

DANIEL NOGUEIRA MARTINS

***IN SITU* HYBRIDIZATION OF SUCROSE SYNTHASE
TRANSCRIPTS AND POSTHARVEST STUDIES IN TUBEROUS
ROOTS**

Tese apresentada à
Universidade Federal de
Viçosa, como parte das
exigências do Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia
Vegetal, para obtenção do
título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

RESUMO

MARTINS, Daniel Nogueira, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, março de 2007, **Hibridização *in situ* de transcritos da sintase da sacarose e estudos de pós-colheita em raízes tuberosas**. Orientador: Fernando Luiz Finger. Co-orientadores: Raimundo Santos Barros e Mário Puiatti.

O presente trabalho foi dividido em dois capítulos, sendo cada um deles destinado à descrição dos estudos desenvolvidos com um tipo de raiz tuberosa, a saber: beterraba açucareira e mandioquinha-salsa. Foram investigados diferentes aspectos de cada uma destas raízes relacionados ao metabolismo de carboidratos e mais especificamente à ação da sintase da sacarose, enzima sacarolítica, a qual desempenha importante papel no metabolismo de carboidratos das plantas em geral. Enquanto a beterraba açucareira armazena sacarose nas raízes, o amido é o principal carboidrato de reserva armazenado nas raízes da mandioquinha-salsa. A beterraba açucareira é uma espécie temperada, cujas raízes tuberosas são utilizadas para produção de açúcar, sendo portanto, primordial evitar a degradação da sacarose, tanto no cultivo quanto durante a pós-colheita. Por outro lado, a mandioquinha-salsa é cultivada em regiões tropicais e sub-tropicais e suas raízes são utilizadas na alimentação humana, sendo de extrema importância a extensão da vida pós-colheita e a manutenção da qualidade das raízes durante a armazenagem. Na beterraba açucareira, a sintase da sacarose é uma enzima de importância tanto no desenvolvimento quanto na pós-colheita das raízes. O estudo baseado nesta cultura teve por objetivo a produção de sondas marcadas com alta especificidade para os mRNAs de duas isoformas da sintase da sacarose, para fins de utilização na técnica de hibridização *in situ* adaptada para os tecidos de raízes da beterraba açucareira, e deste modo, verificar a expressão de dois tipos de transcritos da sintase da sacarose em diferentes tecidos da raiz. Para este propósito, sondas de DNA foram produzidas por RT-PCR, e subsequentemente, usadas para produzir sondas de RNA marcadas com digoxigenina visando as reações de transcrição *in vitro*. A especificidade das sondas foi testada em ensaios de hibridização via *dot-blot*. A técnica de hibridização *in situ* foi adaptada para os tecidos da raiz da beterraba açucareira, principalmente no que tange às condições de fixação do tecido, às

etapas de pré-tratamento do tecido a fim de torná-lo mais acessível à sonda, e às condições de hibridização. Foram obtidas, com sucesso, sondas marcadas de RNA com alta especificidade para dois mRNAs expressos nas raízes da beterraba açucareira. Verificou-se que, os dois tipos de transcritos da sintase da sacarose estavam concentrados no tecido de reserva do parênquima, apontando para um possível papel destes tecidos como centro de armazenagem e distribuição de açúcares nas raízes, e para o papel regulatório da sintase da sacarose neste processo. Em mandioquinha-salsa, os estudos tiveram por objetivo verificar o efeito da temperatura e do filme plástico de PVC na armazenagem das raízes, considerando a perda de massa fresca, o déficit de pressão de vapor e a atividade da sintase da sacarose. Raízes foram submetidas à armazenagem em temperatura ambiente e nas temperaturas de 5° C, 10° C e 15° C, com e sem a cobertura do filme de PVC durante o período de armazenagem. A perda de massa fresca foi diretamente afetada pelo filme de PVC e pelo déficit de pressão de vapor, o qual resultou da combinação entre temperatura e umidade relativa. A atividade da sintase da sacarose foi induzida pelo estresse hídrico e possivelmente pela injúria por frio, podendo estar envolvida, também, em um processo de adoçamento na mandioquinha-salsa. Este trabalho demonstrou que, a sintase da sacarose desempenha um importante papel na regulação do metabolismo de carboidratos em ambas as raízes tuberosas estudadas.

ABSTRACT

MARTINS, Daniel Nogueira, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, March, 2007. ***In situ* hybridization of sucrose synthase transcripts and postharvest studies in tuberous roots.** Adviser: Fernando Luiz Finger. Co-advisers: Raimundo Santos Barros and Mário Puiatti.

The present work was divided into two chapters in which studies developed with two tuberous roots were considered separately. Sugarbeet and arracacha were investigated focusing different aspects of each one considering the carbohydrate metabolism, more specifically involving the sucrose synthase, a sucrolytic enzyme that performs an important role on carbohydrate metabolism of plants in general. While sugarbeet stores sucrose in roots, starch is the mainly storage carbohydrate of the arracacha roots. Sugarbeet is a temperate species whose tuberous roots are used for sugar production and the central point in cultivation and postharvest storage is to avoid sucrose degradation. On its turn, arracacha is a tropical and sub-tropical crop whose roots are used as human food and the point to be considered is the extension of postharvest life and quality of the roots during storage. In sugarbeet, sucrose synthase is an important enzyme in root development and postharvest. The study based in this crop aimed at the production of labeled probes with high specificity for mRNAs of two sucrose synthase isoforms to be used *in situ* hybridization technique adapted to sugarbeet root tissue and then to verify expression of two sucrose synthase transcripts in different root tissues. For that purpose, the DNA probes were produced by RT-PCR and subsequently used to produce RNA probes labeled with digoxigenin by *in vitro* transcription reaction. The specificity of the probes was tested by dot blot hybridization assays. *In situ* hybridization technique was adapted for sugarbeet root tissue, considering mainly conditions of tissue fixation, pre-treatment of tissue to make it more accessible to probes and hybridization conditions. RNA labeled probes with high specificity for two sucrose synthase mRNAs expressed on roots were successfully produced. It was possible to verify that both sucrose synthase transcripts were concentrated in storage parenchyma tissue, which points out the role of this tissue as storage and distribution center of sugar on sugarbeet roots and the regulatory role of sucrose synthase on it. In arracacha the study

aimed to verify the effect of temperature and PVC film cover on root storage based in fresh mass loss, vapor pressure deficit and sucrose synthase activity. Roots were submitted to storage at room temperatures, 5 °C, 10 °C and 15 °C with and without PVC cover during the storage period. Fresh mass loss was directly affected by PVC film cover and vapor pressure deficit which resulted from the combination between temperature and relative humidity. Sucrose synthase activity decreased in roots covered with PVC film independently of storage temperature except at 5 °C in which the enzyme activity remained high. Sucrose synthase activity was induced by water stress and possibly by chilling injury and can be involved also in the sweetening process in arracacha. This work demonstrated that sucrose synthase plays an important role in carbohydrate metabolism regulation in both tuberous roots studied.