tabela 1.** Sequências de DNA das enzimas ADP-glicose pirofosforilase e sacarose-fosfato sintase compreendidas entre os sítios de anelamento dos respectivos *primers forward* e *reverse* e condições da RT-PCR.

<i>Primers</i>	Sequências	Temperatura de anelamento
ADP-glicose pirofosforilase	5' CCTATATCGTCCTTACGTTCCC 3' (22 bases)	50-56°C
	5' CTGTTTCTCTGTGGGCTTGA 3' (20 bases)	50-56°C
Sacarose-fosfato sintase	5' TTGTGATGCTAGCTCAGGACTC 3' (22 bases)	50-56°C
	5' GCTCAGAATGGAAGGAGGAA 3' (20 bases)	50-56°C



**Figura 1.** Perfil eletroforético do produto de RT-PCR obtido com *primers* específicos para amplificar o gene da ADPG-PPi de *Solanum tuberosum* L. armazenado por 60 dias a 4°C. A primeira coluna (PM) corresponde ao marcador de peso molecular DNA *Ladder-Invitrogen*®. As colunas 1 e 2 correspondem ao produto de amplificação por RT-PCR de tubérculos de batata antes do armazenamento. As colunas 3, 4 e 5 correspondem ao produto de amplificação por RT-PCR de tubérculos de batata após o armazenamento por 60 dias a 4°C.



**Figura 2.** Perfil eletroforético do produto de RT-PCR obtido com *primers* específicos para amplificar o gene da sacarose-fosfato sintase de *Solanum tuberosum* L. armazenado por 60 dias a 4°C. A primeira coluna (PM) corresponde ao marcador de peso molecular DNA *Ladder-Invitrogen*®. As colunas 1 e 2 correspondem ao produto de amplificação por RT-PCR de tubérculos de batata antes do armazenamento. As colunas 3 e 4 correspondem ao produto de amplificação por RT-PCR de tubérculos de batata após o armazenamento por 60 dias a 4°C.