

Pegoraro, C., Tadiello, A., Girardi, C.L., Chaves, F.C., Quecini, V., Costa de Oliveira, A., Trainotti, L., Rombaldi, C.V. 2015. Redes de regulação transcricional que controlam a lanosidade em pêssegos. In: **Congresso Brasileiro de Processamento mínimo e Pós-colheita de frutas, flores e hortaliças**, 001. Anais... Aracaju-SE.

## **Redes de regulação transcricional que controlam a lanosidade em pêssegos armazenados sob refrigeração**

**Camila Pegoraro<sup>1</sup>; Alice Tadiello<sup>2</sup>; Cesar L. Girardi<sup>1</sup>; Fabio C. Chaves<sup>3</sup>; Vera Quecini<sup>1</sup>; Antonio Costa de Oliveira<sup>4</sup>; Livio Trainotti<sup>2</sup>; Cesar V. Rombaldi<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Embrapa Uva e Vinho, Rua Livramento, 515, 95700-000, Bento Gonçalves – RS, [pegorarocamilanp@gmail.com](mailto:pegorarocamilanp@gmail.com), [cesar.girardi@embrapa.br](mailto:cesar.girardi@embrapa.br), [vera.quecini@embrapa.br](mailto:vera.quecini@embrapa.br);

<sup>2</sup> Università degli Studi di Padova. Viale G. Colombo, 3, 35121, Padova, Itália. [alice.tadiello@gmail.com](mailto:alice.tadiello@gmail.com), [livio.trainotti@unipd.it](mailto:livio.trainotti@unipd.it);

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Campus Capão do Leão, Caixa Postal 354, 96010-900 – Pelotas – RS. [chavesfc@gmail.com](mailto:chavesfc@gmail.com), [cesarvrf@ufpel.edu.br](mailto:cesarvrf@ufpel.edu.br);

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel – Centro de Genômica e Fitomelhoramento – Campus Capão do Leão, Caixa Postal 354, 96010-900 – Pelotas – RS. [acostol@cgfufpel.org](mailto:acostol@cgfufpel.org).

### **RESUMO**

O armazenamento refrigerado é frequentemente utilizado para prolongar a conservação pós-colheita de frutos. Em pêssegos, o dano pelo frio pode causar intensa perda de suculência levando ao desenvolvimento da lanosidade. Esse distúrbio é associado ao metabolismo de pectinas e resulta em alterações anatômicas e fisiológicas. A aplicação de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) na pré-colheita, antes do endurecimento do caroço, reduz a incidência de lanosidade, no entanto, os mecanismos que controlam essa resposta permanecem desconhecidos. Nesse estudo foi realizada análise do transcriptoma do pêssego visando investigar os efeitos do AG<sub>3</sub> e do armazenamento refrigerado no desenvolvimento da lanosidade. Aproximadamente metade, ou seja 48,26% dos 28000 genes investigados apresentaram expressão diferencial significativa em resposta aos tratamentos. Os genes diferencialmente expressos mostraram resposta transcricional complexa a ambos os fatores, indicando uma sinalização cruzada entre o GA<sub>3</sub> e frio. O perfil transcricional confirmou o envolvimento de genes associados ao metabolismo de parede celular no desenvolvimento de lanosidade em pêssegos. As mudanças transcricionais observadas sugerem que a redução da incidência da lanosidade é resultado de uma reprogramação do desenvolvimento em resposta à aplicação do hormônio, e que essa reprogramação ocorre antes da lignificação do endocarpo.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Prunus persica*, injúria pelo frio, expressão gênica.

Pegoraro, C., Tadiello, A., Girardi, C.L., Chaves, F.C., Quecini, V., Costa de Oliveira, A., Trainotti, L., Rombaldi, C.V. 2015. Redes de regulação transcricional que controlam a lanosidade em pêssegos. In: **Congresso Brasileiro de Processamento mínimo e Pós-colheita de frutas, flores e hortaliças**, 001. Anais... Aracaju-SE.

39 **ABSTRACT**

40 **Transcriptional regulatory networks controlling woolliness in peach**

41 Cold storage is frequently used to increase fruit post harvest conservation. In peach,  
42 chilling injuries may cause intense juice loss leading to a dry ‘woolly’ texture of the  
43 fruit flesh. The disturbance, termed woolliness, is associated to pectin metabolism and  
44 results in physiological and anatomical alterations. Preharvest application of gibberellic  
45 acid (GA<sub>3</sub>) at the initial stages of pit hardening has been shown to reduce woolliness  
46 incidence, although the mechanisms controlling the response remain unknown. We have  
47 employed genome wide transcription analyses to investigate the effects of GA  
48 application and cold storage (CS) in woolliness developmental. Approximately half  
49 (48.26%) of the investigated genes exhibited significant differential expression in  
50 response to the treatments. The differentially expressed genes exhibited a complex  
51 transcriptional response to both factors, indicating an extensive network of crosstalk  
52 between GA and low temperatures in peaches. The transcriptional profiling confirmed  
53 the involvement of cell wall metabolism genes in wooliness onset in peach. The genome  
54 wide transcriptional analyses indicate that reduced incidence of chilling induced  
55 damages is likely to result from extensive developmental reprogramming in response to  
56 the hormone application.

57

58 **Keywords:** *Prunus persica*. chilling injury, gene expression.

59

60 **INTRODUÇÃO**

61 Sob o aspecto tecnológico, pêssegos (*Prunus persica* L. Bastch.) são frutos  
62 caracterizados pela curta vida de prateleira devido à fragilidade, à rápida perda de  
63 firmeza de polpa e à susceptibilidade às podridões. Desse modo, a conservação após a  
64 colheita é baseada em métodos que previnem danos mecânicos e a aceleração do  
65 metabolismo do próprio fruto e micro-organismos associados (PRINSI *et al.*, 2011).  
66 Neste sentido, o armazenamento refrigerado tem sido utilizado para aumentar a vida de  
67 prateleira de pêssegos. Porém, dependendo da cultivar, do estágio de maturação no  
68 momento da colheita, das condições de temperatura e tempo de armazenamento, podem  
69 ser estimulados danos fisiológicos amplamente conhecidos como *chilling injury*, que

Pegoraro, C., Tadiello, A., Girardi, C.L., Chaves, F.C., Quecini, V., Costa de Oliveira, A., Trainotti, L., Rombaldi, C.V. 2015. Redes de regulação transcricional que controlam a lanosidade em pêssegos. In: **Congresso Brasileiro de Processamento mínimo e Pós-colheita de frutas, flores e hortaliças**, 001. Anais... Aracaju-SE.

70 incluem a lanosidade ou perda de suculência e escurecimento interno (LURIE e  
71 CRISOSTO, 2005; FRUK *et al.*, 2014).

72 A lanosidade ocorre quando algumas cultivares são submetidas a longos períodos de  
73 conservação em baixas temperaturas (LURIE *et al.*, 2011; PEGORARO *et al.*, 2011).

74 Injúrias ocasionadas pelo frio são complexas e podem ser controladas por fatores  
75 genéticos e ambientais (ARANA *et al.*, 2005; LURIE e CRISOSTO 2005; FRUK *et al.*,

76 2014). A aplicação de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) antes do endurecimento do caroço tem se

77 mostrado eficiente na redução da lanosidade em cultivares como Chimarrita e Chiripá

78 (PEGORARO *et al.*, 2011), no entanto, as respostas hormonais que levam à redução

79 desse distúrbio são pouco conhecidas.

80 Embora o metabolismo da pectina seja considerado um dos principais fatores associados

81 ao desenvolvimento da lanosidade, os mecanismos moleculares responsáveis pelo

82 aparecimento desse distúrbio são pouco entendidos (FRUK *et al.*, 2014). A redução no

83 acúmulo de transcritos de genes associados à biossíntese e sinalização do etileno,

84 respiração celular, biossíntese de compostos voláteis, transporte endocelular,

85 degradação da parede celular, dobramento de proteínas e sistema redox tem sido

86 associada ao desenvolvimento de lanosidade (GONZÁLEZ-AGÜERO *et al.*, 2008;

87 NILO *et al.*, 2010; PAVEZ *et al.*, 2013; SÁNCHEZ *et al.*, 2013; TOSETTI *et al.*,

88 2014).

89 Com o objetivo de identificar os mecanismos associados à ocorrência de lanosidade, o

90 transcriptoma de pêssegos ‘Chimarrita’ tratados e não tratados com AG<sub>3</sub> antes do

91 endurecimento do caroço e submetidos ao armazenamento refrigerado foi avaliado

92 nesse estudo.

93

## 94 **MATERIAL E MÉTODOS**

95 Pêssegos [*P. persica* (L.) Batsch. cv, Chimarrita] foram utilizados nesse estudo. Três

96 replicatas biológicas de vinte plantas foram selecionadas baseadas na uniformidade e

97 conduzidas como segue: tratamento com AG<sub>3</sub> por aspersão de 400 L ha<sup>-1</sup> de solução

98 contendo 50 mg L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> (Pro-Gibb) suplementado com 0,05% de surfactante

99 (Silwet) pH 4,5, no início do endurecimento do caroço. Plantas não tratadas,

100 denominadas controle foram aspergidas com a solução livre da presença hormônio. Os

101 frutos foram colhidos com coloração de fundo verde clara, correspondendo ao estágio

Pegoraro, C., Tadiello, A., Girardi, C.L., Chaves, F.C., Quecini, V., Costa de Oliveira, A., Trainotti, L., Rombaldi, C.V. 2015. Redes de regulação transcricional que controlam a lanosidade em pêssegos. In: **Congresso Brasileiro de Processamento mínimo e Pós-colheita de frutas, flores e hortaliças**, 001. Anais... Aracaju-SE.

102 pré-climatério (PEGORARO *et al.*, 2011). Cada replicata biológica consistiu de 280  
103 frutos, totalizando 840 frutos por tratamento.

104 Uma vez que a lanosidade não é percebida imediatamente após a retirada da câmara,  
105 mas sim a partir do segundo dia em temperatura ambiente (TA -  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), as  
106 avaliações foram realizadas a cada cinco dias de armazenamento seguidos de dois dias  
107 em TA. Os frutos foram mantidos em armazenamento refrigerado ( $0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  e  $90 \pm 5\%$   
108 de umidade relativa) durante 30 dias, mas as análises transcriptômicas foram realizadas  
109 após o início da ocorrência do distúrbio, que ocorre aos 15 dias de armazenamento  
110 refrigerado.

111 A incidência de lanosidade foi determinada conforme descrito por Pegoraro *et al.*,  
112 (2011). Para avaliação do transcriptoma foram amostrados frutos no momento da  
113 colheita e após trinta dias de armazenamento, seguidos de dois dias em TA. O RNA  
114 total foi extraído a partir de 2 g de polpa, com a utilização do tampão CTAB (*cetyl*  
115 *trimethylammonium bromide*), conforme protocolo descrito por Zeng e Yang (2002). A  
116 quantidade e a qualidade do RNA isolado foi avaliada por espectrofotômetro, gel de  
117 agarose e eletroforese capilar. A análise de microarranjos foi realizada utilizando a  
118 plataforma  *$\mu$ PEACH3.0*. Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa  
119 *Multi Experiment Viewer (MeV)*, *EASE Expression Analysis Systematic Explorer*  
120 *version 4.6* (SAEED *et al.*, 2003).

121

## 122 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

123 Frutos tratados e não tratados com AG<sub>3</sub> não apresentaram sintomas de lanosidade até o  
124 vigésimo dia de armazenamento refrigerado. No entanto, após esse período de  
125 conservação o índice de lanosidade aumentou drasticamente em pêssegos não tratados,  
126 enquanto que a aplicação de AG<sub>3</sub> preveniu significativamente a ocorrência do distúrbio.  
127 Nesse sentido, após 15 dias sob armazenamento refrigerado há indução da ocorrência do  
128 distúrbio e, aos 30 dias, aproximadamente 100% dos frutos não tratados com giberelina  
129 apresentavam lanosidade. Em contraste, a incidência do distúrbio em frutos tratados  
130 com AG<sub>3</sub> foi significativamente reduzida (16%) (Figura 1). Estudos prévios têm  
131 demonstrado que a aplicação de AG<sub>3</sub> antes do endurecimento do caroço é eficaz na  
132 redução da lanosidade, e que a aplicação no final desse estágio de desenvolvimento não  
133 apresenta efeito sobre a incidência do distúrbio (PEGORARO *et al.*, 2011). De acordo

Pegoraro, C., Tadiello, A., Girardi, C.L., Chaves, F.C., Quecini, V., Costa de Oliveira, A., Trainotti, L., Rombaldi, C.V. 2015. Redes de regulação transcricional que controlam a lanosidade em pêssegos. In: **Congresso Brasileiro de Processamento mínimo e Pós-colheita de frutas, flores e hortaliças**, 001. Anais... Aracaju-SE.

134 com esses resultados, sugere-se que o processo que leva à redução da lanosidade em  
135 resposta a aplicação do AG<sub>3</sub> ocorre no estágio de pré-lignificação do endocarpo e não  
136 no período de pós-colheita.

137 A partir da análise de 28689 transcritos observou-se que aproximadamente metade  
138 (48.26% - 13846) foi diferencialmente regulada por AG<sub>3</sub> e frio. Os genes  
139 diferencialmente expressos foram classificados de acordo com o processo biológico em  
140 que atuam, e a partir dessa análise verificou-se que os processos metabólicos, celulares  
141 e de desenvolvimento foram os que mais apresentaram genes diferencialmente  
142 expressos (Figura 2). As mudanças transcricionais observadas nos processos de  
143 desenvolvimento e celular sugerem que a redução da incidência da lanosidade é  
144 resultado de uma reprogramação do desenvolvimento em resposta à aplicação do  
145 hormônio, e que essa reprogramação ocorre antes da lignificação do endocarpo.

146 Quando se realizou a classificação dos genes diferencialmente regulados de acordo com  
147 o metabolismo celular verificou-se que o AG<sub>3</sub> e o frio afetaram a transcrição de um  
148 grande número de genes associados ao metabolismo de parede celular, lipídeos,  
149 carboidratos, aminoácidos, sistema redox, nucleotídeos e fotorrespiração (Figura 3),  
150 confirmando os resultados encontrados previamente (GONZÁLEZ-AGÜERO *et al.*,  
151 2008; NILO *et al.*, 2010; PAVEZ *et al.*, 2013; SÁNCHEZ *et al.*, 2013; TOSETTI *et al.*,  
152 2014), que também verificaram alteração na expressão de genes associados a esses  
153 metabolismos quando avaliaram frutos lanosos. Além disso, genes associados à  
154 fotossíntese foram diferencialmente regulados por AG<sub>3</sub> e frio, sugerindo que esses genes  
155 possam ser utilizados como indicadores da ocorrência do distúrbio, embora,  
156 provavelmente, não tenham co-variação com o evento.

157

## 158 **AGRADECIMENTOS**

159 À Capes pelo auxílio na forma de bolsas de estudo, e ao CNPq pelo financiamento à  
160 pesquisa, auxílio na forma de bolsas, inclusive missão de estudos no exterior.

161

## 162 **REFERÊNCIAS**

163 FRUK, G.; CMELIK, Z.; JEMRIC, T.; HRIBAR, J.; VIDRIH, R. Pectin Role in  
164 Woolliness Development in Peaches and Nectarines : A Review. *Scientia Horticulturae*,  
165 v. 180, p. 1–5, 2014.

Pegoraro, C., Tadiello, A., Girardi, C.L., Chaves, F.C., Quecini, V., Costa de Oliveira, A., Trainotti, L., Rombaldi, C.V. 2015. Redes de regulação transcricional que controlam a lanosidade em pêssegos. In: **Congresso Brasileiro de Processamento mínimo e Pós-colheita de frutas, flores e hortaliças**, 001. Anais... Aracaju-SE.

166 GONZÁLEZ-AGÜERO, M.; PAVEZ, L.; IBÁÑEZ, F.; PACHECO, I.; CAMPOS-  
167 VARGAS, R.; MEISEL, L.; ORELLANA, A.; RETAMALES, J.; SILVA, H.;  
168 GONZALES, M.; CAMBIAZO, V. Identification of Woolliness Response Genes in  
169 Peach Fruit after Post-Harvest Treatments. *Journal of Experimental Botany*, v. 59, p.  
170 1973–1986, 2008.

171 LURIE, S.; VANOLI, M.; DAGAR, A.; WEKSLER, A.; LOVATI, F.; ECCHER  
172 ZERBINI, P.; SPINELLI, L.; TORRICELLI, A.; FENG, J.; RIZZOLO, A. Chilling  
173 Injury in Stored Nectarines and Its Detection by Time-Resolved Reflectance  
174 Spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology*, v. 59, p. 211–218, 2011.

175 Lurie, S.; Crisosto, C. H. Chilling Injury in Peach and Nectarine. *Postharvest Biology  
176 and Technology*, v. 37, p. 195–208, 2005.

177 NILO, R.; SAFFIE, C.; LILLEY, K.; BAEZA-YATES, R.; CAMBIAZO, V.;  
178 CAMPOS-VARGAS, R.; GONZÁLES, M.; MEISEL, L.; RETAMALES, J.; SILVA,  
179 H.; ORELLENA, A. Proteomic Analysis of Peach Fruit Mesocarp Softening and  
180 Chilling Injury Using Difference Gel Electrophoresis (DIGE). *BMC genomics*. v. 11,  
181 43, 2010.

182 PAVEZ, L.; HÖDAR, C.; OLIVARES, F.; GONZÁLEZ, M.; CAMBIAZO, V. Effects  
183 of Postharvest Treatments on Gene Expression in Prunus Persica Fruit: Normal and  
184 Altered Ripening. *Postharvest Biology and Technology*. v. 75, p. 125–34, 2013.

185 PEGORARO, C.; CHAVES, F. C.; DAL CERO, J.; GIRARDI, C. L.; ROMBALDI, C.  
186 V. Effects of Pre-Harvest Gibberellic Acid Spraying on Gene Transcript Accumulation  
187 during Peach Fruit Development. *Plant Growth Regulation*, v. 65, p. 231–237, 2011.

188 PRINSI, B.; NEGRI, A. S.; FEDELI, C.; MORGUTTI, S.; NEGRINI, N.; COCUCCI,  
189 M.; ESPEN, L. Peach Fruit Ripening: A Proteomic Comparative Analysis of the  
190 Mesocarp of Two Cultivars with Different Flesh Firmness at Two Ripening Stages.  
191 *Phytochemistry*, v. 72, p. 1251–1262, 2011.

192 SAEED A. I.; SHAROV V.; WHITE J.; LI J.; LIANG W.; BHAGABATI N.;  
193 BRAISTED J.; KLAPA M.; CURRIER T.; THIAGARAJAN M.; STURN A.;  
194 SNUFFIN M.; REZANTSEV A.; POPOV D.; RYLTSOV A.; KOSTUKOVICH E.;  
195 BORISOVSKY I.; LIU, Z.; VINSAVICH A.; TRUSH V.; QUACKENBUSH J. TM4:  
196 A Free, Open-Source System for Microarray Data Management and Analysis.  
197 *Biotechniques*. v. 34, p. 374–78, 2003.

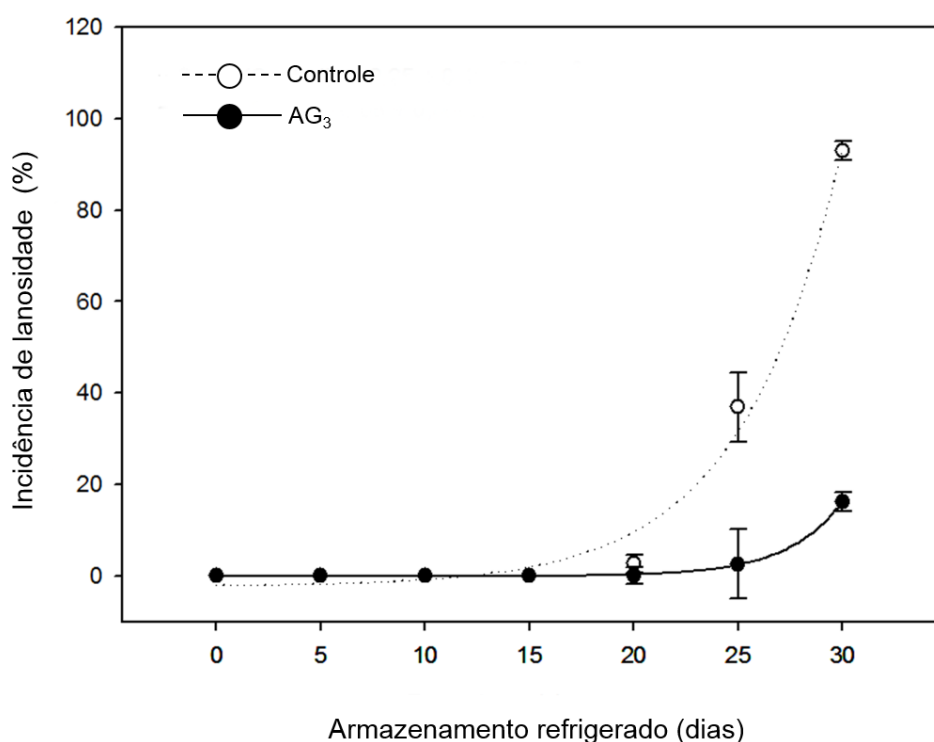
Pegoraro, C., Tadiello, A., Girardi, C.L., Chaves, F.C., Quecini, V., Costa de Oliveira, A., Trainotti, L., Rombaldi, C.V. 2015. Redes de regulação transcricional que controlam a lanosidade em pêssegos. In: **Congresso Brasileiro de Processamento mínimo e Pós-colheita de frutas, flores e hortaliças**, 001. Anais... Aracaju-SE.

198 SÁNCHEZ, G.; VENEGAS-CALERÓN, M.; SALAS, J. J.; MONFORTE, A.;  
199 BADENES, M. L.; GRANELL, A. An Integrative ‘Omics’ Approach Identifies New  
200 Candidate Genes to Impact Aroma Volatiles in Peach Fruit. *BMC genomics*. v. 14, 343,  
201 2013.

202 TOSETTI, R.; TARDELLI, F.; TADIELLO, A.; ZAFFALON, V.; GIORGI, F. M.;  
203 GUIDI, L.; TRAINOTTI, L.; BONGHI, C.; TONUTTI, P. Molecular and Biochemical  
204 Responses to Wounding in Mesocarp of Ripe Peach (*Prunus Persica* L. Batsch) Fruit.  
205 *Postharvest Biology and Technology*. v. 90, p. 40–51, 2014.

206 ZENG, Y.; YANG, T. RNA Isolation from Highly Viscous Samples Rich in  
207 Polyphenols and Polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter*. v. 20, p. 417–417,  
208 2002.

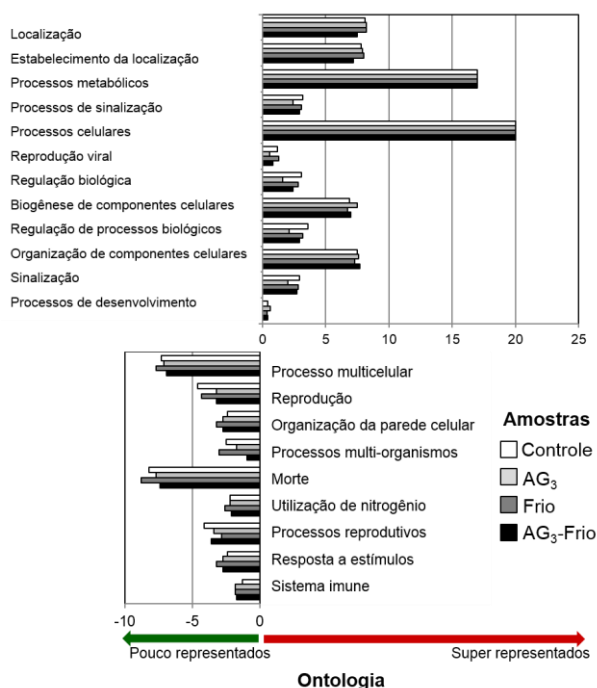
209



210

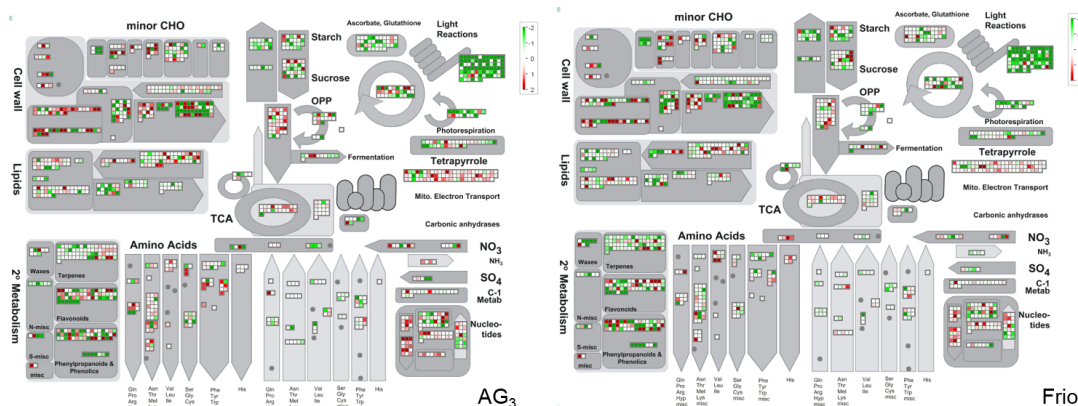
211 **Figura 1:** Ocorrência de lanosidade em pêssegos não tratados (controle) e tratados com  
212 ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) na pré-colheita. Os frutos foram mantidos durante 30 dias em  
213 armazenamento refrigerado ( $0 \pm 0,5^{\circ}$  C e  $90 \pm 5\%$  de umidade relativa) e amadurecidos  
214 em temperatura ambiente ( $25 \pm 2^{\circ}$  C) durante 2 dias. O tratamento com AG<sub>3</sub> foi feito na  
215 pré-colheita, antes do endurecimento do caroço. (Woolliness symptom occurrence in pre  
216 harvest GA untreated (Control) and GA treated peaches (GA). Fruits were stored for 30  
217 days under cold storage (CS -  $0 \pm 0,5^{\circ}$  C and  $90 \pm 5\%$  of relative humidity) and ripened  
218 at room temperature (RT -  $25 \pm 2^{\circ}$  C) for 2 days. The GA treatment was carried out in  
219 the pre harvest before pit hardening of peaches).

220  
221  
222



223  
224  
225  
226  
227  
228  
229

**Figura 2:** Ontologia gênica (GO) para processos biológicos dos genes diferencialmente expressos em pêssegos em resposta aos tratamentos. (Singular enrichment analysis (SAE) of gene ontology (GO) biological process categories for the differentially expressed genes in peach in response to the treatments).



230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239

**Figura 3:** Classificação geral do metabolismo de acordo com o esquema do MapMan de genes diferencialmente expressos em resposta ao AG<sub>3</sub> e ao frio. Os valores estão representados em escala de Log<sub>2</sub> para os contrastes AG<sub>3</sub> versus sem AG<sub>3</sub> e frio versus sem frio. Valores positivos (vermelho) correspondem a genes induzidos e valores negativos (verde) a genes reprimidos. (General metabolism classification, according to MapMan scheme, of peach differentially expressed genes in response to GA and CS. Log<sub>2</sub> fold changes are represented as color scale for GA x no GA and cold x no cold contrasts. Positive values (red) correspond up regulated genes and negative values (green), to down regulated genes).