

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Tese

**EXPRESSÃO DE GENES DE ENZIMAS ENVOLVIDAS
NO ADOÇAMENTO DE TUBÉRCULOS DE BATATA**

Inês Angélica Cordeiro Gomes

Pelotas
Rio Grande do Sul
2008

INÊS ANGÉLICA CORDEIRO GOMES

**EXPRESSÃO DE GENES DE ENZIMAS ENVOLVIDAS
NO ADOÇAMENTO DE TUBÉRCULOS DE BATATA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Pelotas, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Bacarin

Co-Orientadores: Prof^a. Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga

Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi

Pelotas
Rio Grande do Sul
2008

Banca examinadora:

Professor Dr. Marcos Antonio Bacarin – IB/UFPeI (Presidente);

Professora Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga – IB/UFPeI (Titular)

Professor Dr. Jorge Adolfo Silva – DCTA/ FAEM /UFPeI (Titular)

Professora Dr^a. Diolina Moura Silva – IB/UFES (Titular)

DEDICO

Aos meus amados pais Dalva e Alípio, à minha querida irmã Fernanda e ao meu estimado cunhado Lacy, pelo apoio, amor e incentivos dedicados.

Agradecimentos

À Deus...

Aos meus pais, os verdadeiros responsáveis por mais esta conquista.

À minha irmã, pelo amor, compreensão e apoio incondicionais.

Aos meus familiares, pelo apoio e incentivo.

À Universidade Federal de Pelotas (UFPel), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Professor Orientador, Dr. Marcos Antonio Bacarin pela orientação, apoio e confiança dedicados.

Aos Co-Orientadores Professores Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga e Dr. Cesar Valmor Rombaldi pela atenção e ensinamentos oferecidos.

Ao MCT/CNPq e FAPERGS pelo financiamento do projeto.

Ao pesquisador da Embrapa Clima Temperado Dr. Arione da Silva Pereira pela concessão do material vegetal utilizado, bem como pelo apoio durante a realização do trabalho.

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (UFPel) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos membros da banca examinadora, Professora Dr^a. Diolina Moura Silva e Professor Dr. Jorge Adolfo Silva pela disponibilidade e colaboração neste trabalho.

Aos Professores, Funcionários e Colegas dos Programas de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal e Ciência e Tecnologia Agroindustrial (UFPel), pelo apoio e motivação à execução do trabalho.

Aos meus amigos, pela torcida e fiel apoio.

Às famílias Coutinho de Oliveira e Oliveira João pelo carinho, apoio e hospitalidade dedicados.

Aos amigos da Embrapa Clima Temperado, em especial ao Pesquisador Dr. Sérgio Delmar dos Anjos e Silva, pela amizade e incentivo.

Agradeço.

RESUMO

GOMES, Inês Angélica Cordeiro, D.Sc.. Universidade Federal de Pelotas, novembro de 2008. **Expressão de genes de enzimas envolvidas no adoçamento de tubérculos de batata.** Professor Orientador: Dr. Marcos Antonio Bacarin. Professores Co-Orientadores: Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga e Dr. Cesar Valmor Rombaldi.

O adoçamento induzido pelo frio (CIS) pode ser elucidado em tubérculos de batata armazenados sob baixas temperaturas, através de estudo de genes de enzimas que atuam na rota metabólica dos carboidratos. O objetivo deste trabalho foi testar cinco métodos de isolamento de RNAs totais de tubérculos de batata visando extratos para análise de expressão por RT-PCR, bem como, analisar a expressão de genes de enzimas-chave do metabolismo de carboidratos em dois genótipos de batata, armazenados sob refrigeração e sob temperatura ambiente. Desta forma, o primeiro trabalho desenvolvido foi a comparação de cinco métodos de extração de RNAs totais, três baseados na precipitação diferencial com o uso de LiCl₂ e dois no uso de extratores comercialmente disponíveis *TRIzol*® (Invitrogen™) e *Concert™ Plant RNA* (Invitrogen™). Foram utilizados dois clones de batata, C-1786-6-84 e C-1881-16-97, em dois estados: liofilizado e *in natura*. A extração de RNA utilizando-se o *Concert™ Plant RNA* apresentou melhor manutenção da conservação das moléculas de RNA e isolamento, apresentando razão espectral A₂₆₀/A₂₈₀ dentro do intervalo recomendado de 1,8 a 2,0 para ampliações por RT-PCR. Dentre os clones utilizados, o material liofilizado apresentou maior quantidade de RNAs totais. Os testes entre os métodos aplicados não mostram diferença estatística para o clone *in natura*. No segundo trabalho, a expressão gênica diferencial de quatro genes

envolvidos no adoçamento induzido pelas baixas temperaturas foi analisada em dois genótipos de batata, cultivar BRS Pérola e clone C-1786-6-84. As análises foram realizadas imediatamente após a colheita dos tubérculos e após o armazenamento por 60 dias a 4°C e a 20°C, tendo sido as amostras liofilizadas. Os perfis das expressões em mRNAs dos genes que codificam para SuSy, SPS, UDP-GlcPPase e ADP-GlcPPase de batatas foram analisados através da técnica de RT-PCR. Na cultivar BRS Pérola, a expressão dos genes destas enzimas ocorreu predominantemente, quando armazenados sob refrigeração, a 4°C por 60 dias, segundo os produtos de amplificação. Entretanto, quando os tubérculos desta cultivar foram armazenados a 20°C por 60 dias, apenas o gene da UDP-GlcPPase foi expresso. Já no clone C-1786-6-84, a expressão deste mesmo gene foi mais intensa a 4°C quando comparado na cultivar BRS Pérola, indicando que a conversão de amido à sacarose intensificou-se sob tal condição de armazenamento.

Palavras-chave: *Solanum tuberosum* L., adoçamento induzido pelo frio, metabolismo de carboidratos

ABSTRACT

GOMES, Inês Angélica Cordeiro D.Sc. Federal University of Pelotas, November, 2008. **Gene expression of enzymes involved in potato tubers sweetening.** Adviser: Prof. Dr. Marcos Antonio Bacarin, Co-Adviser: Prof^a. Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga and Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi

The cold-induced sweetening (CIS) can be explained in stored potato tubers under low temperatures, through study of enzyme genes that act in the metabolic route of the carbohydrates. Five methods were tested to isolate total RNAs of potato tubers aiming to determine their effectiveness in RT-PCR analysis, as well as analyze the gene expression of key enzymes from carbohydrates metabolism in two potato genotypes under cold and ambient temperature. Thus, the first trial aimed to compare the five total RNAs extraction methods, three based in differential precipitation using LiCl_2 and the other two using commercial extractors *TRIZOL®* (Invitrogen™) e *Concert™ Plant RNA* (Invitrogen™). There were used two potato clones C-1786-6-84 e C-1881-16-97, in two ways: lyophilized and *in natura*. The RNA extraction with *Concert™ Plant RNA* showed the best RNA conservation maintenance and isolation, with spectral ratio A_{260}/A_{280} within the recommended RT-PCR amplification range of 1,8 to 2,0. Considering the two potato clones, the lyophilized had the highest amount of total RNAs. The methods using the *in natura* clones didn't showed statistical differences. In the second trial the differential genic expression of four genes involved in cold-induced sweetening was analyzed in two potato genotypes, cv. BRS Pérola and clone C-1786-6-84. The analysis were carried out soon after the tubers harvesting, and after sixty days stored at 4°C and 20°C, with lyophilized samples. The mRNA expression profiles that encode to SuSy, SPS, UDP-GlcPPase e ADP-

GlcPPase enzymes in potato were analyzed using RT-PCR technique. In the cultivar BRS Pérola, the gene expression of this enzymes occurred mainly under cold storage, at 4°C for a period of 60 days, according to the amplification products. However, when stored under 20°C for 60 days, only the UDP gene didn't express. The Clone C-1786-6-84 expressed the UDP gene when stored under 4°C, indicating that the starch conversion to sucrose intensified in such conditions.

Key words: *Solanum tuberosum* L., cold-induced sweetening, carbohydrate metabolism.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$A_{260\text{nm}}$ ou $A_{280\text{nm}}$	Absorbância a 260 ou 280 nm de comprimento de onda
ADP-GlcPPase	Adenosina difosfato glicose pirofosforilase
Água ultra pura	Água destilada deionizada e estéril por filtração a 0,2 µm
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cDNA	DNA complementar ao mRNA
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
g	Grama
kb	Quilobase (mil pares de bases)
kDa	Quilo Dáltons
L	Litro
M	Molar
mg	Miligrama (10^{-3}g)
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma (10^{-9}g)
nm	Nanômetro

Oligo (dT)	Oligo desoxitimidina trifosfato (oligonucleotídeo poli-T)
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>primer</i>	Oligonucleotídeo iniciador
p/v	Peso por volume
PVP	Polivinilpirrolidona
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNase	Ribonuclease
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Síntese de cDNA por uma transcriptase reversa, seguida de PCR
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SPS	Sacarose fosfato sintase
SuSy	Sacarose sintase
<i>Taq</i>	DNA polimerase da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
T _m	Temperatura de anelamento
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
U	Unidades
UDP	Uridinadifosfato
UDP-GlcPPase	Uridina difosfato glicose pirofosforilase
x g	força centrífuga relativa à aceleração padrão de gravidade

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL.....	14
1 Cultura da batata.....	14
2 Metabolismo de carboidratos e adoçamento de tubérculos de batata.....	16
3 Análise da expressão de mRNAs das enzimas.....	22
CAPÍTULO I- COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE RNAs TOTAIS EM TUBÉRCULOS DE BATATA.....	24
1 INTRODUÇÃO.....	24
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1 Material vegetal.....	27
2.2 Extração de RNAs totais.....	28
2.2.1 Método Bugos.....	28
2.2.2 Método Chang.....	29
2.2.3 Método Meisel.....	30
2.2.4 <i>TRIzol® Reagent</i> (Invitrogen™).....	30
2.2.5 <i>Concert™ Plant RNA Reagent</i> (Invitrogen™).....	31
2.3 Estimativas da quantidade e qualidade dos RNAs totais.....	32
2.4 Análise estatística.....	33
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4 CONCLUSÕES.....	42

CAPÍTULO II- EXPRESSÃO DE GENES DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NO ADOÇAMENTO DE TUBÉRCULOS DE BATATA ARMAZENADAS SOB REFRIGERAÇÃO.....	43
1 INTRODUÇÃO.....	43
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
2.1 Material vegetal.....	48
2.2 Ajuste de PCR com <i>primers</i> específicos para os genes da SPS, SuSy, ADP-GlcPPase, UDP-GlcPPase.....	49
2.3 Extração de RNA.....	52
2.4 Estimativas da quantidade e da qualidade dos RNAs totais.....	52
2.5 Digestão com DNase I.....	53
2.6 RT-PCR.....	53
2.7 Amplificação do cDNA com oligonucleotídeos para o gene ribossomal 18S.....	53
2.8 Amplificação com oligonucleotídeos específicos.....	54
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
3.1 Ajuste de PCR com oligonucleotídeos específicos para os genes da SPS, SuSy, ADP-GlcPPase, UDP-GlcPPase.....	56
3.2 Expressão do gene da SPS.....	57
3.3 Expressão do gene da SuSy.....	59
3.4 Expressão do gene da ADP-GlcPPase.....	61
3.5 Expressão do gene da UDP-GlcPPase.....	63
4 CONCLUSÕES.....	66
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

INTRODUÇÃO GERAL

1 Cultura da batata

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), a batata é o quarto principal cultivo destinado à alimentação. Em 2006, aproximadamente 315 milhões de toneladas de batata foram colhidas, sendo mais da metade em países em fase de desenvolvimento (FAO, 2008).

Existe uma diminuição no consumo de batata *in natura*, devido, principalmente, às dificuldades no armazenamento doméstico, descascamento, fritura ou cozimento (DAVIES; MACKAY, 1994). O hábito alimentar, referente ao consumo de batata tem-se alterado, aumentando o interesse por produtos processados devido à praticidade oferecida (RODRIGUES, 2001), uma vez que a batata minimamente processada detém os atributos de conveniência e mesma qualidade das batatas frescas (DALE; MACKAY, 1994). Assim, o propósito do fornecimento de produtos industrializados é disponibilizar produtos que não requeiram preparação posterior pelo consumidor no que se refere à seleção, limpeza, lavagem, descascamento e corte. Outra grande vantagem é a redução praticamente total de desperdícios (RODRIGUES, 2001).

Nos últimos 30 a 40 anos, a industrialização de batata vem aumentando em todas as partes do mundo, principalmente com os produtos “chips” e batata pré-frita

congelada, seja pela disponibilidade ao consumo imediato ou pela facilidade e rapidez no preparo final. Ressalta-se, também, o fator custo, visto que a indústria pode oferecer o produto a preços baixos por adquirir grandes volumes, estar perto do centro dos produtores, ter o produto disponível quando o mercado do produto *in natura* estiver com preços altos e possibilitar o aproveitamento de subprodutos de processamento (SILVA, 1991).

O Brasil possui mercado consumidor potencial para a batata processada industrialmente na forma de fritura, mas, para atender a demanda, são necessárias cultivares que satisfaçam alguns padrões de qualidade, como altos teores de matéria seca e baixas concentrações de açúcares redutores, além de apresentar componentes de qualidade externa, como “olhos” pouco profundos, tamanho e formato adequados para cada finalidade (LOPES, 1997). Visando atender esta demanda, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa lançou em 2000 a cultivar de batata inglesa BRS Pérola, adaptada às condições de cultivo e à tecnologia usada pelos pequenos produtores do sul do Brasil, sendo que a mesma foi testada em diversas indústrias, apresentando bom rendimento e qualidade industrial, em especial quando frita (PEREIRA et al., 2000).

Além do mercado promissor, o processamento de batata no Brasil ainda conta com outra vantagem, que é a produção de batata durante todo o ano. Porém, há que se adequar o fornecimento de matéria-prima à indústria, sem a necessidade de formação de grandes estoques armazenados em câmaras frias, o que onera os custos e deprecia o produto final. Apesar dessas vantagens, alguns problemas necessitam ser superados, tais como adaptar a produção de batata à necessidade da indústria de processamento, que exige matéria-prima de alto padrão de qualidade, conforme o tipo de utilização (POPP, 1994; NORIO; FUKUA, 2001).

Para regular o fornecimento de tubérculos de batata para a indústria, os mesmos são armazenados a 4-8°C (PATHIRANA; HARRIS; MCKENZIE, 2008). O armazenamento sob baixas temperaturas reduz o brotamento, reduzindo a dependência de produtos químicos que a inibam, e diminui o desenvolvimento de doenças de pós-colheita. No entanto, o armazenamento em baixas temperaturas aumenta o risco de adoçamento induzido pelo frio (Cold-Induced Sweetening - CIS), o qual resulta da elevação da concentração de açúcares redutores, fato que torna impróprio os tubérculos para a produção de “chips” e batatas fritas (CHEN et al., 2008). Tubérculos com alto teor de açúcares redutores sofrem, durante o

processamento sob altas temperaturas, escurecimento devido à reação de Maillard, resultando em “chips” ou fritas “à francesa”, de sabor amargo e de coloração não aceitável pelo mercado consumidor. Por conseguinte, o acúmulo de açúcares redutores é um problema na pós-colheita tanto aos produtores quanto à indústria de processamento (PATHIRANA; HARRIS; MCKENZIE, 2008). Para diminuir ou sanar este problema, nos últimos anos vários programas de melhoramento de batata em todo o mundo objetivam o estudo e o controle do adoçamento induzido pelo frio, (cold induced sweetening - CIS), selecionando cultivares aptas à indústria de processamento de batata (BROWN et al., 1990).

2 Metabolismo de carboidratos e adoçamento de tubérculos de batata

Uma grande quantidade de CO₂ fixado pelas plantas verdes é armazenada como reserva nos tecidos vegetais, tais como sementes, tubérculos e raízes. Nos tubérculos maduros de batata, o armazenamento de amido se dá devido à fixação do carbono pela fotossíntese, à síntese de amido e sua conversão em sacarose nas folhas verdes ativas, ao transporte vascular da sacarose das folhas até o tubérculo e a síntese e degradação do amido no tubérculo durante o crescimento (CHEN et al., 2008).

Quando os tubérculos de batata são expostos a baixas temperaturas, verifica-se aumentos na atividade de algumas enzimas envolvidas na degradação do amido, bem como aumentos na atividade de enzimas envolvidas na síntese da sacarose. Chen et al. (2008) citam que tubérculos de batata constituem um ótimo sistema para estudar a regulação do metabolismo de carboidratos pela temperatura, pois fatores como as adaptações do metabolismo fotossintético à temperatura estão ausentes e porque as mudanças são induzidas rapidamente.

Em termos de qualidade para processamento, as altas concentrações de açúcares, principalmente das hexoses, glicose e frutose, são críticas, pois estes açúcares redutores influenciam diretamente na coloração dos produtos processados e, portanto, condicionam a sua aceitação pelos consumidores (YADA; MARANGONI; STANLEY, 1990; PEREIRA; COSTA, 1992; DALE; MACKAY, 1994; BRADSHAW; DALE; MACKAY, 2003). Os açúcares, quando submetidos a altas temperaturas, reagem inicialmente com compostos nitrogenados dos grupos α-aminoácidos. Seguem-se reações consecutivas e paralelas que formam uma grande faixa de

compostos de alto e baixo peso molecular, através das chamadas reações de Maillard (LEONG; WEDZICHA, 2000). Este escurecimento, durante o processamento, não altera apenas a coloração do alimento, tornando-o inaceitável comercialmente, mas também causa perda de aminoácidos e a geração de componentes cancerígenos e mutagênicos (GLOMB; PFAHLER, 2000).

Nos últimos anos, este processo tem atraído muita atenção devido à descoberta de que a acrilamida, uma potente neurotoxina altamente cancerígena, é formada a partir de asparagina e açúcares redutores através de um N-glicosídeo intermediário em uma reação paralela à reação de Maillard (MOTTRAM; WEDZICHA; DODSON, 2002; STADLER et al., 2002). Na batata frita a quantidade dos produtos com acrilamida é diretamente influenciada pelo teor de açúcares redutores dos tubérculos que é aumentada durante o armazenamento a baixas temperaturas (OLSSON; SVENSSON; ROSLUND, 2004; DE WILDE et al., 2005; WILLIAMS, 2005).

Segundo Melo (1999) e Pereira (2000), os teores de açúcares redutores nos tubérculos de batata indicados para o processamento na forma de fritura devem ser abaixo de 0,2%, sendo que valores acima deste geram produtos inadequados para o consumo.

A tendência em acumular maiores ou menores concentrações de açúcares redutores nos tubérculos é uma característica sujeita a uma influência do ambiente (STEVENSON et al., 1954; MELO, 1999). O tempo e as condições em que os tubérculos ficam armazenados em câmara fria influenciam diretamente na coloração da batata após a fritura, já que estas condições promovem a conversão de amido em glicose e frutose (DAVIES; VIOLA, 1992; SOWOKINOS; THOMAS; BURREL, 1997; COPP et al., 2000).

Em tubérculos armazenados a temperaturas abaixo de 6°C, verifica-se a transformação do amido em açúcares menores (sacarose, frutose e glicose) (DAVIES; VIOLA, 1992; ABREU et al., 2001; CHAPPER et al., 2002; CHAPPER et al., 2004). Em algumas cultivares de batata, o acondicionamento por um período de duas a quatro semanas a 20-24°C, após armazenamento em baixas temperaturas, resulta numa rápida diminuição dos açúcares redutores, melhorando a sua condição para a fritura (COELHO et al., 1999; CHAPPER et al., 2002). Contudo, o efeito do acondicionamento não reduz os teores de açúcares redutores em todos os genótipos (STEVENSON; CUNNINGHAM, 1961; AP REES; MORRELL, 1990).

O armazenamento a baixas temperaturas altera a composição lipídica das membranas plasmáticas celulares, o que produz um rápido aumento na atividade de diferentes enzimas envolvidas em etapas de várias vias bioquímicas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos e de carboidratos (GUY, 1990; TOMASHOW, 1990). Este fato indica que tanto as baixas como as altas temperaturas poderiam induzir à expressão diferencial de genes, sendo que as mudanças metabólicas produzidas pelo frio induzem à conversão da sacarose nos açúcares redutores glicose e frutose (ISHERWOOD, 1976; COPP et al., 2000).

Em teoria, estresse como o frio afeta a ótima funcionalidade de algumas enzimas glicolíticas, incrementando a concentração de hexoses fosfatos, resultando no estímulo da síntese de sacarose (DIXON; AP REES, 1980; AP REES et al., 1981; HAMMOND; BURRELL; KRUGER, 1990; VIOLA; DAVIES, 1994). Entre estas enzimas que são alteradas pela baixa temperatura, pode-se citar: a sacarose sintase (SuSy), a sacarose fosfato sintase (SPS), a uridina difosfato glicose pirofosforilase (UDP-GlcPPase), a adenosina difosfato glicose pirofosforilase (ADP-GlcPPase) e a invertase ácida solúvel (ABREU et al., 2001; CHAPPER et al., 2002; MENDES et al., 2005; BACARIN et al., 2005; CHAPPER et al., 2005).

Na Figura 1 está representada a rota metabólica dos principais açúcares e do amido em tubérculos de batata, onde podem ser visualizadas a síntese e a degradação do amido e suas interrelações com a glicólise, com a respiração mitocondrial e com a síntese e a degradação da sacarose.

A reação catalisada pela SuSy (EC 2.4.1.13) é reversível e, apesar do seu nome, pensava-se que ela atuava apenas na direção da síntese de sacarose (Figura 1). No entanto, as reações catalisadas pela SuSy dependem das concentrações de seus substratos, de forma que, sob certas condições a SuSy poderia atuar na degradação de sacarose (LUNN, 2002).

Diversos passos bioquímicos estão envolvidos na produção de amido (SOWOKINOS, 2001). A síntese de amido ocorre nos amiloplastos das células dos tubérculos de batata envolvendo ADP-GlcPPase (EC 2.7.7.27). A ADP-GlcPPase é a enzima chave na biossíntese de amido nas plantas, sendo central no controle da capacidade de dreno nas plantas armazenadoras de amido (PREISS, 1988). Pesquisas realizadas em plantas desprovidas de ADP-GlcPPase permitiram demonstrar que o conteúdo de amido diminui (MÜLLER-RÖBER; SONNEWALD; WILLMITZER, 1992).

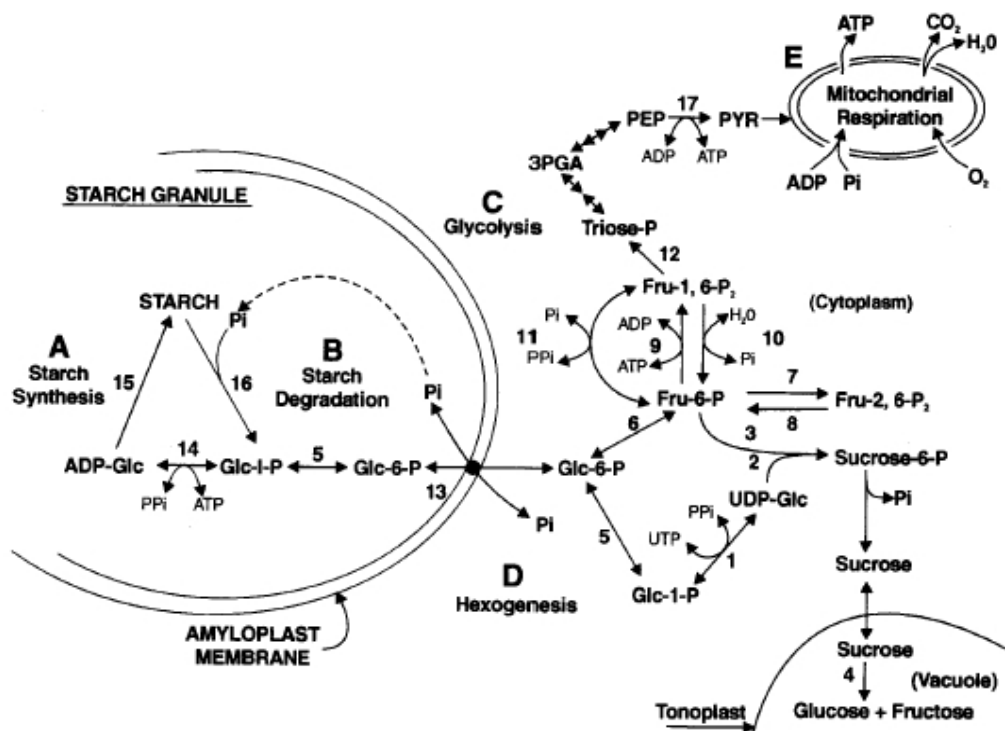


Figura 1- Metabolismo de carboidratos em tubérculos de batata. A- Síntese de amido, B- Degradação de amido, C- Glicólise D- Hexogênese e E- Respiração mitocondrial. As enzimas representadas são (1) UDP-GlcPPase, (2) SPS, (3) SuSy, (4) invertase ácida, (5) fosfoglucomutase, (6) fosfohexoseisomerase, (7) frutose-6-fosfato 2-quinase, (8) frutose-2,6-bisfosfatase, (9) ATP-fosfofrutoquinase, (10) frutose 1,6 difosfatase, (11) PPI-fosfofrutoquinase, (12) aldolase, (13) glicose-6-fosfato (translocadora de fosfatos), (14) ADP-GlcPPase, (15) amido sintase, (16) amido fosforilase, (17) piruvato quinase. Sowokinos (2001).

A ADP-GlcPPase em plantas superiores é uma enzima heterotetramérica, composta por duas subunidades distintas (OKITA et al., 1990), uma grande (51kDa) e outra menor (50kDa) (PREISS, 1997; BALLICORA; IGLESIAS; PREISS, 2004). A principal função da subunidade maior consiste em modular as propriedades regulatórias da subunidade menor, que é a principal enzima envolvida na catálise (BALLICORA; IGLESIAS; PREISS, 2004). Tendo como principal ativador a molécula 3-fosfoglicerato (3-PGA) e principal inibidor fósforo inorgânico (Pi), em organismos fotossintéticos, a razão $[3\text{-PGA}]/[\text{Pi}]$ regula alostericamente a reação catalisada pela ADP-GlcPPase e, dessa forma, a síntese de amido (PREISS, 1982; PRESS, 1988; FERNIE; WILLMITZER; TRETHERWEY, 2002). Evidências mostram que os genes

que codificam para a ADP-GlcPPase continuam a funcionar desde que se expressem seqüencialmente genes de outras enzimas responsáveis pela iniciação da síntese de amido: amido sintetase (EC 2.4.1.21) e a enzima de ramificação (EC 2.4.1.18), as quais permitem a síntese da amilose e da amilopectina (GEIGENBERGER et al., 1994).

A sacarose é o principal produto exportado da fotossíntese para abastecer a planta com carbono necessário à síntese de compostos e armazenamento de reservas, como o amido (CHEN et al., 2008). Quando as duas hexoses componentes da sacarose são dirigidas para formar amido, elas devem entrar inicialmente no *pool* das hexoses fosfatos (GOULD, 1988; SOWOKINOS, 1994; NAKATA; OKITA, 1994; HAJIRAZAEI et al., 2000). Esta conversão de sacarose a amido está associada, seqüencialmente, a duas enzimas: a primeira é a SPS (EC 2.4.1.14) e a segunda é a UDP-GlcPPase (EC 2.7.7.9).

A SPS é a enzima que se acredita ser a principal responsável pela biossíntese da sacarose (STITT; HUBER; KERR, 1987; HUBER, S.; HUBER, J.; McMICHAEL, 1992; HUBER, S.; HUBER, J., 1992), tanto em tecidos fotossintéticos como não fotossintéticos (HUBER, S.; HUBER, J., 1996). Em plantas, identificam-se várias isoformas que parecem ser, pelo menos em parte, funcionalmente distintas (LANGENKÄMPER et al. 2002; CHEN; HAJIREZAEI; BÖRNKE, 2005). A SPS catalisa a síntese de sacarose-6-fosfato (Sac-6-P), que é posteriormente hidrolisada pela sacarose-6-fosfato fosfatase (SPP) (EC 3.1.3.24) para a produção de sacarose e Pi (Figura 1) (LUNN; MACRAE, 2006; HOFIUS; BÖRNKE, 2007). Enquanto a reação é catalisada reversivelmente pela SPS, a reação catalisada pela SPP é essencialmente irreversível e a rápida hidrólise da Sac-6-P por parte da SPS desloca o equilíbrio da reação em direção à síntese de sacarose (STITT; HUBER; KERR, 1987).

A SPS apresenta como substrato a uridina difosfato glicose (UDP-Glc), a qual é formada pela ação da UGP-GlcPPase. Esta enzima é encontrada nas plantas na forma de monômeros de aproximadamente 50kDa (NAKANO et al., 1989) e apresenta-se predominantemente como proteína citosólica solúvel embora haja registros de atividade de UDP-GlcPPase ligada à membrana tanto em tecidos animais como vegetais (KLECZKOWSKI, 1994). A UDP-GlcPPase atua nas vias metabólicas de interconversão de pentose e glucoronato, metabolismo de galactose, metabolismo de nucleotídeos de açúcares e metabolismo do amido e sacarose

envolvidos na biogênese da parede celular. A atividade da UDP-GlcPPase em tubérculos de batata desperta interesse devido à habilidade desta enzima em promover o acúmulo de açúcares reduzidos durante o armazenamento a baixas temperaturas (SPYCHALLA et al., 1994; CIERESZKO et al., 2001).

A UDP-Glc é um metabólito chave devido à sua ação reversível, já que, quando a tendência na célula é a formação de sacarose, contribui com um resíduo de glicose para a frutose-6-fosfato (Fru-6-P) para formar Sac-6-P, a qual é imediatamente defosforilada à sacarose (BURRELL, 1994). Quando a sacarose entra no tonoplasto, pode alternativamente ser clivada pela enzima invertase ácida (EC 3.2.1.26), em glicose e frutose. Os açúcares livres produzidos nesta reação poderiam posteriormente ser fosforilados por uma enzima quinase apropriada, para tornar o processo reversível. As invertases e hexoquinases estão envolvidas na degradação da sacarose. Isto é baseado em observação de que a atividade da invertase ácida está inversamente correlacionada com os conteúdos de sacarose (AP REES, 1974; DAVIES; JEFFERIES; SCOBIE, 1989; HATZFELD; DANCER; STITT, 1990).

O metabólito UDP-Glc também pode entrar na rota de formação de Glc-1-P, a qual é, posteriormente, processada na forma de glicose-6-fosfato (Glc-6-P) pela enzima fosfoglucomutase plastidial (PGM, EC 5.4.2.2) (SHOTT et al., 1995) durante o processo de acúmulo de amido nas células.

A Glc-6-P é o único metabólito C6 ou C3 eficientemente transportado através da membrana do amiloplasto, para levar a cabo a síntese de amido (TAUBERGER et al., 2000). Para que UDP-Glc seja convertida a hexose fosfato, uma das bases da ligação fosfodiéster deve ser clivada. Posteriormente, quando a hexose fosfato é transportada para dentro dos amiloplastos, ocorre uma nova interconversão de Glc-6-P para Glc-1-P, que é o metabólito usado como substrato pela AGPase (NAKATA; OBITA, 1994).

A enzima citosólica frutose 1,6 difosfatase (FBPase, EC 3.1.3.11) catalisa a interconversão de frutose 1,6 difosfato (Fru-1,6-P₂) em Fru-6-P, para a síntese de Sac-6-P a partir da UDP-Glc pela UDP-GlcPPase e Fru-6-P, para, posteriormente, a Sac-6-P ser defosforilada produzindo o produto final, a sacarose (Figura 1). A adenosina trifosfato fosfofrutoquinase (ATP-PFK, EC 2.7.1.11) catalisa a conversão irreversível da Fru-6-P em Fru-1,6-P₂ e é considerada como a enzima reguladora da glicólise (BRYCE; HILL, 1993). Segundo Kruger, Hammond e Burrell (1988), durante

o armazenamento no frio de tubérculos de batata, diminui a atividade desta enzima, causando uma redução na proporção de substratos que entram na glicólise e, portanto, um aumento na quantidade de açúcares acumulados.

A pirofosfato fosfofrutoquinase (PPI-PFK, EC 2.7.1.90) é uma enzima capaz de realizar a fosforilação reversível de Fru-6-P usando pirofosfato (PPI) como doador de fósforo (KRUGER; HAMMOND; BURRELL, 1988). A estimulação da PPI-PFK para a formação de Fru-1,6-P₂ favorece a glicólise, enquanto que a reação reversa (formação de Fru-6-P) favorece a formação de sacarose. Trevanion e Kruger (1991) concluíram que qualquer restrição (e.g. frio) na interconversão de Fru-6-P e Fru-1,6-P₂ poderia contribuir para a acumulação de hexoses fosfatos e, subseqüentemente, levar a um incremento na síntese de sacarose. A conversão da Fru-6-P reversivelmente à Fru-1,6-P₂ tem sido proposta como um dos principais fatores que contribuem para acumulação de açúcar no frio em tubérculos de batata (MALONE et al., 2006).

3 Análise da expressão de mRNAs das enzimas

As técnicas hoje utilizadas na Biologia Molecular têm sido desenvolvidas a partir da pesquisa básica em diferentes campos da atividade científica (ATKINS; CLARK, 2004).

O trabalho de Watson e Crick, em 1953, onde foi proposta a estrutura de dupla fita do DNA marcou a revolução molecular. Em 1975, Nathans e Smith purificaram enzimas de restrição, ferramentas essenciais para a manipulação *in vitro* do DNA. Estas foram de fundamental importância para o isolamento e amplificação de fragmentos específicos de DNA para a clonagem *in vivo*, tecnologia desenvolvida a partir das técnicas de DNA recombinante descritas por Berg em 1972. Também em 1975 uma nova metodologia, denominada *Southern blotting*, começou a ser usada para investigar a localização de genes e marcou o início da aplicação destas tecnologias no estudo das doenças genéticas. Em 1977, técnicas de seqüenciamento permitiram a identificação de alterações específicas na seqüência de DNA e a associação destas com diferentes doenças genéticas. Depois disso, o principal marco no desenvolvimento das técnicas moleculares foi a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR- *Polymerase Chain Reaction*), um método de clonagem *in vitro* proposto por Kary Mullis em 1984 (MULLIS; FALLOONA, 1987).

A técnica PCR é uma metodologia poderosa para a amplificação, *in vitro*, de seqüências de DNA usando oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* de seqüência conhecida e complementares às extremidades do segmento a ser amplificado, direcionando a síntese de DNA alvo, em ciclos repetidos (MULLIS, 1990). Com o uso da tecnologia de PCR, moléculas simples de DNA podem ser seletivamente amplificadas em alguns milhões de vezes, em poucas horas (RASMUSSEN; RASMUSSEN, 1995). Desde sua concepção, esta tecnologia causou uma verdadeira revolução na Biologia, tanto na pesquisa visando o entendimento de processos biológicos fundamentais, como em áreas aplicadas, envolvendo diagnóstico e melhoramento genético de plantas (ANTONINI et al., 2004).

Dentre uma variedade de técnicas para analisar os ácidos nucléicos (DNA e RNA), destacam-se: técnica de hibridização do tipo *dot* ou *blot*, *Southern* e *Northern*, e hibridização *in situ*; técnicas de amplificação de alvos-específicos como a PCR, PCR competitiva, PCR-transcriptase reversa (RT-PCR) e a PCR em tempo-real; métodos de amplificação de sinal, como por exemplo, *branched DNA* (bDNA); tecnologia de *arrays* (MOLINA; TOBO, 2004).

A transcrição reversa associada à reação de PCR, RT-PCR, literalmente revolucionou o estudo da expressão gênica. Esta técnica se baseia na síntese de cDNA sobre um molde de mRNA realizada pela enzima transcriptase reversa, seguida de amplificação por meio de PCR. Através desta técnica é possível detectar os transcritos de qualquer gene, independente da quantidade de material inicial. Na reação de RT-PCR, RNA molde é duplicado com a geração de uma fita de DNA complementar (cDNA) através da enzima transcriptase reversa. A seqüência de cDNA de interesse é então amplificada exponencialmente usando PCR. A detecção dos produtos de PCR é realizada através de gel de poliacrilamida (SHOHAM et al., 1996).

No presente trabalho se teve por objetivo avaliar métodos de isolamento de RNA, visando aperfeiçoar a extração em tecido rico em polissacarídeos e analisar a expressão dos genes que codificam as enzimas SPS, SuSy, ADP-GlcPPase e UDP-GlcPPase, em tubérculos de dois genótipos de batata, em nível transcricional, em resposta ao armazenamento sob baixas temperaturas por RT-PCR.

CAPÍTULO I

COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE RNAs TOTAIS DE TUBÉRCULOS DE BATATA

1 INTRODUÇÃO

Estudar expressão gênica em órgãos de reserva vegetal pode ser tecnicamente complexo devido à grande quantidade de polissacarídeos e compostos polifenólicos que se acumulam durante o amadurecimento e/ou em resposta a estímulos ambientais (MEISEL et al., 2005). Vários métodos para isolamento de RNAs vegetais são comumente desenvolvidos e usados (CHIRGWIN et al., 1979; LOGEMANN; SCHELL; WILLMITZER, 1987), face a dificuldade de apenas um método de isolamento de ácidos nucléicos ser eficiente para todos os tecidos vegetais.

Mesmo espécies vegetais pertencentes ao mesmo gênero ou de gêneros relacionados podem exibir enorme variação, pois as composições dos tecidos vegetais de diferentes espécies variam consideravelmente. A heterogeneidade entre

as espécies não permite um bom rendimento de RNA isolado por um mesmo método e, talvez, até mesmo espécies estreitamente relacionadas podem exigir diferentes protocolos (WEISHING et al., 1995). Além disto, tecidos vegetais de espécies de relevante interesse econômico, como os encontrados em muitas sementes, frutas, tubérculos, acumulam grandes quantidades de polissacarídeos, o que complica o isolamento e a boa qualidade das moléculas de RNAs. Dal Cin et al. (2005) relataram que os resultados da extração de RNAs em tecidos de maçã e pêsego variam de acordo com o estágio de maturação dos frutos.

O isolamento de RNAs de alta qualidade é essencial no processo de descoberta de novos genes e no estudo da expressão temporal de genes durante o desenvolvimento das plantas. A estabilidade das moléculas de RNAs e a presença de RNases tornam altamente suscetível a degradação. Por exemplo, tecidos provenientes de frutos maduros contêm altos níveis de compostos fenólicos, polissacarídeos que contaminam RNAs purificados ou causam o baixo rendimento na extração. A obtenção de RNAs intactos de alta qualidade é um dos passos mais importantes nos experimentos de Biologia Molecular, incluindo RT-PCR (CORRENT, 2007).

Segundo Meisel et al. (2005), compostos polifenólicos e polissacarídeos, muitas vezes, co-precipitam e contaminam os RNAs durante sua extração, afetando assim a qualidade e a quantidade do RNA isolado. Polissacarídeos tendem a precipitar juntamente com os RNAs na presença de alcoóis, permanecendo como contaminantes nos extratos finais e interferindo nos passos posteriores (CARRA; GAMBINO; SCHUBERT, 2007). Quanto maior a quantidade de açúcares presentes nos tecidos vegetais, maiores as dificuldades de extração de RNAs para utilização nas técnicas de *Northern blot*, transcrição reversa, eletroforese e purificação de mRNA (LOPEZ-GOMEZ; GOMEZ-LIM, 1992; MITRA; KOOTSTRA, 1993; WAN; WITKINS, 1994).

Para resolver estes problemas, uma série de métodos que visam o estudo comparativo das transcrições de genes codificantes de proteínas, têm sido desenvolvidos. Muitos destes métodos englobam etapas de precipitação com cloreto de lítio (LiCl₂) (SALZMAN et al., 1999; VICIENT; DELSENY, 1999) ou etapas que utilizem baixas concentrações de álcool na presença de tampões (SHARMA; GILL; SINGH, 2003; LI; TRICK, 2005) que, ao mesmo tempo em que isola com eficácia os polissacarídeos, resulta em boa recuperação de pequenas moléculas de RNA.

Entretanto, a separação dos açúcares dos RNAs sendo realizada através da precipitação com LiCl_2 , álcool, bem como com o uso de etileno glicol monobutil eter (BE) ou cloreto de cério (CsCl) seguida de centrifugação (LOPEZ-GOMEZ; GOMEZ-LIM, 1992; MITRA; KOOTSTRA, 1993), tornam a extração de RNA demorada, além de incluírem perigosos reagentes químicos que também podem aumentar as degradações de RNAs. Em frutos de maçã, um dos fatores limitantes em experimentos de biologia molecular é a extração de RNAs de alta qualidade e em quantidade suficiente, indispensáveis para reações de RT-PCR e construção de bibliotecas de cDNAs (CORRENT, 2007).

Outros métodos baseados no uso de brometo de cetil-trimetilamônio (CTAB) têm sido desenvolvidos para a extração de RNAs de tecidos que contenham elevados níveis de polissacarídeos e fenóis (CHANG et al., 1993; MALNOY et al., 2001; JAAKOLA et al., 2001; ZENG; YANG, 2002; HU et al., 2002). O método CTAB, originalmente desenvolvido para tecidos de *Pinus*, (CHANG et al., 1993), tem sido utilizado para extrair, a partir de uma ampla gama de tecidos vegetais ricos em polissacarídeos e polifenóis, RNAs de grande variedade de espécies, incluindo *Arabidopsis*, batata doce, e, em uma versão adaptada, e de uva (IANDOLINO, 2004).

Dentre alguns métodos indicados para a extração de RNAs de tecidos vegetais ricos em polissacarídeos encontram-se os métodos descritos por Bugos et al. (1995), Chang et al. (1993) e Meisel et al. (2005) que se baseiam na precipitação diferencial com o uso de LiCl_2 . Além disso, dois reagentes extratores comercialmente disponíveis *TRIzol® Reagent* (Invitrogen™) e *Concert™ Plant RNA Reagent* (Invitrogen™), podem ser usados para extrair RNAs totais de tecidos vegetais.

Devido à grande quantidade de polissacarídeos e compostos polifenólicos que se acumulam em tubérculos de batata, o objetivo deste experimento foi testar métodos de isolamento de RNAs totais de dois genótipos de batata.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Foram utilizados tubérculos de batata dos clones C-1786-6-84 e C-1881-16-97 produzidos no campo experimental da Embrapa Clima Temperado, Pelotas - RS (31° 52' S e 51° 21' W). Os tubérculos do clone C-1786-6-84 foram descascados, triturados e divididos em subamostras de 10g, que foram imediatamente congeladas e liofilizadas por aproximadamente 20h até obtenção de massa constante, constituindo as amostras liofilizadas.

Os tubérculos de batata do clone C-1881-16-97 foram transferidos ao Laboratório de Biotecnologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, onde foram descascados e dos quais, com auxílio de um vazador de metal, foram retirados pedaços em formato cilíndrico de 10mm de diâmetro por 10mm de profundidade, constituindo, desta forma, as amostras *in natura*. Depois de retiradas, as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, acondicionadas em microtubos de 1,5mL e armazenadas a -87°C, até o momento das extrações.

As amostras liofilizadas e *in natura*, foram destinadas à comparação qualitativa de isolamento de RNAs através de três métodos de precipitação diferencial com o uso de cloreto de lítio (LiCl₂), segundo metodologia descrita por Bugos et al. (1995), Chang et al. (1993) e Meisel et al. (2005). Também se comparou o isolamento de RNAs totais utilizando-se reagentes comercialmente disponíveis *TRIzol® Reagent* (Invitrogen™) e *Concert™ Plant RNA Reagent* (Invitrogen™) seguindo-se metodologia descrita pelo fabricante.

2.2 Extração de RNAs totais

As extrações de RNAs totais das amostras do clone C-1881-16-97 *in natura* foram conduzidas macerando-se 100mg do tecido vegetal em almofariz com nitrogênio líquido. Das amostras liofilizadas do clone C-1786-6-84, utilizou-se 3mg. As amostras foram acondicionadas em microtubos de 2,0mL, seguindo-se procedimentos específicos de cada protocolo.

2.2.1 Método Bugos

Aos microtubos com as amostras, sob capela de fluxo laminar, foram adicionados 400µL de tampão de extração [Tris-HCl 100mM, pH 9,0; NaCl 200mM; EDTA 15mM e SDS 0,5% (p/v), pré-aquecido a 65°C], 2,3µL de β-mercaptoetanol, 400µL de fenol e 80µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Os microtubos foram homogeneizados em vórtex por 2min. Em seguida, acrescentou-se 28µL de acetato de sódio 3M e homogeneizou-se novamente por um minuto. As amostras foram incubadas em gelo por 15min e, em seguida, centrifugadas a 16.000 x g por 10min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo, ao qual foi acrescentado 400µL de fenol e 800µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1, v/v).

Após homogeneização em vórtex por 2min e centrifugação a 16.000 x g por 5min a 4°C, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, ao qual foi acrescentado 500µL de isopropanol. As amostras foram incubadas a -20°C por 1h, e então, centrifugadas a 10.000 x g por 10min a 4°C, sendo o sobrenadante removido. Adicionou-se ao precipitado 500µL de etanol 70% e centrifugou-se a 10.000 x g por 5min a 4°C. Novamente, o sobrenadante foi removido e o precipitado foi mantido à temperatura ambiente. Foram acrescentados 82,5µL de água ultra pura ao precipitado, sendo mantido por 10min em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se LiCl₂ 8M para uma concentração final de 2,5M. Os tubos foram mantidos a 4°C por 12h. Após a centrifugação a 14.000 x g por 10min a 4°C e posterior descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado com 500µL de etanol 70% (v/v). A amostra foi centrifugada a 10.000 x g por 5min a 4°C e o sobrenadante descartado. Esse último procedimento foi repetido mais uma vez. O precipitado permaneceu em temperatura ambiente até secar e foi ressuscitado em 30µL de

UltraPure™ DEPC-treated Water (Invitrogen™). O RNA foi incubado por 10min à temperatura ambiente antes de ser armazenado à -20°C.

2.2.2 Método Chang

Aos microtubos com as amostras, sob capela de fluxo laminar, foram adicionados 800µl de tampão de extração [Tris-HCl 100mM, pH 8,0; NaCl 200mM; EDTA 25mM; PVP 2% (v/v) e CTAB 2,0% (p/v), pré-aquecido a 65°C]. Os microtubos foram homogeneizados em vórtex por 2min e em seguida, mantidos a 65°C por 15min. Após, adicionou-se 800µL fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1, v/v). Os microtubos foram mantidos à temperatura ambiente sob agitação por 10-15min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x *g* por 10min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo, ao qual foi acrescentado 75µL (~ 1/4 do volume do sobrenadante) de LiCl₂ a partir de um estoque de 10M. As amostras permaneceram a 4°C por 12h, para precipitação.

No dia seguinte, os microtubos contendo as amostras foram centrifugados a 14.000 x *g* por 45min à 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado duas vezes com 300µL de álcool 70% (v/v), centrifugando-se após cada lavagem (14.000 x *g*, 4°C, 10min). Em seguida, os microtubos foram mantidos abertos à temperatura ambiente para que os precipitados secassem. Os precipitados foram ressuspensos em 30µL de água ultra pura, mantidos por 10min em temperatura ambiente. Após este período, adicionou-se LiCl₂ 8M para uma concentração final de 2,5M. Os microtubos foram mantidos por 12h a 4°C, com posterior centrifugação a 14.000 x *g* por 10min a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500µL de etanol 70% (v/v). A amostra foi centrifugada a 10.000 x *g* por 5min a 4°C e o sobrenadante descartado. Esse último procedimento foi repetido mais uma vez. O precipitado permaneceu em temperatura ambiente até secar e foi ressuspensionado em 30µL de *UltraPure™ DEPC-treated Water* (Invitrogen™). O RNA foi mantido por 10min à temperatura ambiente antes de ser armazenado a -20 °C.

2.2.3 Método Meisel

Aos microtubos com as amostras, sob capela de fluxo laminar, foram adicionados 700µL de tampão de extração [Tris-HCl 100mM, pH 8,0; NaCl 200mM; EDTA 25mM; PVP 2% (v/v); CTAB 2,0% (p/v); espermidina 0,05% (p/v) e β-mercaptoetanol 2% (v/v), pré-aquecido a 65°C]. Os microtubos foram homogeneizados em vórtex por 2min e mantidos a 65°C por 15min. Em seguida, adicionou-se 700µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1, v/v) e as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 20min a 4°C. O sobrenadante foi recolhido (~ 400µL) e transferidos para novo microtubo, ao qual foi acrescentado igual quantidade de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1, v/v). Os microtubos foram centrifugados a 12.000 x g por 20min a 4°C. O sobrenadante foi recolhido (~ 300µL) e adicionado de LiCl₂ 10M para uma concentração final de 2,5M (~ 1/4 do volume do sobrenadante), sendo em seguida homogeneizados em vórtex.

As amostras foram mantidas a 4°C por 12h. Decorrido este período, os microtubos foram centrifugado a 12.000 x g por 35min a 4°C e, em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500µL de SSTE (NaCl 100mM; SDS 0,5%; Tris-HCl 100mM, pH 8,0; EDTA 100mM, pH 8,0). Em seguida, foi adicionado 500µL de clorofórmio. Os microtubos foram homogeneizados e centrifugados a 14.000 x g por 10min a 4°C, sendo recolhido o sobrenadante e a este acrescentados 1000µL de etanol 100%. Precipitou-se o RNA a -80°C por 30min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 20min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol a 75% (v/v). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 10min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado mantido à temperatura ambiente até secar e ser ressuscitado em 30µL de *UltraPure™ DEPC-treated Water* (Invitrogen™) e armazenado a -20 °C.

2.2.4 *TRizol*® Reagent (Invitrogen™)

Aos microtubos com as amostras, sob capela de fluxo laminar, foram adicionados 700µL de *TRizol* resfriado a 4°C. Os microtubos foram mantidos em temperatura ambiente por 5min. Em seguida, foram acrescentados 140µL de clorofórmio gelado às amostras que foram homogeneizadas em vórtex e mantidas à temperatura ambiente por 3min. Após foram centrifugadas por 15min a 12.000 x g a 4°C. Recuperou-se o sobrenadante (~ 300µL) em outros microtubos e foram

adicionados 350µL de isopropanol gelado, sendo os mesmos mantidos em temperatura ambiente por 10min. Concluído este período, as amostras foram centrifugadas a 12000 x *g* por 10min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado adicionado de 700µL de etanol 75% (v/v) gelado. Em seguida, os microtubos foram centrifugados em 9.800 x *g* por 5min a 4°C. O sobrenadante foi eliminado, deixando-se o precipitado secar em temperatura ambiente em estufa de circulação forçada de ar por 15min e posteriormente adicionado de 30µL de *UltraPure™ DEPC-treated Water* (Invitrogen™).

2.2.5 Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen™)

Aos microtubos com as amostras foram adicionados 500µL de *Concert* resfriado a 4°C. Em seguida as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 5min. Decorridos estes minutos, as amostras foram centrifugadas por 2min a 12.000 x *g*, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo ao qual foi adicionado 100µL de NaCl 5M para clarificar o extrato e 300µL de clorofórmio. Os tubos foram homogeneizados manualmente e centrifugados por 10min a 12.000 x *g* a 4°C, para separar as fases. A fase superior aquosa foi coletada e depositada em um novo microtubo, descartando-se o restante. Após, adicionou-se igual volume de isopropanol e as amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 10min. Concluído este período foram centrifugadas por 10min a 12.000 x *g* a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e adicionado ao microtubo, 1mL de etanol à 75% (v/v), tomando o cuidado para não perder o *pellet*. Novamente os tubos foram centrifugados por 1min a 12.000 x *g* a 4°C e após foi desprezado o líquido tomando-se o cuidado para não perder o *pellet*. O RNA isolado foi mantido por 10min em temperatura ambiente em estufa de circulação forçada de ar por 15min, ressuspenso em 30µL de *UltraPure™ DEPC-treated Water* (Invitrogen™) e, em seguida, armazenado a -20°C.

2.3 Estimativas da quantidade e qualidade dos RNAs totais

A quantidade das amostras de RNA total foi realizada por espectrofotometria (*Ultrospect® 2000 Pharmacia*), sendo a concentração calculada para uma cubeta de 10mm, através da fórmula:

$$\text{RNA} = \frac{F_c \times F_d \times A_{260}}{1000}$$

Onde: A_{260} é a absorbância da amostra sob o comprimento de onda 260nm; F_c é o fator de conversão no qual uma unidade (1U) de absorbância a 260nm corresponde a $40\mu\text{g mL}^{-1}$ de RNA (SAMBROOK; RUSSELL, 2001); F_d corresponde ao fator de diluição da amostra de leitura no espectrofotômetro, no caso 100 [$10\mu\text{L}$ de amostra em $990\mu\text{L}$ de água ultra pura tratada com DEPC 0,01% (v/v)] (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998); o resultado da multiplicação foi dividido por mil para obter-se a concentração em $\mu\text{g }\mu\text{L}^{-1}$.

A comparação da eficiência dos cinco métodos de extração de RNAs totais de tubérculos de batata foi feita individualmente pela avaliação dos produtos de RT-PCR em gel de agarose. A quantidade e a qualidade dos RNAs isolados foram estimadas procedendo-se à leitura espectrofométrica. Mediu-se a absorbância em dois comprimentos de onda 260nm ($A_{260\text{nm}}$) e 280nm ($A_{280\text{nm}}$). A quantidade de RNA total presente nas soluções foi estimada em $A_{260\text{nm}}$. No comprimento de onda de 280nm mediu-se a quantidade de polifenóis das amostras. A pureza das amostras foi medida pela razão entre as leituras $A_{260\text{nm}}$ e $A_{280\text{nm}}$.

A qualidade do RNA extraído foi observada através de eletroforese em gel de agarose (*Gibco®/BRL*) a 0,7%, em tampão TAE 0,5 x ($24,2\text{g}$ de Tris base; $5,71\text{mL}$ de ácido acético glacial; 10mL de EDTA 0,5M, pH 8,0 e água ultra pura tratada com DEPC), segundo protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001). O gel foi submetido à corrente de 80V por 50min, tendo como marcador de peso molecular *DNA Ladder® 1kb* (Invitrogen™), todos acrescidos de tampão de carregamento [glicerol 50% (p/v) (H_2O DEPC); EDTA 10mM (pH 8,0); 25mg de azul de bromofenol]. As moléculas de RNAs foram visualizadas por meio de coloração com brometo de etídio (10mg mL^{-1}) em transiluminador-UV e fotografado e analisado através do sistema de fotodocumentação computadorizado para análise de gel (*Kodak Digital Science 1D-EDAS 120*).

2.4 Análise estatística

Foram comparados neste experimento cinco métodos de extração de RNA total, em dois tipos de preparo das amostras (liofilizadas e *in natura*) sendo utilizadas três repetições por método, cada uma constituída por um microtubo de reação. Analisaram-se os efeitos da aplicação dos cinco métodos sob a razão espectral e rendimento de RNA. Estas variáveis foram avaliadas quanto a sua significância segundo o teste de F e suas médias analisadas através do teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estimativa da pureza dos RNAs totais obtidos através dos cinco métodos aplicados apresentaram valores que variaram, em média, de 1,76 a 2,26 (Tabela 1). Brasileiro e Carneiro (1998) consideram moléculas de RNA livre de impurezas quando, em solução, apresentarem razão $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ entre o intervalo de 1,8 a 2,0. De acordo com os autores, razão menor a este intervalo significa contaminação com proteínas, razão maior indica contaminação com fenol. As razões espectrais de RNAs totais oriundas do clone C1786-6-84 apresentaram diferença significativa entre os métodos de extração de RNA, sendo os métodos Meisel, Concert e *TRizol*, os mais indicados para isolamento de RNA em material liofilizado. Já os métodos *TRizol*, Bugos e Chang, não diferiram estatisticamente, entretanto apresentaram médias da razão espectral não indicadas para a síntese de cDNA e posterior amplificação por RT-PCR, visto que tal razão deve apresentar valores compreendidos entre o intervalo já mencionado. Kim e Hamada (2005), também utilizando o método Chang, com tampão de extração CTAB 2% (p/v), porém adaptado, obtiveram em todas as amostras de tubérculos de batata-doce, razão $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ superior a 2,0, indicando possíveis contaminações por polifenóis que interferem no processo de extração de RNA.

Para as extrações de RNAs totais provenientes do clone C-1881-16-97 (material *in natura*), os valores das razões $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ não diferiram estatística para os métodos testados. O valor da média das razões espectrais obtidas deste clone foi de 2,0, indicando que os métodos poderiam extrair e purificar RNAs totais para estudo da expressão de genes durante o armazenamento de frutos *in natura* (Tabela 1). A razão $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ obtida testando-se o método Bugos em tecido *in*

natura deste clone, apresentou valor semelhante ao obtido, aplicando-se este mesmo método, no isolamento de RNAs totais de polpa de maçã cv. Fuji (CORRENT, 2007).

Tabela 1- Razão espectral do RNA total de tubérculos de batata isolados através de diferentes métodos

Métodos	Razão A_{260nm}/A_{280nm}	
	C-1786-6-84 (liofilizado)*	C-1881-16-97 (<i>in natura</i>)
Meisel et al., (2005)	1,867 a	1,767 ns
<i>Concert™ Plant RNA</i>	1,900 ab	2,033
<i>TRIzol®</i>	2,067 abc	1,967
Bugos et al. (1995)	2,167 bc	2,100
Chang et al. (1993)	2,267 c	2,167
Média	2,053	2,007
CV	5,03	8,14

* Médias seguidas de letras distintas, na coluna, diferem pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

ns- não significativo pelo teste F.

O rendimento de RNAs totais obtidos de tubérculos de batata variou em média, apresentando diferenças estatísticas significativas devido aos métodos testados em ambos os clones (Tabela 2). Segundo Kim e Hamada (2005), um método eficiente de extração de RNA é julgado pela qualidade, rendimento e integridade do RNA isolado. Desta forma, os métodos *Concert* e *TRIzol* que, em média, não diferiram estatisticamente entre si no clone C-1786-6-84, apesar de purificar baixa quantidade de RNA, ainda seriam os mais indicados para isolar RNAs destinados à reação de amplificação por RT-PCR por apresentarem, em média, valores recomendáveis da razão A_{260nm}/A_{280nm} ($1,8 \leq \text{valores} \leq 2,0$) (Tabela 1). O material proveniente do clone C-1786-6-84 (material liofilizado) apresentou elevada variação da quantidade de RNAs obtidas nos cinco métodos (Tabela 2). Tal fato pode ter ocorrido devido, possivelmente, à desidratação do tecido, pela liofilização, favorecer a concentração de polissacarídeos e polifenóis que, dificultam o isolamento das moléculas de RNA, reduzindo, conseqüentemente, o rendimento em $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de RNAs, tornando necessária a aplicação de métodos altamente eficientes no que se refere ao isolamento e purificação desta molécula.

As concentrações em $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de RNAs totais provenientes do clone C-1881-16-97 (*in natura*) obtidas aplicando-se os métodos *Concert* e *TRIzol*, não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 2). A aplicação dos cinco métodos permitiu observar diferentes respostas quanto à eficiência de cada método no isolamento de RNA em tubérculos de batata. No entanto, o material liofilizado foi o que apresentou menor razão $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$, garantindo assim, possivelmente, menor quantidade de compostos contaminantes (Tabela 1). Aygan (2006) salienta que, para isolar ácidos nucleicos, RNA ou DNA, essas moléculas devem ser extraídas e purificadas dos demais componentes celulares que possam interferir nas reações de amplificação.

Tabela 2- Rendimento de RNA total em $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de tubérculos de batata isolados através de diferentes métodos

Métodos	$\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ (a)	
	C-1786-6-84 (liofilizado)*	C-1881-16-97 (<i>in natura</i>)
<i>Concert™ Plant RNA</i>	1,533 a	1,862 a
<i>TRIzol®</i>	2,000 ab	2,567 a
Meisel et al. (2005)	4,500 bc	7,300 b
Bugos et al. (1995)	6,433 c	7,467 b
Chang et al. (1993)	6,567 c	7,500 b
Média	4,207	6,405
CV	24,66	19,74

$$^a[\text{RNA}] = F_c \times F_d \times 40 \mu\text{g mL}^{-1} \times 1000^{-1}$$

* Médias seguidas de letras distintas, na coluna, diferem pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

A integridade do RNA foi visualizada em gel de agarose que mostrou, qualitativamente, o isolamento destas moléculas provenientes de ambos os clones, através da RT-PCR. Sendo a transcrição reversa altamente sensível às impurezas, os diferentes métodos utilizados para extração de RNA total em tubérculos de batata liofilizados e *in natura* apresentaram diferentes perfis eletroforéticos. Através dos perfis eletroforéticos obtidos, observou-se que o alto rendimento em $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de RNA resultaram em perfis com alta concentração desta molécula, no entanto, observa-se também que apesar desta molécula ter sido isolada, a integridade das mesmas não foi obtida em todos os métodos aplicados (Figuras 2 a 6).

O método de precipitação diferencial de RNA com LiCl_2 conforme descrito por Bugos et al. (1995), apresentou perfil eletroforético mostrado na Figura 2. Na

visualização deste perfil observa-se que a integridade das moléculas de RNA não foi mantida pelo método Bugos devido à formação de “arrastes” que indicam que houve degradação do RNA. Resultados semelhantes foram obtidos por Oster (2004) utilizando o método Bugos para a extração de RNA de maçãs. Observou-se ainda a presença de bandas de alto peso molecular (Figura 2), provavelmente sendo moléculas de DNA. A baixíssima intensidade das bandas visualizadas sugere que este método de precipitação diferencial por LiCl_2 não se aplica a tubérculos de batata *in natura*, tecido rico em polissacarídeos, bem como a tecidos liofilizados (Figura 3).

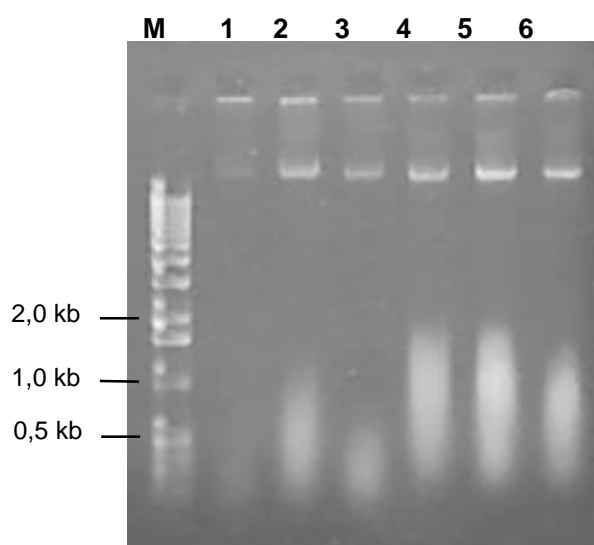


Figura 2- Perfil eletroforético em gel de agarose do RNA total de tubérculos de batata dos clones C-1786-6-84 e C-1881-16-97 extraídos pelo método de precipitação diferencial com LiCl_2 conforme descrito por Bugos et al. (1995). M- Marcador de peso molecular *DNA Ladder@ 1kb* (Invitrogen™); 1 a 3- repetições de RNAs totais de tubérculos de batata liofilizados do clone C-1786-6-84; 4 a 6- repetições de RNAs totais de tubérculos de batata *in natura* do clone C-1881-16-97.

A extração de RNA total pelo método de precipitação diferencial com LiCl_2 , segundo descrito por Chang et al. (1993), não isolou RNA total de tubérculos de batata do clone C-1786-6-84. A razão espectral $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ do RNA total destes tubérculos liofilizados apresentaram, em média, os valores mais elevados, indicando alta presença de compostos interferentes que, possivelmente, degradaram as moléculas de RNA durante a extração. Segundo Sharma, Gill e Singh (2003), degradações do RNA por ribonucleases (RNases), reduzem significativamente a quantidade de moléculas de RNA intactas (Figura 3).

Entretanto, este método pode ser indicado a tecido *in natura* de tubérculos de batata. As soluções de RNA total do clone C-1881-16-97 apresentaram no perfil eletroforético bandas de alto peso molecular, possivelmente moléculas de DNA. Porém, a integridade das moléculas de RNA não foi mantida. A presença de “arrastes” neste perfil eletroforético confirma tal fato. As moléculas foram isoladas pelo método Chang, no entanto, durante a extração, as mesmas foram degradadas por compostos como polissacarídeos que não foram eliminados e interferiram no isolamento do RNA (Figura 3).

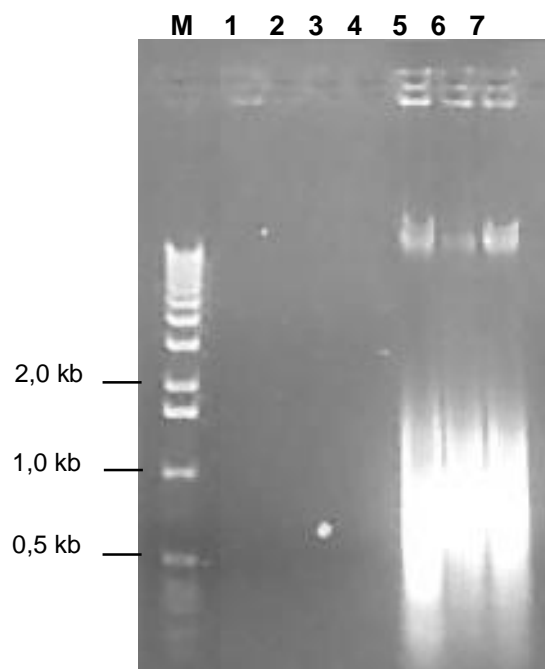


Figura 3- Perfil eletroforético em gel de agarose do RNA total de tubérculos de batata dos clones C-1786-6-84 e C-1881-16-97 extraídos pelo método de precipitação diferencial com LiCl_2 conforme descrito por Chang et al. (1993). M- Marcador de peso molecular *DNA Ladder@ 1kb* (Invitrogen™); 1 a 4- repetições de RNAs totais de tubérculos de batata liofilizados do clone C-1786-6-84; 5 a 7- repetições de RNAs totais de tubérculos de batata *in natura* do clone C-1881-16-97.

Aplicando-se o método de Meisel et al. (2005), detectou-se fragmentos de 0,25kb, aproximadamente, indicando a presença de RNAs neste perfil eletroforético (Figura 4). E quantitativamente, a razão espectral $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ do RNA total deste clone aplicando-se tal método, foi, em média, a recomendada para construção de cDNAs por meio de RT-PCR (Tabela 1).

Observa-se também, em baixa intensidade, entretanto, fragmentos de semelhante tamanho nas colunas 2 e 3, mostrando uma homogeneidade nos

padrões de bandas formadas. Uma banda de alto peso molecular foi visualizada na coluna 1, não havendo, entretanto detecção de RNA.

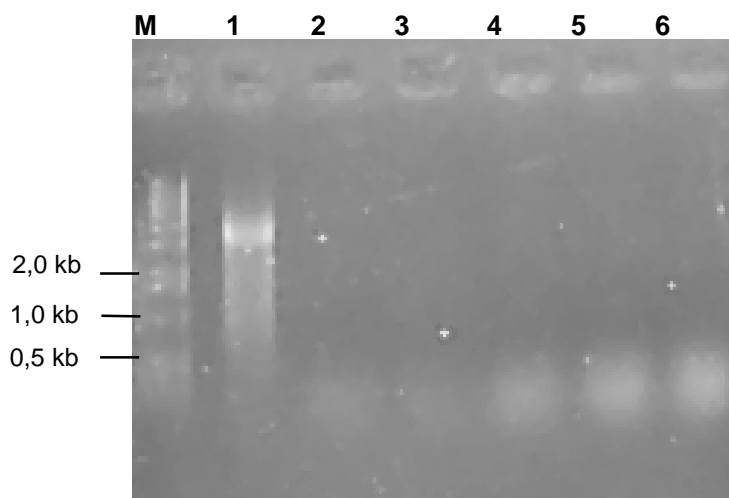


Figura 4- Perfil eletroforético em gel de agarose do RNA total de tubérculos de batata dos clones C-1786-6-84 e C-1881-16-97 extraídos pelo método de precipitação diferencial com LiCl_2 conforme descrito por Meisel et al. (2005). M- Marcador de peso molecular *DNA Ladder® 1kb*; 1 a 3- repetições de RNAs totais de tubérculos de batata liofilizados do clone C-1786-6-84; 4 a 6- repetições de RNAs totais de tubérculos de batata *in natura* do clone C-1881-16-97.

As moléculas de RNA total, extraídas aplicando-se o reagente *Concert™ Plant RNA Reagent* (Invitrogen™), segundo instruções do fabricante, apresentaram no perfil eletroforético, fragmentos de 1,0kb, 0,8kb e 0,25kb, aproximadamente, com alta purificação do RNA total em ambos os materiais. A detecção destes fragmentos de RNA foi uniforme para ambos os clones, indiferentemente do material utilizado (liofilizados ou *in natura*) (Figura 5). Este fato também foi verificado pelo alto rendimento em $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de RNA total obtido por este método para ambos os clones. Tanto a concentração de RNA do clone C-1786-6-84 quanto à concentração do clone C-1881-16-97, ambas foram, em média, semelhantes e diferiram significativamente dos demais métodos, apesar de não apresentarem diferença estatística da concentração obtida pelo método *TRizol* (Tabela 2).

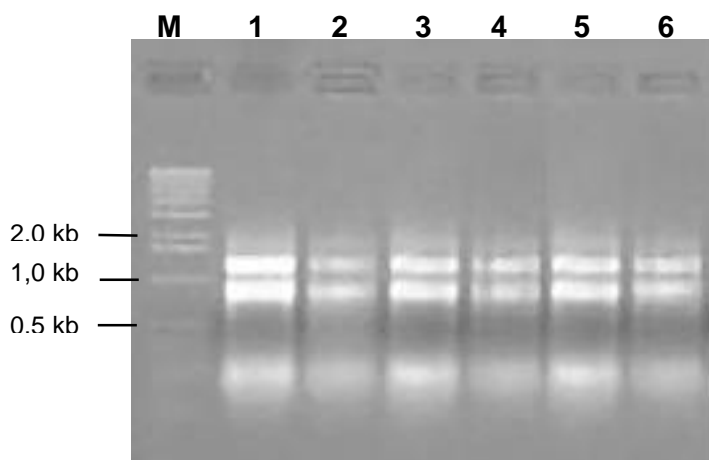


Figura 5- Perfil eletroforético em gel de agarose do RNA total de tubérculos de batata dos clones C-1786-6-84 e C-1881-16-97 extraídos utilizando-se *Concert™ Plant RNA Reagent*. M- Marcador de peso molecular *DNA Ladder® 1kb* (Invitrogen™); 1 a 3-repetições de RNAs totais de tubérculos de batata liofilizados do clone C-1786-6-84; 4 a 6- repetições de RNAs totais de tubérculos de batata *in natura* do clone C-1881-16-97.

Em trabalhos com polpa de maçã, cv. Fuji, em estágio avançado de maturação, utilizando-se os métodos Bugos e *Concert* para extração de RNA total, permitiu-se demonstrar que, para ambos os métodos empregados, a quantidade de RNA foi baixa, sendo a quantidade de RNA obtida através do método *Concert* superior a obtida através do método Bugos (CORRENT, 2007).

O *Concert™ Plant RNA* da Invitrogen™ é um extrator que possui como propriedade o isolamento de RNA total de alta qualidade a partir de tecidos vegetais, especialmente aqueles ricos em amido e polifenóis. O uso do *Concert* resulta em alto rendimento e qualidade elevada de RNA total dos tecidos vegetais, tais como tubérculos de batata, *pinus* e folhas de tomate (CONNOLLY et al., 2006).

O perfil eletroforético obtido pela extração dos RNAs com o *TRIZOL® Reagent* (Invitrogen™) sofreu interferência de compostos que não foram eliminados durante a extração, ocorrendo um “arraste” no perfil eletroforético em ambos os materiais. Entre as amostras liofilizadas do clone C-1786-6-84, pode-se observar a formação de fragmentos de aproximadamente 1,0kb e 0,8kb. Para as amostras de RNA *in natura* do clone C-1881-16-97 verifica-se que o “arraste” foi mais intenso e que em apenas uma das amostras houve formação de fragmentos de 0,8kb, aproximadamente. Segundo Logemann, Schell e Willmitzer (1987) e Asif, Dhawan e Nath (2000), compostos como polissacarídeos, polifenóis e outros metabólitos secundários possuem a tendência de co-precipitarem com o RNA devido as suas

propriedades físico-químicas similares, afetando a quantidade das amostras obtidas e a qualidade (Figura 6).

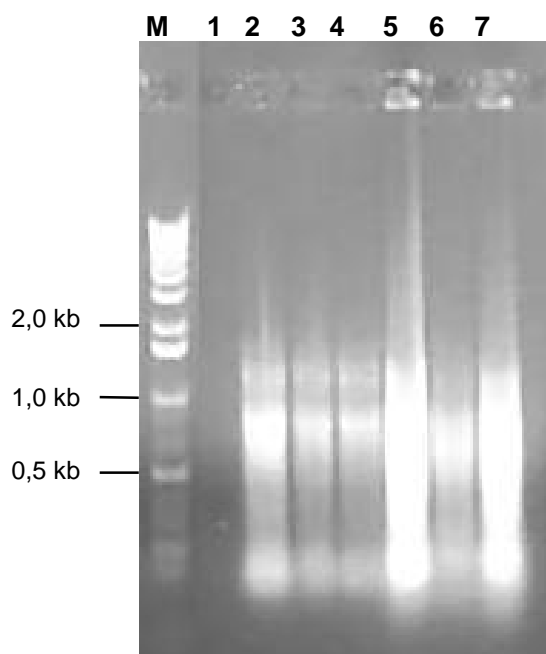


Figura 6- Perfil eletroforético em gel de agarose do RNA total de tubérculos de batata dos clones C-1786-6-84 e C-1881-16-97 extraídos utilizando-se *TRIZOL® Reagent*. M- Marcador de peso molecular *DNA Ladder® 1kb* (Invitrogen™); 2 a 4- repetições de RNAs totais de tubérculos de batata liofilizados do clone C-1786-6-84; 5 a 7- repetições de RNAs totais de tubérculos de batata *in natura* do clone C-1881-16-97.

4 CONCLUSÕES

Os perfis eletroforéticos obtidos através dos cinco métodos utilizados confirmam que a integridade e a pureza das moléculas de RNA são predominantemente mantidas nas extrações que utilizam o reagente *Concert™ Plant RNA*, tanto em material liofilizado de tubérculos de batata do clone C-1786-6-84 quanto em tecidos *in natura* do clone C-1881-16-97. O extrator comercial *Concert™ Plant RNA* (Invitrogen™) é considerado o mais indicado para isolamento de RNA de tubérculos de batata.

Os perfis eletroforéticos demonstram que há maior conservação do RNA total de tubérculos de batata do clone C-1881-16-97 (*in natura*) em relação às moléculas de RNA total extraídas do clone C-1786-6-84 (tubérculos liofilizados). No entanto, sendo a influência de metabólitos secundários (razão espectral $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) um efeito não detectado pelos cinco métodos aplicados, a comparação entre os métodos para o clone C-1881-16-97 não é precisa.

CAPÍTULO II

EXPRESSÃO DE GENES DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NO ADOÇAMENTO DE TUBÉRCULOS DE BATATA ARMAZENADOS SOB REFRIGERAÇÃO

1 Introdução

Desde a sua descoberta, a mais de 100 anos atrás, o adoçamento induzido pelo frio em tubérculo batata passou a ser amplamente investigado (BAGNARESI et al., 2008), por ser um problema significativo de pós-colheita que afeta o processamento industrial (PATHIRANA; HARRIS; MCKENZIE, 2008). O armazenamento refrigerado induz a degradação do amido em sacarose que, por sua vez, é hidrolisada em açúcares redutores (glicose e frutose). Durante a alta temperatura de fritura, açúcares redutores reagem com aminoácidos presentes no tubérculo (reação de Maillard), resultando num produto inegociável, de degustação amarga (DAVIES; MACKAY, 1994; TIESSEN et al., 2002; FERNIE; WILLMITZER; TRETHERWEY, 2002; GEIGENBERGER, 2003; BAGNARESI et al., 2008).

Nos últimos anos, este problema tem sido abordado no âmbito fisiológico e molecular, proporcionando significativos avanços à compreensão dos processos que regulam a interconversão da sacarose a amido nos tubérculos (DAVIES, 1998; FERNIE; WILLMITZER; TRETHERWEY, 2002). Entretanto, a resolução deste

problema tem-se revelado particularmente difícil porque os teores de açúcar são afetados pela síntese e repartição de amido, pela glicólise e respiração mitocondrial, bem como hexogênese (i.e. a formação de glicose e frutose) (SOWOKINOS, 2001).

O controle metabólico e a regulação da conversão de sacarose à amido têm como sistema modelo tubérculos de batata porque é um tecido relativamente homogêneo no qual a conversão de sacarose para amido representa o fluxo metabólico dominante (GEIGENBERGER; STITT; FENIE, 2004). Além disso, tubérculos de batata têm sido utilizados como sistema modelo devido às seguintes razões (i) o metabolismo da sacarose em tubérculos, ao contrário de muitos outros tecidos, é relativamente simples, sendo a sacarose descarregada a partir do floema simplasticamente (VIOLA et al., 2001) e ser degradada pela SuSy no citosol (FERNIE; WILLMITZER; TRETHERWEY, 2002); (ii) a rota de conversão da sacarose a amido ser conhecida, mediada por enzimas que estão bem caracterizadas e tendo grande parte dos genes que os codificam clonados (KRUGER, 1997) e; (iii) plantas transgênicas poderem ser facilmente produzidas (FERNIE; WILLMITZER; TRETHERWEY, 2002).

Em uma complexa rede metabólica, como é a conversão de sacarose a amido, o controle metabólico é normalmente compartilhado por várias enzimas, e muitas delas estão sujeitas a diversos mecanismos regulatórios (GEIGENBERGER; STITT; FENIE, 2004). O controle do acúmulo de açúcares em batatas é um processo metabólico complexo, afetado pelos vários níveis de controle celular. O adoçamento pode resultar da expressão alterada de genes e/ou da modulação na atividade pós-transcricional de enzimas-chave, influenciando o fluxo de carbono em direção a formação de açúcar (SOWOKINOS, 1990). Além disso, a regulação deste processo metabólico pode variar, dependendo da perturbação e da situação do tecido em estudo (GEIGENBERGER; STITT; FENIE, 2004), como também a quantidade de açúcar livre acumulada no tecido, que pode depender da cultivar em estudo (ZRENNER et al., 1996; CHAPPER et al., 2002; DEUNER et al., 2005).

Nos tubérculos de batata, a sacarose, a partir de elementos do floema, penetra nas células parenquimáticas simplasticamente e é convertida à UDP-Glc e frutose pela SuSy (TAUBERGER et al., 2000). A UDP-Glc é convertida à Glc-1-P pela UDP-GlcPPase e a frutose é convertida à Fru-6-P através da frutokinase. A Fru-6-P, Glc-6-P e Glc-1-P são convertidas reversivelmente no citosol pela ação da fosfohexose isomerase e fosfoglucomutase, respectivamente. Glc-6-P entra no

plastídeo (amiloplasto) via fosfato translocador e é convertida de volta à Glc-1-P pela Fosfoglucomutase plastidial (VIOLA et al., 2001). O primeiro passo da síntese de amido parte da conversão da Glc-1-P à ADP-Glc pela ADP-GlcPPase, que desempenha um papel importante na regulação da síntese de amido (TIESSEN et al., 2002) (Figura 7). Esta reação requer ATP, a qual é importada do citosol via ATP/ADP translocador (VIOLA et al., 2001). Embora este percurso já esteja bem estabelecido e os genes que codificam estas enzimas terem sido quase todos identificados e clonados, há ainda muitas dúvidas com respeito à regulação da conversão de sacarose a amido (GEIGENBERGER, 2003). Quando o estoque de sacarose aumenta no citoplasma, ocorre a ativação pós-traducional do poder redox de ADP-GlcPPase estabelecendo assim um poderoso mecanismo para transportar carbono para síntese de amido (GEIGENBERGER; STITT; FENIE, 2004).

Durante o armazenamento refrigerado dos tubérculos de batata, por sua vez, a quebra do amido nos amiloplastos é desencadeada através da indução de enzimas amilolíticas, e os produtos são exportados do amiloplasto quer como hexose-fosfatos (hexose-P), por intermédio da glicose fosfato-fosfato translocador quer como açúcares livres como glicose e/ou maltose transportadores (NIELSEN; DEITING; STITT, 1997; WEBER, 2004; SMITH, A.; ZEEMAN; SMITH, S., 2005). No citosol, esses metabolitos são convertidos a sacarose via SPS e SPP. A sacarose é hidrolisada, em seguida, em hexoses pela invertase ácida (SOWOKINOS, 2001).

Desde o final da década de 70, experimentos com tubérculos de batata sugeriam que, o adoçamento induzido pelo frio exige um longo período de exposição dos mesmos, pois se verifica, freqüentemente, uma demora do acúmulo de açúcares após a transferência para baixa temperatura (ISHERWOOD, 1976). Segundo Van Buskirk e Thomashow (2006); Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki (2006), este atraso pode está associado com mudanças na expressão gênica de certas enzimas que fazem parte do processo de aclimação ao frio.

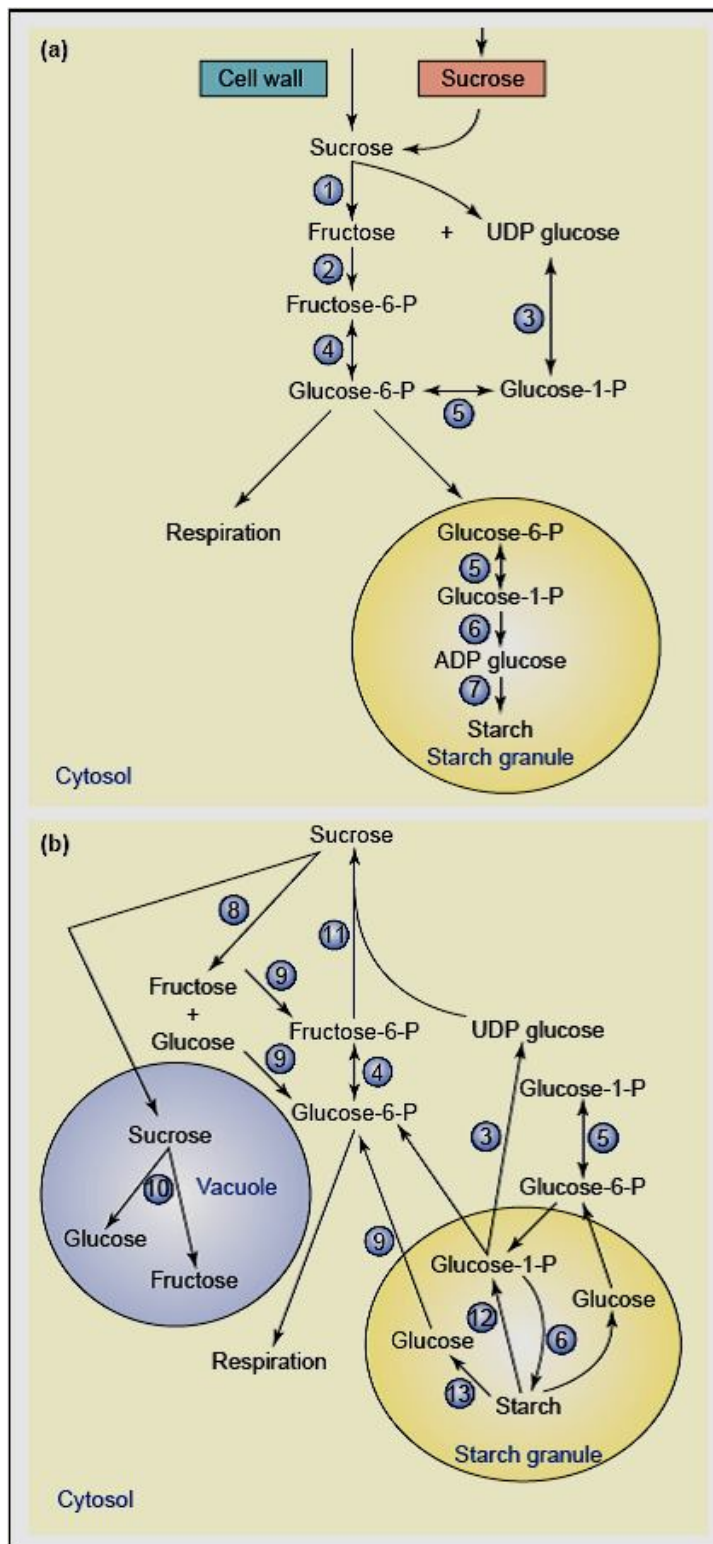


Figura 1- Principal rota do metabolismo de carboidratos (a) no desenvolvimento e (b) em tubérculos de batata armazenados. Enzimas: (1) SuSy, (2) frutokinase, (3) UDP-GlcPPase, (4) fosfohexose isomerase (5) fosfoglucomutase, (6) ADP-GlcPPase, (7) amido sintase, (8) invertase neutra, (9) hexokinase, (10) invertase ácida, (11) SPS, (12) amido fosforilase, (13) amilases (FINLAY; DALE; BRADSHAW, 2003).

Vários genes parecem estar envolvidos no processo do adoçamento induzido pelo frio, no entanto, muitas incertezas ainda existem como a contribuição relativa de cada gene para o processo, devido à heterogeneidade dos sistemas experimentais. Além disso, pouco se sabe sobre o início dos eventos que desencadeiam o adoçamento induzido pelo frio e sobre o envolvimento e a associação de diferentes genes ao metabolismo de carboidrato (BAGNARESI et al., 2008). De acordo com Geigenberger, Stitt e Fenie (2004), enzimas envolvidas na conversão de sacarose em amido estão sujeitas à regulação transcricional, no entanto, os mecanismos de detecção e sinalização que mediam as expressões são em grande parte desconhecido, sendo importante utilizar a expressão transcricional para analisar o percurso da regulação de genes envolvidos na conversão da sacarose a amido. Zrenner, Willmitzer e Sonnewald (1993) verificaram um aumento na expressão de mRNA de UDP-GlcPPase em tubérculos de batata armazenados em baixa temperatura, o que os fizeram sugerir que esta enzima tinha um importante papel no processo do adoçamento induzido pelo frio.

O objetivo da realização deste trabalho foi o de verificar a expressão de genes das enzimas: sacarose fosfato sintase (SPS), sacarose sintase (SuSy), a ADP-Glc pirofosforilase (ADP-GlcPPase) e UDP-Glc pirofosforilase (UDP-GlcPPase) em tubérculos de batata armazenados por 60 dias a 4 e 20°C.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Foram utilizados tubérculos de batata da cultivar BRS Pérola e do clone C-1786-6-84 produzidos no campo experimental da Embrapa Clima Temperado, Pelotas - RS (31° 52' S e 51° 21' W).

Após a colheita, os tubérculos de ambos os genótipos foram imediatamente transferidos ao Laboratório de Metabolismo Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, onde foram lavados, secados e divididos em três lotes: um armazenado em câmara refrigerada com temperatura de 4°C, umidade relativa de aproximadamente 85%, em ausência de luz, permanecendo por 60 dias em tais condições; outro lote mantido em câmara de ventilação forçada com temperatura de 20°C, em ausência da luz, permanecendo por 60 dias em tais condições; e terceiro lote, submetido ao processamento imediato, o qual consistiu em descascar, triturar e dividir em subamostras de aproximadamente 10g, sendo as mesmas imediatamente congeladas e liofilizadas por, aproximadamente, 20h até obtenção de massa constante.

Decorrido o período de 60 dias de armazenamento a 4°C e a 20°C, os tubérculos, de ambos os genótipos, foram submetidos ao mesmo processamento de liofilização, como anteriormente descrito.

2.2 Ajuste de PCR com *primers* específicos para os genes da SPS, SuSy, ADP-GlcPPase, UDP-GlcPPase

Com a finalidade de verificar-se a adequação dos oligonucleotídeos específicos (*primers*) sintetizados, foi realizada a reação de PCR utilizando-se DNA

genômico total de folhas jovens de batata e pares de *primers* específicos para os genes da SPS, SuSy, ADP-GlcPPase e UDP-GlcPPase definidos a partir de seqüências do gene de tubérculos de batata obtidos no NCBI.

Para a calibração dos *primers* específicos foi necessária a obtenção de amostras puras de DNA de batata. Utilizaram-se folhas jovens de batata proveniente de cultivo *in vitro* do Laboratório de Cultura de Células e Tecidos de Plantas do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

A extração de DNA foi realizada através do protocolo CTAB, utilizando-se 10mg de folhas jovens de batata, que foram, em seguida, acondicionadas em microtubos de 2,0mL seguindo-se a maceração em capela de fluxo laminar adicionando 700µL de tampão CTAB [CTAB 2% (p/v); NaCl 1,4M; Tris-HCl 100mM, pH 8,0; EDTA 20Mm; β-mercaptoetanol 0,2% (v/v), pré-aquecido a 65°C] com auxílio de bastão de vidro. Após a homogeneização, as amostras foram aquecidas em banho-maria por 30min a 65°C, homogeneizando-se a solução a cada 10min.

Em seguida, os microtubos contendo as amostras foram mantidos à temperatura ambiente por 5min. Após, foram adicionados 300µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 v/v) aos microtubos que foram agitados manualmente as amostras. Os microtubos foram incubados em centrífuga por 20min a 5.000 x *g* à temperatura ambiente. A fase superior (transparente) foi recuperada (em torno de 400µL), sendo transferidas a novo microtubo onde se adicionou 400µL de isopropanol gelado. Os microtubos foram vertidos suavemente e foram acondicionados e mantidos a 4°C por 10min. Os microtubos foram centrifugados por 5min a 10.000 x *g* a 4°C. A fase superior foi descartada e recuperou-se o precipitado em 300µL de solução de lavagem [acetato de amônio a 7,5M]. Os microtubos foram mantidos abertos em capela de fluxo laminar, por 20min. Após centrifugou-se por 5min a 10.000 x *g* a 4°C. O sobrenadante foi eliminado e o precipitado recuperado em 300µL de etanol 75% (v/v) gelado. As amostras foram centrifugadas por 5min a 10.000 x *g* a 4°C. O sobrenadante foi eliminado, sendo os microtubos mantidos abertos em temperatura ambiente até a eliminação completa do álcool. Em seguida, os precipitados foram recuperados com água ultra pura estéril tratada com DEPC a 0,01% (v/v), seguindo-se leitura em espectrofotômetro *Ultrospect® 2000 Pharmacia*, medindo-se a absorbância da solução no comprimento de onda de 260nm e 280nm para definição da concentração e pureza das moléculas de DNA extraídas.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel a 1,0% de agarose (*Gibco®/BRL*) em tampão TAE 0,5 x, à corrente de 80V por 40min, tendo como marcador de peso molecular *DNA Ladder® 1kb* (Invitrogen™), todas acrescidas de tampão de carregamento. O gel foi corado com brometo de etídio (10mg mL⁻¹) e as bandas foram visualizadas em transiluminador-UV e fotografado e analisado através do sistema de fotodocumentação computadorizado pela análise de gel (*Kodak Digital Science 1D-EDAS 120*).

A reação de PCR foi realizada utilizando-se as amostras de DNA e oligonucleotídeos específicos para a SPS, SuSy, ADP-GlcPPase e UDP-GlcPPase que foram definidos com auxílio do programa Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>), através do alinhamento de seqüências de 20-22 nucleotídeos das extremidades 5' e 3' de genes ortólogos, encontrados no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A viabilidade desses oligonucleotídeos foi verificada pela porcentagem de C/G, temperatura de anelamento (T_m) e ausência de auto-complementariedade. Estes oligonucleotídeos foram submetidos à confirmação de identidade com auxílio do programa BlastN (*Basic Local Alignment Search Tool-Nucleotide*), no banco de dados do NCBI e sintetizados pela Invitrogen™ (Tabela 1).

Tabela 1- Seqüências dos oligonucleotídeos sintetizados especificamente para amplificar os genes das enzimas de tubérculos de batata ADP-GlcPPase, SPS, SuSy e UDP-GlcPPase compreendidas entre os sítios de anelamento dos respectivos *primers forward* e *reverse* e condições da PCR

Primers	Seqüências	Tm (°C)*
ADP-GlcPPase	5' CCTATATCGTCCTTACGTTCCC 3' (22 bases)	50-56°C
	5' CTGTTTCTCTGTGGGCTTGA 3' (20 bases)	50-56°C
SPS	5' TTGTGATGCTAGCTCAGGACTC 3' (22 bases)	50-56°C
	5' GCTCAGAATGGAAGGAGGAA 3' (20 bases)	50-56°C
SuSy	5' CTGCTGGCTGAGTTTGAATC 3' (20 bases)	50-56°C
	5' GGCAGAAGCCGAGTAACAAT 3' (20 bases)	50-56°C
UDP-GlcPPase	5' TAACCTTGTCGGTCGCTATC 3' (20 bases)	50-56°C
	5' GCCACCTTTGACATCAGCTA 3' (20 bases)	50-56°C

*Tm- temperatura de anelamento.

A reação de amplificação foi composta de 3µL do cDNA (300 a 600ng de cDNA); 20mM de Tampão 10 x RT; 50mM de MgCl₂; 10mM de dNTP Mix, 6,25µM de cada um dos oligonucleotídeos (18S *forward*- 5'GAGCTAATACGTGCAACAAACC3' e 18S *reverse*- 3'AATGGATCCTCGTTAAGGGA5'); 5U µL⁻¹ da enzima *Taq* DNA polimerase e *UltraPure™ DEPC-treated Water* até completar o volume de 25µL.

A amplificação do DNA de batata foi realizada em termociclador PTC-100™ (*MJ Research*) programado para uma reação de amplificação com desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos. Em seguida, 35 ciclos de 95°C por 1min30s, 56°C por 1min30s e 72°C por 2min30s, seguidos de uma extensão final por 10min a 72°C.

Os produtos de amplificação obtidos foram identificados por meio de eletroforese em gel de agarose (*Gibco®/BRL*) a 1,0 % contendo tampão TAE 0,5 x, submetidos à corrente de 80V por 40min, utilizando como marcador de peso molecular *DNA Ladder® 1kb* (*Invitrogen™*), segundo protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001). Os géis foram corados com brometo de etídio (10mg mL⁻¹) visualizados em transiluminador-UV, fotografado e analisado através do sistema de fotodocumentação computadorizado para análise de gel (*Kodak Digital Science 1D-EDAS 120*).

2.3 Extração de RNA

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 a verificação da expressão transcricional da ADP-GlcPPase, UDP-GlcPPase, SPS e SuSy.

O RNAs totais utilizados para a síntese de cDNA foram extraídos utilizando-se o *Kit Concert™ Plant RNA Reagent* (Invitrogen™), conforme recomendações do fabricante. Aproximadamente 3mg de amostras liofilizadas foram adicionados em microtubos de 1,5mL, aos quais foram adicionados, em capela de fluxo laminar, 500µL de tampão de extração resfriado a 4°C. Os microtubos foram mantidos em temperatura ambiente durante 5min. Após foram centrifugados por 2min a 12.000 x g, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo ao qual foi adicionado 100µL de NaCl 5M para clarificar o extrato e 300µL de clorofórmio. Os tubos foram homogeneizados manualmente e centrifugados por 10min a 12.000 x g a 4°C, para separar as fases. A fase superior aquosa foi coletada e depositada em um novo microtubo, descartando-se o restante. Em seguida, adicionou-se igual volume de isopropanol e as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 10min. Após este período foram centrifugadas por 10min a 12.000 x g a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e adicionado ao microtubo 1mL de etanol à 75% (v/v). Novamente os tubos foram centrifugados por 1min a 12.000 x g a 4°C, e após foi desprezado o líquido tomando-se o cuidado para não perder o precipitado. O RNA foi ressuspenso em 30µL de *DEPC-treated Water* (Invitrogen™), e incubando por 10min em temperatura ambiente e, em seguida, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 260nm e 280nm.

2.4 Estimativas da quantidade e da qualidade dos RNAs totais

A concentração de RNAs totais foi calculada através da leitura em espectrofotômetro segundo metodologia descrita por Brasileiro e Carneiro (1998). Feita a relação A_{260nm}/A_{280nm} , as amostras que apresentaram valores no intervalo 1,8 a 2,2 foram submetidas à eletroforese em gel a 1,0% de agarose em tampão TAE 0,5 x à corrente de 80V por 40min, tendo como marcador de peso molecular *DNA Ladder® 1kb* (Invitrogen™), todos acrescidos de tampão de carregamento.

O gel foi corado com brometo de etídio (10mg mL^{-1}) e as bandas foram visualizadas em transiluminador-UV e o gel foi fotografado e analisado através do sistema de fotodocumentação computadorizado para análise de gel (*Kodak Digital Science 1D-EDAS 120*).

2.5 Digestão com DNase I

Para a solução de digestão utilizou-se $1\mu\text{g}$ de RNA de cada amostra; $1\mu\text{L}$ de tampão 10 x DNase I; $1\mu\text{L}$ de *DNase I Amp Grade*, completando com UltraPure™ *DEPC-treated Water* (Invitrogen™), seguindo-se protocolo descrito pelo fabricante. Em microtubos de $0,5\text{mL}$ as amostras foram incubadas em termociclador *Techne Progene®* por 15min a 25°C . A *DNase I Amp Grade* foi inativada com $1\mu\text{L}$ de EDTA 25mM , sendo os microtubos incubados por 10min a 65°C .

2.6 RT-PCR

Com o auxílio do *Kit* comercial *SuperScript™ III RT* (Invitrogen™), segundo protocolo do fabricante, em microtubos de $0,5\text{mL}$, adicionou-se $8\mu\text{L}$ da solução resultante da digestão, $1\mu\text{L}$ de 10mM de dNTP *Mix* (10mM de cada [dATP, dTTP, dCTP e dGTP]) e $1\mu\text{L}$ de oligo (dt) $0,5\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. As amostras foram incubadas a 65°C por 5min em termociclador *Techne Progene®*. Após esta etapa, adicionou-se $9\mu\text{L}$ da solução constituída de $2\mu\text{L}$ de tampão 5 x *First-Strand*; $4\mu\text{L}$ de MgCl_2 $25\mu\text{M}$; $2\mu\text{L}$ de $0,1\text{M}$ de DTT (ditiotreitól) e $1\mu\text{L}$ de *RNaseOut™* (*Recombinant RNase Inhibitor*) (Invitrogen™). Incubou-se a 42°C por 2min. Decorrido este período, adicionou-se $1\mu\text{L}$ da *SuperScript™ III RT*, $200\text{U } \mu\text{L}^{-1}$. A reação foi incubada por 50min a temperatura de 42°C . Em seguida, incubou-se por 15min a 70°C , colocaram-se as amostras foram colocadas em banho de gelo e adicionadas de $1\mu\text{L}$ de RNase H (2U), incubando-se por 20min a 37°C .

2.7 Amplificação do cDNA com oligonucleotídeos para o gene ribossomal 18S

A reação de amplificação foi realizada utilizando-se as amostras de cDNA e oligonucleotídeos do gene ribossomal 18S que, por ser constitutivo, pode ser utilizado na comparação da amplificação de outros genes.

A reação foi composta de 3 μ L do cDNA (300 a 600ng de cDNA); 20mM de Tampão 10 x RT; 50mM de MgCl₂; 10mM de dNTP *Mix*, 6,25 μ M de cada um dos oligonucleotídeos (18S *forward*- 5'GAGCTAATACGTGCAACAAACC3' e 18S *reverse*- 3'AATGGATCCTCGTTAAGGGA5'); 5U μ L⁻¹ da enzima *Taq DNA polimerase* e *UltraPure™ DEPC-treated Water* (Invitrogen™) até completar o volume de 25 μ L.

A PCR foi realizada em termociclador PTC-100™ (*MJ Research*) programado para uma reação de amplificação com desnaturação inicial a 95°C por 1min50s. Em seguida, 35 ciclos de 95°C por 1min, 56°C por 1min e 72°C por 1min, seguidos de uma extensão final por 10min a 72°C.

Os produtos de amplificação obtidos foram identificados por meio de eletroforese em gel de agarose (*Gibco®/BRL*) a 0,7% contendo tampão TAE 0,5 x, submetidos à corrente de 80V por 40min, utilizando como marcador de peso molecular *DNA Ladder® 1kb* (Invitrogen™), segundo protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001). Os géis foram corados com brometo de etídio (10mg mL⁻¹) e em transiluminador-UV foram fotografados e analisados através do sistema de fotodocumentação computadorizado pela análise de gel (*Kodak Digital Science 1D-EDAS 120*).

2.8 Amplificação com oligonucleotídeos específicos

A reação foi realizada utilizando-se amostras de cDNA e oligonucleotídeos específicos para a SPS, SuSy, ADP-GlcPPase e UDP-GlcPPase.

A PCR foi composta de 3 μ L do cDNA (300 a 600ng de cDNA); 20mM de Tampão 10 x RT; 50mM de MgCl₂; 10mM de dNTP *Mix*, 6,25 μ M de cada um dos oligonucleotídeos específicos de cada enzima (Tabela 1); 0,5U μ L⁻¹ da enzima *Taq DNA polimerase* e *UltraPure™ DEPC-treated Water* até completar o volume de 25 μ L.

A reação foi realizada em termociclador PTC-100™ (*MJ Research*) programado para uma reação de amplificação com desnaturação inicial a 95°C por 1min50s. Em seguida, 35 ciclos de 95°C por 1min, 56°C por 1min e 72°C por 1min, seguidos de uma extensão final por 10min a 72°C.

Os produtos de amplificação obtidos da PCR foram identificados por meio de eletroforese em gel de 0,7% agarose em tampão TAE 0,5 x, submetidos à corrente

de 100V por 30min, tendo como marcador de peso molecular *DNA Ladder*® 1,0kb (Invitrogen™), todos acrescidos de tampão de carregamento. O gel foi corado com brometo de etídio (10mg mL^{-1}) e as bandas foram visualizadas com luz UV em um transiluminador.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ajuste de PCR com oligonucleotídeos específicos para os genes da SPS, SuSy, ADP-GlcPPase, UDP-GlcPPase

O perfil eletroforético do ajuste da PCR com *primers* específicos está representado na Figura 2, obtido utilizando-se como marcador de peso molecular *DNA Ladder® 1,0kb* (Invitrogen™). A amplificação resultou em quatro fragmentos de tamanhos distintos. Os oligonucleotídeos específicos utilizados para amplificar o gene que codifica a ADP-GlcPPase em tubérculos de batata resultaram em fragmento de 0,5kb, aproximadamente. O fragmento de 0,25kb, aproximadamente, observado na coluna 2 da Figura 2, foi amplificado com oligonucleotídeos específicos sintetizados para SPS de tubérculos de batata.

Os fragmentos de 1,0kb e 0,8kb, aproximadamente, corresponderam à ampliações com oligonucleotídeos específicos para o gene da SuSy e da UDP-GlcPPase, respectivamente (Figura 2, colunas 3 e 4).

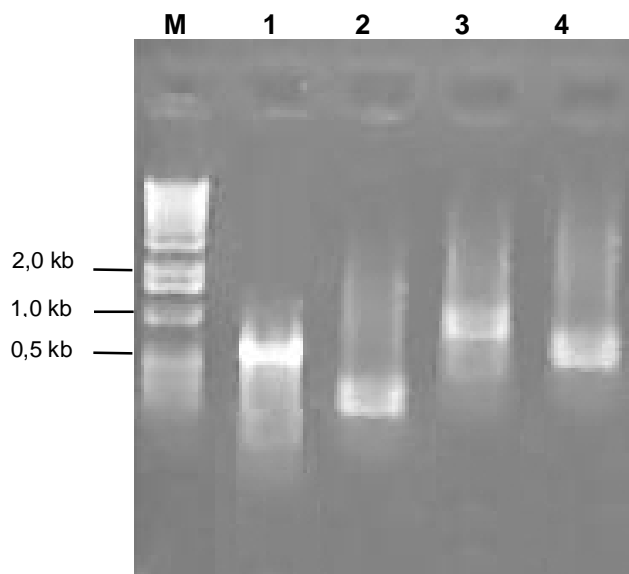


Figura 2- Perfil eletroforético em gel de agarose de produtos de amplificação por PCR obtidos com oligonucleotídeos específicos para amplificar genes em DNA de folhas jovens de batata (*Solanum tuberosum* L.). M- marcador de peso molecular *DNA Ladder® 1kb*; 1- ADP-GlcPPase; 2- SPS; 3- SuSy; 4- UDP-GlcPPase.

3.2 Expressão do gene da SPS

A transcrição do gene da SPS foi observada em tubérculos de batata do clone C-1786-6-94, obtidos utilizando como marcador de peso molecular *DNA Ladder® 100bp* (Invitrogen™) segundo o perfil eletroforético (Figura 3). Os produtos desta amplificação permitiram verificar que, por ocasião do armazenamento por 60 dias a 4°C houve expressão em mRNAs do gene da SPS. Os fragmentos de 0,25kb eram esperados em função dos oligonucleotídeos específicos selecionados.

O perfil eletroforético obtido ainda revelou que houve depósito de moléculas de baixo peso molecular, possivelmente os *primers* utilizados na PCR, evidenciando que no armazenamento por 60 dias a 20°C a expressão do gene da SPS no clone C1786-6-94 não ocorreu.

Estes resultados indicaram que o gene que codifica esta enzima é expresso nos tubérculos de batata submetidos ao armazenamento refrigerando (4°C) por 60 dias. Sendo a concentração de SPS elevada em tecidos que sintetizam sacarose, a expressão de mRNAs desta enzima nos tubérculos do clone C1786-6-94 pode ter sido estimulada pelo frio, uma vez que a expressão transcricional da mesma não foi verificada nos tubérculos mantidos a 20°C por 60 dias e logo após a colheita (tempo zero). O fluxo de carbono controlado pela ação da SPS é provavelmente regulado

durante estresse (i.e. seca e pelo frio) através de alterações em suas propriedades cinéticas (HILL et al., 1996; GEIGENBERGER et al., 2000).

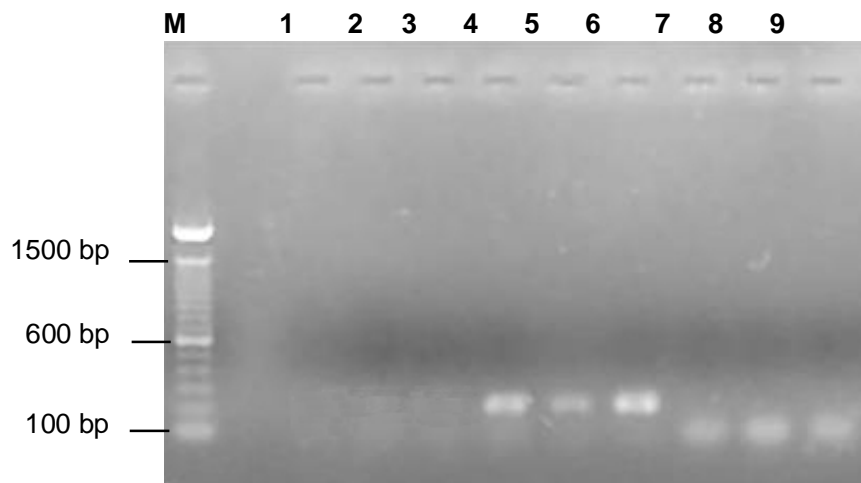


Figura 3- Perfil eletroforético em gel de agarose dos produtos amplificados obtidos a partir de oligonucleotídeos específicos para amplificar o gene da SPS de tubérculos de batata do clone C-1786-6-94 antes do armazenamento (imediatamente após a colheita), armazenados a 4°C por 60 dias e armazenados a 20°C por 60 dias. M- marcador de peso molecular *DNA Ladder® 100bp*; colunas de 1 a 3- repetições obtidas imediatamente após a colheita; colunas de 4 a 6- repetições do armazenamento a 4°C por 60 dias; colunas de 7 a 9- repetições do armazenamento a 20°C por 60 dias.

O perfil eletroforético dos produtos de amplificação com *primers* específicos para os genes que codificam a SPS em tubérculos de batata cultivar Pérola, obtidos utilizando como marcador de peso molecular *DNA Ladder® 1kb* (Invitrogen™), representado na Figura 4. Segundo este perfil, a expressão transcricional em mRNAs do gene desta proteína foi verificada logo após a colheita, detectando-se mRNAs, embora em baixíssima intensidade antes do armazenamento. Com a manutenção dos tubérculos sob baixas temperaturas (4°C) por 60 dias, a expressão intensificou-se, observada pela presença de fragmentos de 0,25kb, aproximadamente. Observa-se ainda que houve expressão de mRNAs da SPS quando os tubérculos da cultivar Pérola foram mantidos a 20°C por 60 dias, entretanto em apenas uma das repetições e em menor intensidade nas demais repetições.

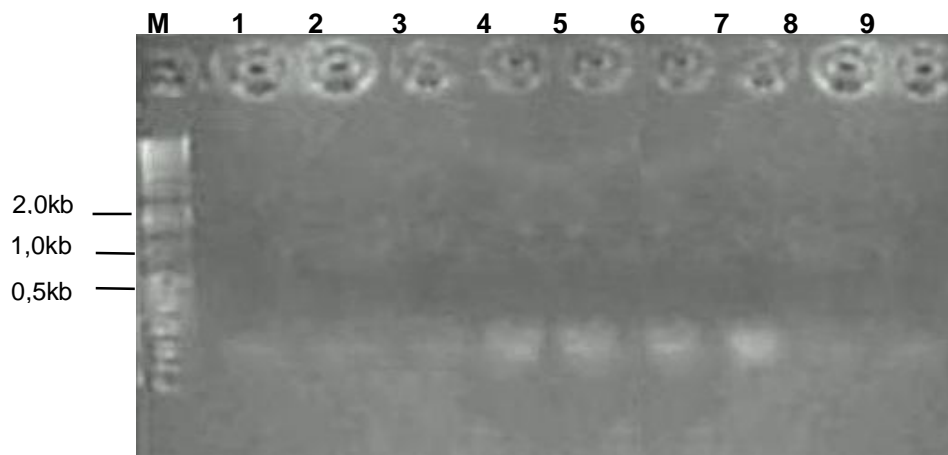


Figura 4- Perfil eletroforético em gel de agarose dos produtos amplificados obtidos a partir de oligonucleotídeos específicos para amplificar o gene da SPS de tubérculos de batata da cultivar Pérola antes do armazenamento (imediatamente após a colheita), armazenados a 4°C por 60 dias e armazenados a 20°C por 60 dias. M- marcador de peso molecular *DNA Ladder® 1kb*; colunas de 1 a 3- repetições obtidas imediatamente após a colheita; colunas de 4 a 6- repetições do armazenamento a 4°C por 60 dias; colunas de 7 a 9- repetições do armazenamento a 20°C por 60 dias.

3.3 Expressão do gene da SuSy

A expressão do gene da SuSy foi observada em tubérculos de batata do clone C-1786-6-94 apenas quando armazenados por 60 dias sob refrigeração, confirmada pelo tamanho dos fragmentos observados (1,0kb). O perfil eletroforético ainda revela fragmentos de alto peso molecular, possivelmente moléculas de DNA.

Contudo, para as amostras coletadas antes do armazenamento e nas obtidas em armazenamento a 20°C não se visualizou a expressão transcricional do gene que codifica para esta enzima (Figura 5). Vários trabalhos têm demonstrado que a manifestação de genes de SuSy é aumentada quando as concentrações de sacarose citosólica aumenta, em plantas sob condição de hipóxia e em tecidos que sofrem algum dano mecânico (SALANOUBAT; BELLIARD, 1989; ZENG et al., 1998; BOLOGA et al., 2003).

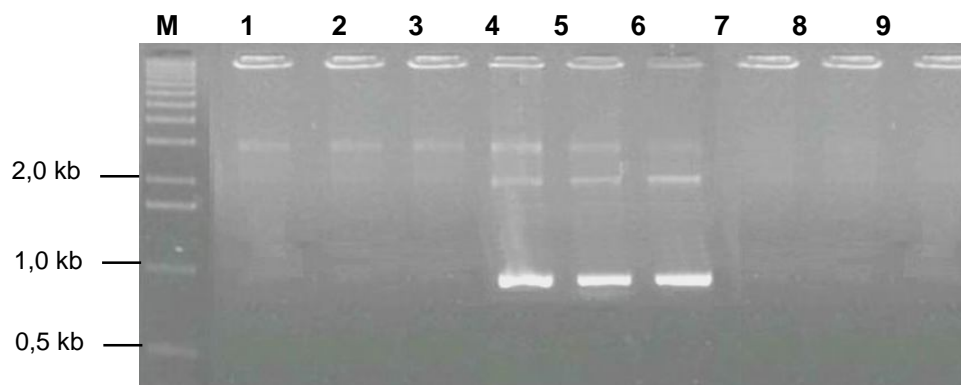


Figura 5- Perfil eletroforético em gel de agarose dos produtos amplificados obtidos a partir de oligonucleotídeos específicos para amplificar o gene da SuSy de tubérculos de batata do clone C-1786-6-94 antes do armazenamento (imediatamente após a colheita), armazenados a 4°C por 60 dias e armazenados a 20°C por 60 dias. M- marcador de peso molecular *DNA Ladder® 1kb*; colunas de 1 a 3- repetições obtidas imediatamente após a colheita; colunas de 4 a 6- repetições do armazenamento a 4°C por 60 dias; colunas de 7 a 9- repetições do armazenamento a 20°C por 60 dias.

Da mesma forma que observado para os tubérculos do clone C-1786-6-94, a expressão transcricional dos genes da SuSy foi observada em tubérculos de batata da cultivar Pérola aos 60 dias armazenadas a 4°C, havendo fragmentos de 1,0kb, corroborando com o peso molecular do oligonucleotídeo específico sintetizado que corresponde à SuSy em tubérculos de batata. O perfil eletroforético ainda mostra que houve a detecção de mRNAs desta enzima aos 60 dias de armazenamento dos tubérculos, mantidos a 20°C, podendo evidenciar uma diferenciação genética na expressão de mRNAs da SuSy quando armazenadas sob condições de temperatura ambiente (Figura 6).

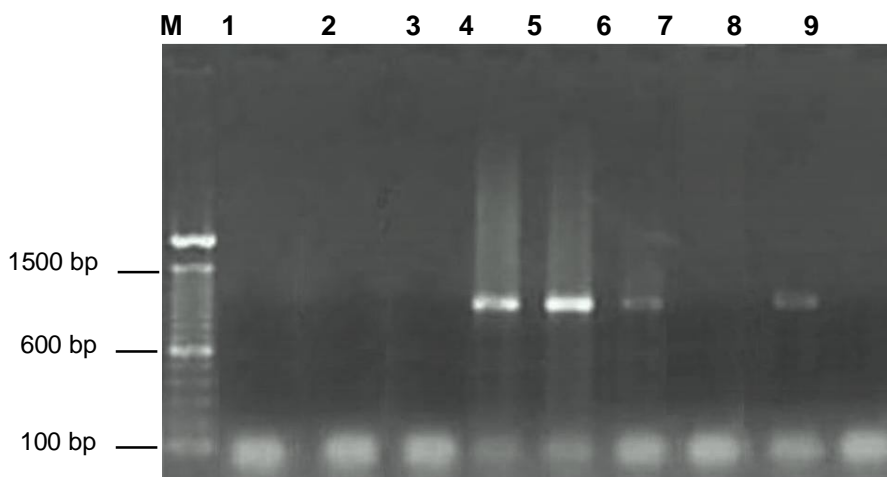


Figura 6- Perfil eletroforético em gel de agarose dos produtos amplificados obtidos a partir de oligonucleotídeos específicos para amplificar o gene da SuSy de tubérculos de batata cultivar Pérola antes do armazenamento (imediatamente após a colheita), armazenados a 4°C por 60 dias e armazenados a 20°C por 60 dias. M- marcador de peso molecular *DNA Ladder® 100bp*; colunas de 1 a 3- repetições obtidas imediatamente após a colheita; colunas de 4 a 6- repetições do armazenamento a 4°C por 60 dias; colunas de 7 a 9- repetições do armazenamento a 20°C por 60 dias.

A SuSy é regulada pela atividade da SPS, sendo que modificações covalentes e modulações alostéricas nesta última enzima proporcionam um controle muito sensível da SuSy dependendo do “pool” de hexoses fosfato disponível. Quando este conteúdo de hexoses é abundante, a SPS é ativada por Glc-6-P, que pela catálise reversível da fosfohexoseisomerase, gera o metabólico Fru-6-P, que pode tanto ir para a glicólise, como ser catalisada pela SPS, gerando mais sacarose no citosol das células de tubérculos de batata. Embora o fluxo líquido de hexoses seja no sentido da degradação de sacarose, a taxa de sacarose (e.g.) síntese dentro desse tecido é considerável (GEIGENBERGER et al., 1997; FERNIE et al., 2001).

3.4 Expressão do gene da ADP-GlcPPase

O armazenamento durante 60 dias a 4°C, bem como, por 60 dias a 20°C, proporcionaram a expressão em mRNAs dos genes desta enzima em tubérculos de batata do clone C-1786-6-94, contudo, imediatamente após a colheita, a expressão do gene da ADP-GlcPPase não foi verificada (Figura 7). Em plantas superiores a ADP-GlcPPase é uma proteína tetramérica composta por duas subunidades

regulatórias (AGPS, 51kD) e duas outras subunidades catalíticas, ligeiramente menores, (AGPB, 50kD) (OKITA et al., 1990). A expressão antisense da subunidade AGPB, em tubérculos de batata transgênicos, comprovou que, quando a atividade desta subunidade foi reduzida à taxas inferiores a 50% em comparação ao nível do tipo selvagem, a síntese de amido diminuiu (MÜLLER-RÖBER; SONNEWALD; WILLMITZER, 1992; GEIGENBERGER; MÜLLER-RÖBER; STITT, 1999). Além disso, mudanças na concentração de 3-PGA (controle alostérico, atuando com ativador) correlacionam com mudanças na taxa de síntese de amido no âmbito de uma ampla gama de condições (FERNIE; WILLMITZER; TRETHERWEY, 2002). A expressão da ADP-GlcPPase é aumentada por hexoses-fosfatos (SALANOUBAT; BELLIARD, 1989; MÜLLER-RÖBER et al., 1990; SOKOLOV; DEJARDIN; KLECZKOWSKI, 1998; TIESSEN et al., 2003) e diminuída por nitrato (SCHEIBLE et al., 1997) e fosfato inorgânico (Pi) (NIELSEN et al., 1998). Desta forma, o aumento da atividade da ADP-GlcPPase pode estar mais relacionado a processos respiratórios, que devem se intensificar com o armazenamento, independente da condição.

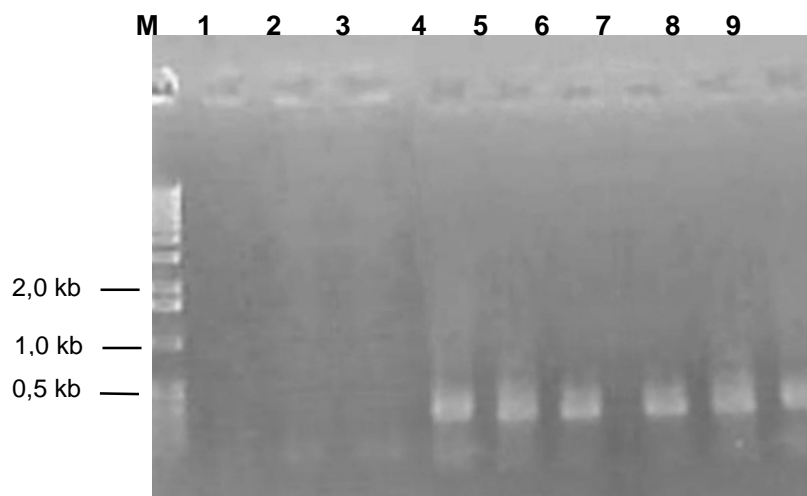


Figura 7- Perfil eletroforético em gel de agarose dos produtos amplificados obtidos a partir de oligonucleotídeos específicos para amplificar o gene da ADP-GlcPPase de tubérculos de batata do clone C-1786-6-94 antes do armazenamento (imediatamente após a colheita), armazenados a 4°C por 60 dias e armazenados a 20°C por 60 dias. M- marcador de peso molecular *DNA Ladder® 1kb*; colunas de 1 a 3- repetições obtidas imediatamente após a colheita; colunas de 4 a 6- repetições do armazenamento a 4°C por 60 dias; colunas de 7 a 9- repetições do armazenamento a 20°C por 60 dias.

A expressão do gene da ADP-GlcPPase também foi observada em tubérculos de batata cultivar Pérola segundo o perfil eletroforético (Figura 7). Os produtos de amplificação obtidos com *primers* específicos para amplificar o gene da ADP-GlcPPase geraram fragmento de 0,5kb aproximadamente, sendo tais tamanhos os esperados de acordo com o observado no ajuste dos *primers* sintetizados especificamente para amplificar a ADP-GlcPPase. A expressão referente a este gene ocorreu aos 60 dias a 4°C e aos 60 dias a 20°C, não havendo a expressão do gene logo após a colheita. Observou-se ainda que, neste genótipo, os fragmentos formados foram mais intensos aos 60 dias a 4°C, demonstrando que sob baixas temperaturas a ADP-GlcPPase pode vir a se expressar, agindo regulando a síntese de amido ou agindo reversivelmente na formação de hexoses fosfatos (Glc-6-P) (Figura 8).

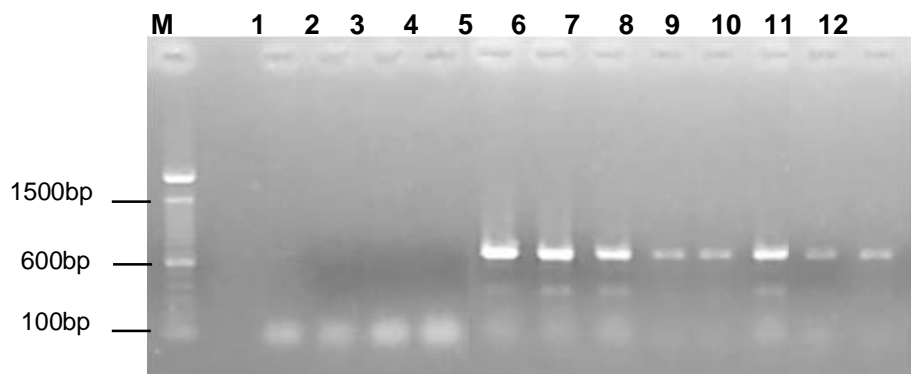


Figura 8- Perfil eletroforético em gel de agarose dos produtos amplificados obtidos a partir de oligonucleotídeos específicos para amplificar o gene da ADP-GlcPPase de tubérculos de batata cultivar Pérola antes do armazenamento (imediatamente após a colheita), armazenados a 4°C por 60 dias e armazenados a 20°C por 60 dias. M- marcador de peso molecular *DNA Ladder® 100bp*; colunas de 1 a 4- repetições obtidas imediatamente após a colheita; colunas de 5 a 8- repetições do armazenamento a 4°C por 60 dias; colunas de 9 a 12- repetições do armazenamento a 20°C por 60 dias.

3.5 Expressão do gene da UDP-GlcPPase

A expressão do gene da UDP-GlcPPase foi verificada nos tubérculos de batata do clone C-1786-6-94 (Figura 9). Segundo o perfil eletroforético obtido, houve expressão em mRNAs dos genes que codificam esta enzima nos tubérculos armazenados a 4°C por 60 dias, entretanto, é possível observar que também houve

a expressão desse gene logo após a colheita (antes do armazenamento). Fragmentos de 0,8kb, aproximadamente, foram observados, sendo esperados de acordo com o PCR de ajuste da reação com *primers* sintetizados especificamente para amplificar o gene desta enzima em tubérculos de batata.

Estes resultados indicaram que a expressão do gene da UDP-GlcPPase, desde a colheita, intensificando-se em decorrência ao armazenamento a 4°C, pode favorecer o possível acúmulo de açúcares redutores já que a expressão desta enzima contribui na formação de Sac-6-P, que é desfosforilada à sacarose. Não foi detectada expressão de mRNAs desta enzima quando os tubérculos foram expostos a 20°C por 60 dias (Figura 9).

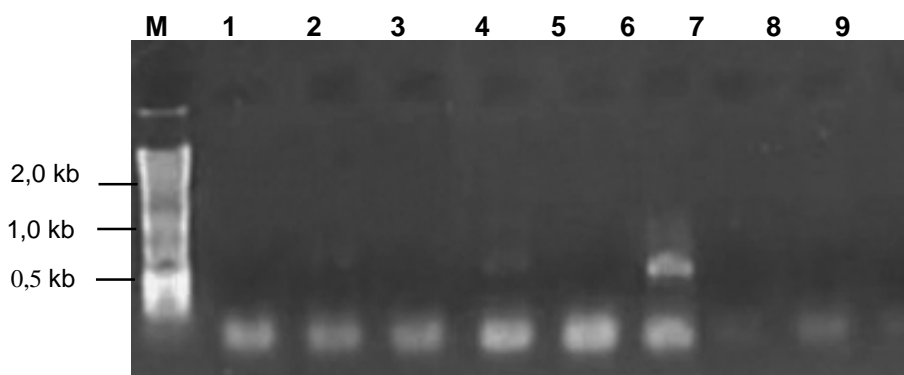


Figura 9- Perfil eletroforético em gel de agarose dos produtos amplificados obtidos a partir de oligonucleotídeos específicos para amplificar o gene da UDP-GlcPPase de tubérculos de batata do clone C-1786-6-94 antes do armazenamento (imediatamente após a colheita), armazenados a 4°C por 60 dias e armazenados a 20°C por 60 dias. M- marcador de peso molecular *DNA Ladder® 1kb*; colunas de 1 a 3- repetições obtidas imediatamente após a colheita; colunas de 4 a 6- repetições do armazenamento a 4°C por 60 dias; colunas de 7 a 9- repetições do armazenamento a 20°C por 60 dias.

A expressão transcricional da UDP-GlcPPase também foi verificada nos tubérculos de batata da cultivar Pérola. Moléculas de mRNAs desta proteínas foram detectadas tanto nos tubérculos armazenados por 60 dias a 4°C, como nos tubérculos armazenados por 60 dias a 20°C, porém mais fracamente sob este último armazenamento. Esta baixa expressão de mRNAs da UDP-GlcPPase nesta cultivar, principalmente nos tubérculos armazenados à temperatura ambiente (20°C) condiz

com a baixa expressão dos mRNAs da SuSy que, possivelmente, catalisou em baixa intensidade, não disponibilizando o metabólito UDP-Glc, substrato da UDP-GlcPPase.

A conversão da sacarose a UDP-Glc e frutose, reversivelmente, é catalisada pela SuSy. Esta enzima, assim como a UDP-GlcPPase, também foi expressa em ambos genótipo de batata quando armazenados por 60 dias a 4°C. O substrato para a UDP-GlcPPase (UDP-Glc), possivelmente em elevada concentração nestes genótipos sob tal armazenamento, foi catalisada, reversivelmente, à Glc-1-P, avolumando o “pool” de hexoses fosfatos no citosol que poderiam entrar na glicólise ou fornecer Pi para a degradação e/ou síntese de amido nos amiloplastos (Figura 1).

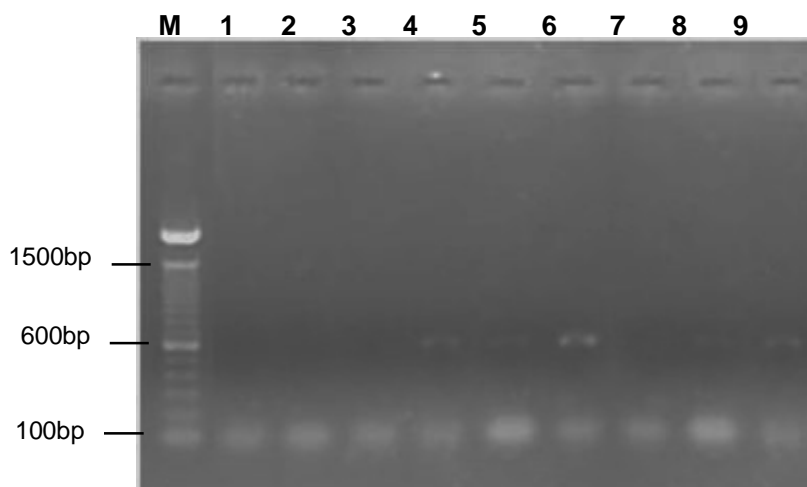


Figura 10- Perfil eletroforético em gel de agarose dos produtos amplificados obtidos a partir de oligonucleotídeos específicos para amplificar o gene da UDP-GlcPPase de tubérculos de batata cultivar Pérola antes do armazenamento (imediatamente após a colheita), armazenados a 4°C por 60 dias e armazenados a 20°C por 60 dias. M- marcador de peso molecular *DNA Ladder® 100bp*; colunas de 1 a 4- repetições obtidas imediatamente após a colheita; colunas de 5 a 8- repetições do armazenamento a 4°C por 60 dias; colunas de 9 a 12- repetições do armazenamento a 20°C por 60 dias.

4 CONCLUSÕES

O armazenamento a baixas temperaturas induz a expressão em mRNAs dos genes das enzimas SPS, SuSy, UDP-GlcPPase e ADP-GlcPPase, indicando que o armazenamento a 4°C controla a expressão desses genes em ambos os genótipos.

O armazenamento à temperatura ambiente (20°C) por 60 dias proporciona, principalmente à cultivar Pérola, a expressão dos genes das referidas enzimas, porém em baixa intensidade. Estes resultados indicam que o controle da expressão da SPS, SuSy, UDP-GlcPPase e ADP-GlcPPase não é afetado apenas pelas baixas temperaturas, mas que outros fatores podem ter influenciado a expressão dos mesmos nesta cultivar.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A mais direta aproximação para tentar compreender o adoçamento em batatas pode ser através do entendimento dos passos envolvidos no metabolismo de carboidratos em tubérculos quando armazenados sob baixas temperaturas. No entanto, verificar a expressão dos genes das enzimas que contribuem nestes passos comprova o efeito deste problema de pós-colheita.

A verificação da expressão dos genes de enzimas-chave em tubérculos armazenados sob baixas temperaturas sinaliza que a conversão do amido à sacarose potencialmente ocorre. Tendo este acúmulo de açúcares sua origem na mobilização do amido, seguida por uma aumentada síntese de sacarose e, por último, hidrólise da sacarose até glicose, todas estas etapas são catalisadas por transferases. A habilidade para a síntese e hidrólise da sacarose depende da ação de certas transferases em tubérculos armazenados sob baixas temperaturas. Para investigar a transcrição dos genes envolvidos, faz-se necessário o isolamento de mRNAs para análises moleculares através de RT-PCR.

A escolha do método de isolamento de moléculas de RNAs depende de diversos fatores, como a quantidade de informações disponíveis sobre a espécie estudada, a quantidade de seqüências disponíveis, a abundância de transcritos que se procura, além do custo das análises e da estrutura do laboratório. Desta forma, para tubérculos de batata liofilizados, o isolamento e purificação de RNA utilizando-se o reagente *Concert™ Plant RNA* (Invitrogen™) foi o mais indicado. Através deste método obtiveram-se mRNAs de tubérculos de batata de alta qualidade e

quantidade de transcritos necessária para posteriores análises da expressão em mRNAs de genes de transferases de interesse neste trabalho: sacarose fosfato sintase (SPS), sacarose sintase (SuSy), ADP-Glc pirofosforilase (ADP-GlcPPase) e UDP-Glc pirofosforilase (UDP-GlcPPase).

Definido o melhor método de isolamento de mRNAs em tubérculos de batata, a verificação da transcrição de enzimas envolvidas no adoçamento dos mesmos logo após a colheita, armazenados a 4°C e a 20°C, por 60 dias, foi analisada através de RT-PCR em dois genótipos: o clone C-1786-6-94 e a cultivar BRS Pérola. Estes genótipos possuem características distintas. Segundo a literatura, a cultivar BRS Pérola é destinada ao processamento na forma de “batata palha”. Segundo resultados obtidos por Bacarin et al., (2005) os teores de açúcares redutores (mg de glicose g⁻¹ de massa liofilizada) em tubérculos desta cultivar e do clone C-1786-6-94, mensurados aos 30 e aos 60 dias de armazenamento à 4°C, apresentaram redução de aproximadamente 50% nos teores de carboidratos solúveis totais na cultivar aos 60 dias de armazenamento. No entanto, nos tubérculos do clone esta diminuição foi menor, permanecendo ao final dos 60 dias, altos níveis de açúcares redutores.

A expressão dos mRNAs dos genes que codificam as enzimas responsáveis pelo acúmulo de carboidratos solúveis totais foi verificada na cultivar BRS Pérola quando armazenada por 60 dias a 4°C. Além disto, a expressão dos genes destas enzimas quando os tubérculos da cultivar BRS Pérola foram armazenados por 60 dias a 20°C também foi verificada, indicando que, possivelmente, não apenas o frio influencia na transcrição das enzimas em estudo. É sabido que o frio altera a composição lipídica das membranas plasmáticas celulares, favorecendo a um rápido aumento na atividade de diferentes enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos e carboidratos. Este fato indica que tanto as baixas como as altas temperaturas poderiam induzir à expressão diferencial de genes, sendo que as mudanças metabólicas produzidas pelo frio induzem a contínua conversão da sacarose em açúcares redutores (glicose e frutose) mesmo aumentando-se a temperatura de armazenamento.

Os resultados indicaram, que a conversão de amido à sacarose pode ser favorecida em ambos os genótipos quando armazenados a 4°C por 60 dias. A concentração de açúcares redutores no citosol destes tubérculos possivelmente pode ter ocorrido. No processamento industrial sob altas temperaturas, batatas do

clone C-1786-6-94 e da cultivar BRS Pérola, provavelmente, desenvolveriam produtos escurecidos e de sabor amargo devido à reação de Maillard.

REFERÊNCIAS

ABREU, C. M.; BACARIN, M. A.; PEREIRA, A. S.; LIMA, M. G. S. Biochemical composition of potatoes tubers of several genotypes cultivated under greenhouse conditions. **Revista Ceres**, Viçosa, v.48, p.593-599.

ANTONINI, S. R. C.; MENEGHIN, S. P.; URASHIMA, A. S. **Técnicas Básicas de Biologia Molecular**, Araras: EdUFSCar, 2004. 57p.

AP REES, T. Pathways of carbohydrate breakdown in higher plants. **Biochemistry**, London, v.11, p.129-158, 1974.

AP REES, T.; DIXON, W.L.; POLLOCK, C.J.; FRANK, F. Low temperature sweetening of higher plants. In: **Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables**. (eds FRIEND, J.; RHODES, M. J. C.). New York: Academic Press. 1981. p.41-44.

AP REES, T.; MORRELL, S. Carbohydrate metabolism in developing potatoes. **American Potato Journal**, New Brunswick, v.67, n.12, p.835-847, 1990.

ASIF, M. H.; DHAWAN, P.; NATH, P. A simple procedure for isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. **Plant Molecular Biology Reporter**, Ottawa, v.18, p.109-115, 2000.

ATKINS, S. D. & CLARK, I. M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. **Journal of Applied Genetics**, Poznań, v.45, n.1, p.3-15, 2004.

AYGAN, A. Nucleic acid extraction from clinical specimens for PCR applications. **Turk Journal of Biology**, Ankara, v.30, p.107-120, 2006.

BACARIN, M. A.; FERREIRA, L. S.; DEUNER, S.; BERVALD, C. M. P.; ZANATTA, E. R.; LOPES, N. F. Carboidratos não estruturais em tubérculos de batata recondicionados após o armazenamento sob diferentes temperaturas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, p.799-804, 2005.

BALLICORA, M. A., IGLESIAS, A. A., AND PREISS, J. ADP-glucose pyrophosphorylase: a regulatory enzyme for plant starch biosynthesis. **Photosynthesis Research**, Hague v.79, p. 1-24, 2004.

BAGNARESI, P.; MOSCHELLA, A.; BERETTA, O.; VITULLI, F.; RANALLI, P.; PERATA, P. Heterologous microarray experiments allow the identification of the early events associated with potato tuber cold sweetening. **BMC Genomics**, London, v.9, n.176, p.1-23, 2008.

BOLOGA, K. L.; FERNIE, A. R.; LEISSE, A.; LOUREIRO, M. E.; GEIGENBERGER, P. A bypass of sucrose synthase leads to low internal oxygen and impaired metabolic performance in growing potato tubers. **Plant Physiology**, Stuttgart, v.132, p.2058–2072, 2003.

BRADSHAW, J. E.; DALE, M. F. B.; MACKAY, G. R. Use of mid-parent values and progeny tests to increase the efficiency of potato breeding for combined processing quality and disease and pest resistance. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v.107, n.1, p.36-42, 2003.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Cenargen, 309p. 1998.

BROWN, J.; MACKAY, G. R.; BAIN, H.; GRIFFITH, D. W.; ALLISON, M. J. The processing potential of tubers of the cultivated potato, *Solanum tuberosum* L. after storage at low-temperatures. **Potato Research**, Netherlands, v.33, p.219-227, 1990.

BRYCE, J. H.; HILL, S. A. Energy production in plant cells. In: **Plant Biochemistry and Molecular Biology**. England: John Wiley and Sons Ltd., 1993. p.1-26.

BUGOS, R. C.; CHIANG, V. L.; ZHANG, X. H.; CAMPBELL, E. R.; PODILA, G. K.; CAMPBELL, W. H. RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine. **Biotechniques**, Natick, v.19, p.734-737, 1995.

BURRELL, M. M. Control of carbohydrate metabolism in potato tubers. In: **The molecular and cellular biology of the potato**, (eds BELKNAP, W. R.; VAYDA, M. E.; PARK, W. P.). 2ed. Wallingford: CAB International, 1994. p 44-55.

CARRA, A.; GAMBINO, G.; SCHUBERT, A. A cetyltrimethylammonium bromide-based method to extract low-molecular-weight RNA from polysaccharide-rich plant tissues. **Analytical Biochemistry**, New York, v.360, p.318-320, 2007.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, Atenas, v.11, p.113-116, 1993.

CHAPPER, M.; BACARIN, M. A.; PEREIRA, A. da S.; TERRIBLE, L. C. Carboidratos não estruturais em tubérculos de dois genótipos de batata armazenados em duas temperaturas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.4, p.583-588, 2002.

CHAPPER, M.; BACARIN, M. A.; PEREIRA, A. da S.; LOPES, N. F. Atividade amidolítica e de invertase ácida solúvel em tubérculos de batata armazenados sob duas condições de temperatura. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, p.597-601, 2004.

CHEN, S.; HAJIREZAEI, M.; BÖRNKE, F. Differential expression of sucrose phosphate synthase isoenzymes in tobacco reflects their functional specialization during dark-governed starch mobilization in source leaves. **Plant Physiology**, Stuttgart, v.139, p.1163-1174, 2005.

CHEN, S.; HAJIREZAEI, M. R.; ZANOR, M. I.; HORNYIK, C.; DEBAST, S.; LACOMME, C.; FERNIE, A. R.; SONNEWALD, U.; BORNKE, F. RNA interference-mediated repression of sucrose-phosphatase in transgenic potato tubers (*Solanum tuberosum*) strongly affects the hexose-to-sucrose ratio upon cold storage with only minor effects on total soluble carbohydrate accumulation. **Plant, Cell and Environment**, Logan, v.31, p.165-176, 2008.

CHIRGWIN, J. M.; PRYZBYLA, A. E.; MACDONALD, R. J.; RUTTER, W. J. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease, **Biochemistry**, London, n.18, p.5294-5299, 1979.

CIERESZKO, I.; JOHANSSON, H.; KLECZKOWSKI, L. A. Sucrose and light regulation of a cold-inducible UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in Arabidopsis. **Biochemical Journal**, Iowa, v.354, p.67-72. 2001.

CLUSTALW2. Website of EMBL-EBI. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>>. Acesso em: 27 jun. 2005.

COELHO, A. H. R.; VILELA, E. R.; CHAGAS, S. J. R. 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, 1999.

CONNOLLY, M. A.; CLAUSEN, P. A.; LAZAR, J. G. **Purification of RNA from Plant Tissue Using the Concert Plant Reagent.** CSH Protocols; 2006; doi:10.1101/pdb.prot4106.

COSTA, D. M. Duas novas cultivares de batatas (*Solanum tuberosum* L.) criadas pela EMBRAPA/CNPQ. **HortiSul**, Pelotas, v.2, n.3, p.28-31, 1992.

COPP, L. J.; BLENKINSO, R. W.; YADA, R. Y.; MARANGONI, A. G. The relationship between respiration and chip color during long-term storage of potato tubers. **American Potato Journal**, Orono, v.77, n.5, p.279-287, 2000.

CORRENT, A. R. **Expressão diferencial de cdnas de maçãs cv. fuji em resposta à inoculação com os fungos *Botryosphaeria dothidea* e *Penicillium expansum* e o tratamento térmico em pós-colheita**. 2007. 154f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

DAL CIN, V.; DANESIN, M.; RIZZINI, F. M.; RAMINA, A. RNA extraction from plant tissues. The use of calcium to precipitate contaminating pectic sugars. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v.31, p.113-120, 2005.

DALE, M. F. B.; MACKAY, G. R. Inheritance of table and table and processing quality. In: MACKAY, G. R.; BRADSHAW, J. E. **Potato genetics**. 2.ed. Cambridge: CAB International, 1994. p.285-315.

DAVIES, H. V.; JEFFERIES, R. A.; SCOBIE, L. Hexose accumulation in cold stored tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.): the effects of water stress. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.134, n.4, p.471-475, 1989.

DAVIES, H. V.; MACKAY, G. R. Exploitation of genetic variation to improve potato quality. **Aspects of Applied Biology**, Lanhan, v.39, n.1, p.45-49, 1994.

DAVIES, H. V. Prospects for manipulating carbohydrate metabolism in potato tuber. **Aspects of Applied Biology**, Lanhan, v.52, p.245-254, 1998.

DAVIES, H. V.; VIOLA, R. Regulation of sugar accumulation in stored potato tubers. **Postharvest News and Information**, Oxon, v.3, n.1, p.97-100, 1992.

DE WILDE, T.; DE MEULENAER, B.; MESTDAGH, F.; GOVAERT, Y.; VANDEBURIE, S. Influence of storage practices on acrylamide formation during potato frying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.53, p.6550-6557, 2005.

DEUNER, S.; FERREIRA, L. S.; BACARIN, M. A.; BERVALD, C. M. P.; ZANATTA E. R. Caracterização parcial da invertase ácida solúvel em tubérculos de batata: energia de ativação e efeito de inibidores. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.11, n.1, p.45-50, 2005.

DIXON, W. L.; AP REES, T. Carbohydrate metabolism during cold-induced sweetening of potato tubers. **Phytochemistry**, Kidlington, v.19, p.1653-1656, 1980.

FAO. Website of Food and Agriculture Organization of United Nations. Disponível em: <<http://faofast.fao.org>>. Acesso em: 05 ago. 2008.

FERNIE, A. R.; ROESSNER, U.; TRETHERWEY, R. N.; WILLMITZER, L. The contribution of plastidial phosphoglucomutase to the control of starch synthesis within the potato tuber. **Planta**, Berlin, v.213, p.418-426, 2001.

FERNIE, A. R.; WILLMITZER, L.; TRETHERWEY, R. N. Sucrose to starch: a transition in molecular plant physiology. **Trends in Plant Science**, London, v.7, n.1, p.35-41, 2002.

FINLAY, M.; DALE, B.; BRADSHAW, J. E. Progress in improving processing attributes in potato. **Trends in Plant Science**, London, v.7, n.7, p.310-312, 2003.

GEIGENBERGER, P. Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.54, 457-465, 2003.

GEIGENBERGER, P.; FERNIE, A. R.; GIBON, Y.; CHRIST, M.; STITT, M. Metabolic activity decreases as an adaptive response to low internal oxygen in growing potato tubers. **Biological Chemistry**, v.381, p.723-740, 2000.

GEIGENBERGER, P.; MÜLLER-RÖBER, B.; STITT, M. Contribution of adenosine 5'-diphosphoglucose pyrophosphorylase to the control of starch synthesis is decreased by water stress in growing potato tubers. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.209, 338-345, 1999.

GEIGENBERGER, P.; REIMHOLZ, R.; GEIGER, M.; MERLO, L.; CANALE, V.; STITT, M. Regulation of sucrose and starch metabolism in potato tubers in response to short-term water deficit. **Planta**, Berlin, v.201, p.502-518, 1997.

GEIGENBERGER P, MERLO L, REIMHOLZ R, STITT M. When growing potato tubers are detached from their mother plant there is a rapid inhibition of starch synthesis, involving inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase. **Planta**, Berlin, v.193, p.486-493, 1994.

GEIGENBERGER, P.; STITT, M.; FENIE, A. R. Metabolic control analysis and regulation of the conversion of sucrose to starch in growing potato tubers. **Plant, Cell and Environment**, Logan, v.27, p.655-673, 2004.

GLOMB, M. A.; PFAHLER, C. Synthesis of 1-deoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose, a major hexose Maillard intermediate. **Carbohydrate Research**, v.329, n.3, p.515-23, 2000.

GOULD, W. A. Quality of potatoes for chip manufacture. In: **Symposium Potato**, (ed COLLINS, F.). Fort Collins: The Potato Association, 1988. p.11-21.

GUY, C. L. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.41, p.277-291, 1990.

HAJIRAZAEI, M; TAKAHATA, Y.; TRETHERWAY, R. N.; WILLMITZER, L.; SONNEWALD, U. Impact of elevated cytosolic and apoplastic invertase activity on carbon metabolism during potato tuber development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.51, p.439-445, 2000.

HAMMOND, J. B. W.; BURRELL, M. M.; KRUGER, N. J. Effect of low temperature on the activity of phosphofructokinase from potato tubers. **Planta**, Berlin, v.180, n.4, p.613-616, 1990.

HATZFELD, W. D.; DANCER, J.; STITT, W. M. Fructose-2,6-biphosphate, metabolites and coarse control of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase during triose-phosphate cycling in heterothrophic cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. **Planta**, Berlin, v.180, n. 2, p.205-211, 1990.

HILL, L.; REIMHOLZ, R.; SCHRÖDER, R.; NIELSEN, T. H.; STITT, M. The onset of sucrose accumulation in cold-stored potato tubers in caused by an increased rate of sucrose synthesis and coincides with low levels of hexose-phosphates, an activation of sucrose phosphate synthase and the appearance of a new form of amylase. **Plant, Cell and Environment**, Logan, v.19, p.1223-1237, 1996.

HOFIUS, D.; BÖRNKE, F. A. J. Photosynthesis, carbohydrate metabolism and sink-source relations. In: **Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives** (ed. VREUGDENHIL, D.). Elsevier: Amsterdam, 2007. p.257-285.

HUBER, S, C.; HUBER, J. L. A.; McMICHAEL, R. W. The regulation of sucrose synthesis in leaves. In: **Carbon partitioning within and between organisms**, (eds POLLOCK, C. J.; FARRAR, J. F.; GORDON, A. J.). Oxford: BIOS Scientific Publishers, p.1-26, 1992.

HUBER, S, C.; HUBER, J. L. A. Role of sucrose-phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. **Plant Physiology**, Stuttgart, v.99, p.1275-1278, 1992.

HUBER, S, C.; HUBER, J. L. A. Role and regulation of sucrose phosphate synthase in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v.47, p.431-444, 1996.

HU, C. G.; HONDA, C.; KITA, M.; ZHANG, Z.; TSUDA, T.; MORIGUCHI, T. A simple protocol for RNA isolation from fruit trees containing high levels of polysaccharides and polyphenol compounds. **Plant Molecular Biology Reporter**, Atenas, v.20 p.69-69, 2002.

IANDOLINO, A. B.; SILVA F. G.; LIM, H.; CHOI, H.; WILLIAMS L. E.; COOK D. R. High-quality RNA, cDNA, and derived EST librariesv from Grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Plant Molecular Biology Reporter**, Atenas, v.22, p.269-278, 2004.

ISHERWOOD, F. A. Starch-sugar interconversion in *Solanum tuberosum*. **Phytochemistry**, Oxford, v.15, n.1, p.33-41, 1976.

JAAKOLA, L.; PIRTTILA, A. M.; HALONNEN, M.; HOHTOLA, A. Isolation of high quality RNA from Bilberry (*Vaccinum myrtillus* L.) fruit. **Molecular Biotechnology**, n.19, p.201-203, 2001.

KIM, S.; HAMADA, T. Rapid and reliable method of extracting DNA and RNA from sweetpotato, *Ipomoea batata* (L.) Lam. **Biotechnology Letters**, n.27, p.1841-1845, 2005.

KLECZKOWSKI, L. A. Glucose activatin and metabolism through UDP-glucose pyrophosphorylase in plants. **Phytochemistry**, v.37, n.6, p.1507-1515,1994.

- KRUGER, N. J. Carbohydrate synthesis and degradation. In: DENNIS, D. T.; TURPIN, D. H.; LEFEBVRE, D. D.; LAYZELL, D. B. eds. **Plant Metabolism**, Harlow, UK: Longman, p.83-104, 1997.
- KRUGER, N. J.; HAMMOND, J. B. W.; BURRELL, M. M. Molecular characterization of four forms of phosphofructokinase purified from potato tuber. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v.267, n.2, p.690-700, 1988.
- LANGENKÄMPER, G.; FUNG, R. W. M., NEWCOMB, R. D.; ATKINSON, R. G.; GARDNER R.C.; MACRAE, E. A. Sucrose phosphate synthase genes in plants belong to three different families. **Journal of Molecular Evolution**, v.54, p.322-332, 2002.
- LEONG, L. P.; WEDZICHA, B. L. A critical appraisal of the kinetic model for the Maillard browning of glucose with glycine. **Food Chemistry**, v.68, n.1, p.21-28, 2000.
- LI, Z.; TRICK, H. N. Rapid method for high quality RNA isolation from seed endosperm containing high levels of starch. **BioTechniques**. n.38, p.872-876, 2005.
- LOGEMANN, J.; SCHELL, J.; WILLMITZER, L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. **Analytical Biochemistry**, n.163, p.16-20, 1987.
- LOPES, C. A. **Cultivo da Batata (*Solanum tuberosum* L.)**. Instruções técnicas da Embrapa Hortaliças, v.8, p.1-3, 1997.
- LOPEZ-GOMEZ, R.; GOMEZ-LIM, M. A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. **Hortscience**, Alexandria, v.27, p.440-442, 1992.
- LUNN J.E. Sucrose-phosphatase gene families in plants. **Gene**, v.303, p.187-196, 2003.
- LUNN, J. E.; MACRAE, E. Control of sucrose biosynthesis. In: **Control of Primary Metabolism in Plants** (eds PLAXTON, W. C.; MCMANUS, M. T.). Oxford: Blackwell, 2006. p.234-250.
- MALNOY, M.; REYNOIRD, J. P.; MOURGUES, F.; CHEVREAU, E.; SIMONEAU, P. A method for isolating total RNA from pear leaves. **Plant Molecular Biology Reporter**, Atenas, v.19, p.69a-69f, 2001.
- MALONE, J. G.; MITTOVA, V.; RATCLIFFE G. R.; KRUGER, N. J. The response of carbohydrate metabolism in potato tubers to low temperature. **Plant and Cell Physiology**, v.47, n.9, p.1309-1322, 2006.
- MEISEL, L.; FONSECA, B.; GONZÁLEZ, S.; BAEZAYATES, R.; CAMBIAZO, V.; CAMPOS, R.; GONZALEZ, M.; ORELLANA, A.; RETAMALES, J.; SILVA, H. A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus persica*) for functional genomics analyses. **Biological Research**, v.38 p. 83-88, 2005.

MELO, P. E. Cultivares de batata potencialmente úteis para processamento na forma de fritura no Brasil e manejo para obtenção de tubérculos adequados. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.20, n.197, p.112-119, 1999.

MENDES, C. R.; BACARIN, M. A.; BERVALD, C. M. P.; TREVIZOL, F. C.; LOPES, N. F. Purificação parcial de uma invertase ácida solúvel de tubérculos de batata armazenados em baixa temperatura. **Revista Ceres**, Viçosa, v.52, p.217-229, 2005.

MITRA, D.; KOOTSTRA, A. Isolation of RNA from apple skin. **Plant Molecular Biology Reporter**, Atenas, v.11, p.326-332, 1993.

MOLINA, A. L.; TOBO, P. R. Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. **Revista Einstein**, v.2, n.2, p.139-142, 2004.

MOTTRAM, D. S.; WEDZICHA, B. L.; DODSON, A. T. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. **Nature**, v.419, 448-449, 2002.

MÜLLER-RÖBER, B.; KOSSMANN, J.; HANNAH, L. C.; WILLMITZER, L.; SONNEWALD, U. One of 2 different ADP-glucose pyrophosphorylase genes from potato responds strongly to elevated levels of sucrose. **Molecular and General Genetics**, v.224, 136-146, 1990.

MÜLLER-RÖBER, B.; SONNEWALD, U.; WILLMITZER, L. Inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. **EMBO Journal**, Oxford, v.11, n.4, p.1229-1238, 1992.

MULLIS, K. B.; FALOONA F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v.155, p.335-350, 1987.

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, v.262, p.56-62, 1990.

NAKANO, K.; OMURA, Y.; TAGAYA, M.; FUKUI, T. UDP-glucose pyrophosphorylase from potato tuber: purification and characterization. **The Journal of Biochemistry**, v.106, n.3, p.528-532, 1989.

NAKATA, P. A.; OKITA, T. W. Studies to enhance starch biosynthesis by manipulation of ADP-glucose pyrophosphorylase genes. In: BELKNAP, W. R.; VAYDA, M. E.; PARK, W. P. (Ed.). **The molecular and cellular biology of the potato**. 2.ed. Wallingford: CAB International, 1994. p.31-44.

NCBI. Website of National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. acesso em 27 jun. 2005.

NIELSEN, T. H.; DEITING, U.; STITT, M. A beta-amylase in potato tubers is induced by storage at low temperature. **Plant Physiology**, Stuttgart, v.113, p.503-510, 1997.

NIELSEN, T. H.; KRAPP, A.; ROPER-SCHWARZ, U.; STITT, M. The sugar-mediated regulation of genes encoding the small subunit of Rubisco and the regulatory subunit of ADP glucose pyrophosphorylase is modified by phosphate and nitrogen. **Plant, Cell and Environment**, Logan, v.21, p.443-454, 1998.

NORIO, R.; FUKUA, R. M. A indústria fala. **Batata Show**, Itapetininga, n.1, p.19-20, 2001.

OKITA, T. W.; NAKATA, P. A.; ANDERSON, J. M.; SOWOKINOS, J.; MORELL, M.; PREISS, J. The Subunit Structure of Potato Tuber ADPglucose Pyrophosphorylase. **Plant Physiology**, Stuttgart, v.93, p.785-790, 1990.

OLSSON, K.; SVENSSON, R.; ROSLUND, C. A. Tuber components affecting acrylamide formation and colour in fried potato: variation by variety, year, storage temperature and storage time. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.84, p.447-458, 2004.

OSTER, A. H. **Tratamento com calor no controle de *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces & De Not em maçãs cv. Fuji**. 2004. 84f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PATHIRANA, R.; HARRIS, J. C.; MCKENZIE, M. J. A comparison of microtubers and field-grown tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.) for hexoses, sucrose and their ratios following postharvest cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, v.49, n.1, p.180-184, 2008.

PEREIRA, A. da S.; COFFIN, R. H.; YADA, R. Y.; MACHADO, V. S. Inheritance patterns of reducing sugars in potato tubers after storage at 12°C and 4°C followed by reconditioning. **American Potato Journal**, Orono, v.70, n.1, p.71-76, 1993.

PEREIRA, A. da S.; COSTA, D. da M. Qualidade e estabilidade de chips de batata. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.15, n.1, p.62-65, 1997.

PEREIRA, A. da S. Composição química, valor nutricional e industrialização. In: REIFSCHNEIDER, F. J. B. (coord.). **Produção de batata**. Brasília: Linha, 1987. p.12-28.

PEREIRA, A. S.; COSTA, D. M.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; DANIELS, J.; CHOER, E.; AUGUSTIN, E.; FORTES, G. R. L.; BERTONCINI, O.; HIRANO, E.; GOMES, C. B. BRS Pérola: cultivar de batata adaptada a sistema de produção de pequenos produtores, para processamento de "batata palha". **Agropecuária Clima Temperado**, Pelotas, v.2, n.2, p.287-290, 2000.

POPP, P. A. Industrialização da batata no Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DE PRODUÇÃO DE BATATA, 7, 1994, Araucária. **Anais....** Araucária, 1994. p.60-61.

PREISS, J. Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.33, p.431-454, 1982.

PREISS, J. Biosynthesis of starch and its regulation. In: PREISS, J. (Ed.) **The biochemistry of plantas**. San Diego: Academic Press, 1988. p.181-254.

PREISS, J. Modulation of starch synthesis. In: FOYER, C.; QUICK, P. (Ed.) **Engineering Improved Carbon and Nitrogen Resource Use Efficiency in Higher Plants**. London: Taylor and Francis, 1997. p.81-104.

RASMUSSEN, J. O.; RASMUSSEN, O. S. Characterisation of somatic hybrids of potato by the use of RAPD and isozyme analysis. **Physiologia Plantarum**, v.93, p.357-364, 1995.

RODRIGUES, N. S. S. **Avaliação tecnológica e sensorial de novos genótipos de batata (*Solanum tuberosum* L.) para industrialização na forma de pré fritas congeladas**. 2001. 177f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SALANOUBAT, M., BELLIARD, G. The steady-state level of potato sucrose synthase mRNA is dependent on wounding, anaerobiosis and sucrose concentration. **Gene**, v.141, p.181-185, 1989.

SALLES, L. A. Mercado mundial: A batata (*Solanum tuberosum* L.) é a quarta cultura em importância agrícola no mundo, seu mercado está em expansão. **Cultivar Hortaliças e Frutas**, n.10, p.21-23, 2001.

SALZMAN, R. A.; FUJITA, T.; ZHU-SALZMAN, K.; HASEGAWA, P. M., BRESSAN, R. A. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds and carbohydrates. **Plant Molecular Biology Reporter**, Atenas, v.17, p.11-17, 1999.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**, v.2, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 745p.

SCHEIBLE, W. R., GONZALEZ, F. A., LAUERER, M.; MULLERROBER, B.; CABOCHE, M.; STITT, M. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. **Plant Cell**, v.9, p.783-798, 1997.

SHARMA, A. D.; GILL, P. K.; SINGH, P. RNA isolation from plant tissues rich in polysaccharides. **Analytical Biochemistry**, n.314, p.319-321, 2003.

SHEWMAKER, C. K.; STALKER, D. M. Modifying starch biosynthesis with transgenes in potatoes. **Plant Physiology**, Stuttgart, v.100, p.1083-1086, 1992.

SHOHAM, N. G.; ARAD, T.; ROSIN-ABERSFELD, R.; MASHIAH, P.; GAZIT, A.; YANIV A. Differential display assay and analysis. **BioTechniques**, v.20, p.182-184, 1996.

SHOTT, K.; BORCHERT, S.; MÜLLER-RÖBERT, B.; HELDT, H. W. Transport of inorganic phosphate and C3 and C6 sugar phosphates across the envelope membranes of potato tuber amyloplast. **Planta**, Berlin, v.196, n.4, p.647-652, 1995.

SILVA, A. C. F. Batata: alguns aspectos importantes. **Agropecuária Catarinense**, v.4, n.4, p.38-41, 1991.

SMITH, A. M.; ZEEMAN, S. C. SMITH, S. M. Starch degradation. **Annual Review of Plant Biology**, v.56, p.73-98, 2005.

SOKOLOV, L. N.; DEJARDIN, A.; KLECZKOWSKI, L. A. Sugars and light/dark exposure trigger differential regulation of ADP-glucose pyrophosphorylase genes in *Arabidopsis thaliana* (thale cress). **Biochemistry Journal** v.336, p.681-687, 1998.

SOWOKINOS, J. R. Biochemical and molecular control of cold induced sweetening in potatoes. **American Journal of Potato Research**, v.78, n.3, p.221-236, 2001.

SOWOKINOS, J. R. Stress-induced alterations in carbohydrate metabolism. In: VAYDA, M. E.; PARK, W. P. (Ed.). **The molecular and cellular biology of the potato**. Wallingford: CAB International, 1990. p.137-158.

SOWOKINOS, J. R. Post-harvest regulation of sucrose accumulation in transgenic potatoes: role and properties of potato tuber UDP-glucose pyrophosphorylase. In: BELKNAP, W. R.; VAYDA, M. E.; PARK, W. P. (Ed.). **The molecular and cellular biology of the potato**. 2.ed. Wallingford: CAB International, 1994. p.81-106.

SOWOKINOS, J. R.; THOMAS, C.; BURREL, M. M. Pyrophosphorylases in Potato. **Plant Physiology**, Stuttgart, v.113, n.2, p.511-517, 1997.

SPYCHALLA, J. P.; SCHEFFLER, B. E.; SOWOKINOS, J. R.; BEVAN, M. W. Cloning, antisense RNA inhibition, and the coordinated expression of UDP-glucose pyrophosphorylase with starch biosynthesis gene in potato tubers. **Journal of Plant Physiology**, v.144, n.4-5, p.444-453, 1994.

STADLER, R. H.; BLANK, I.; VARGA, N.; ROBERT, F.; HAU, J.; GUY, A. P.; ROBERT, M. C.; RIEDIKER, S. Acrylamide from Maillard reaction products. **Nature**, v.419, 449p. 2002.

STEVENSON, F. J.; AKELEY, R. V.; McLEAN, J. G. Potato utilization in relation to variety (heredity), and environment. **American Potato Journal**, Orono, v.31, p.327-340, 1954.

STEVENSON, F. J.; CUNNINGHAM C. E. Chip color in relation to potato storage. **American Potato Journal**, Orono, v.38, p.105-113, 1961.

STITT, M.; HUBER, S. C.; KERR, P. Control of photosynthetic sucrose synthesis. In: **The Biochemistry of Plants**. (Hatch, M.D. and Boardman, M.K., eds). London: Academic Press, v.10, p.327-409, 1987.

TAKANO, K. Batata pré frita congelada: questão de tempo. **Batata Show**, Itapetininga, n.3, p.16, 2001.

TAUBERGER, E.; FERNIE, A. R.; EMMERMANN, M.; RENZ, A.; KOSSMANN, J.; WILLMITZER, L.; TRETHERWAY, R. N. Antisense inhibition of plastidial phosphoglucomutase provides compelling evidence that potato tuber amyloplast import carbon from the cytosol in the form of glucose-6-phosphate. **Plant Journal**, Oxford, v. 23, n.1, p.43-53, 2000.

TIESSEN, A.; HENDRIKS, J. H. M.; STITT, M.; BRANSCHEID A.; GIBON, Y.; FARRÉ, E. M.; GEIGENBERGER, P. Starch Synthesis in Potato Tubers Is Regulated by Post-Translational Redox Modification of ADP-Glucose Pyrophosphorylase: A Novel Regulatory Mechanism Linking Starch Synthesis to the Sucrose Supply, **The Plant Cell**, Rockville, v.14, p.2191-2213, 2002.

TIESSEN, A.; PRESCHA, K.; BRANSCHEID, A.; PALACIOS, N.; MCKIBBIN, R.; HALFORD, N. G.; GEIGENBERGER, P. Evidence that SNF1- related kinase and hexokinase are involved in separate sugarsignalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. **Plant Journal**, Oxford, v.35, p.490-500, 2003.

THOMASHOW, M. F. Molecular genetics of cold acclimation in higher plants. **Advanced Genetics**, New York, v.28, p.99-131, 1990.

TRETHERWEY, R.N. et al. Expression of a bacterial sucrose phosphorylase in potato tubers results in a glucose-independent induction of glycolysis. **Plant, Cell and Environment**, Logan, v.24, p.357-365, 2001.

TREVANION, S. J.; KRUGER, N. J. Effect of temperature on the kinetics properties of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tuber. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.137, n.6, p.753-759, 1991.

VAN BUSKIRK, H. A.; THOMASHOW, M. F. Arabidopsis transcription factors regulating cold acclimation. **Physiologia Plantarum**. v.126, p.72-80. 2006

VAN ES, A.; HARTMANS, K. J. Starch and sugars during tuberization, storage and sprouting. In: **Storage of potatoes**, Wageningen: PUDOC, 1987. p.79-113.

VICIENT, C. M.; DELSENY, M. Isolation of total RNA from *Arabidopsis thaliana* seeds. **Analytical Biochemistry**, New York, n.268, p.412-413, 1999.

VIOLA, R.; DAVIES, H. V. Effect of temperature on pathways of carbohydrate metabolism in tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Plant Science**, Limerick, v.103, n.2, p.135-143, 1994.

VIOLA, R.; ROBERTS, A. G.; HAUPT, S.; GAZZANI, S.; HANCOCK, R. D.; MARMIROLI, N.; MACHRAY, G. C.; OPARKA, K. J. Tuberization in potato involves a switch from apoplatic to symplastic phloem unloading. **The Plant Cell**, Rockville, v.13, p.385-398, 2001.

WAN, C. Y.; WITKINS, T. A. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Analytical Biochemistry**, Nova York, v.233, p.7-12, 1994.

WEISHING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; MEYER, W. DNA Isolation and Purification. In: **DNA Fingerprinting in Plants and Fungi**. Boca Raton, Fla.: CRC Press. USA, 1995. p.44-59.

WEBER, A. P. Solute transporters as connecting elements between cytosol and plastid stroma. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, p.247-253, 2004.

WILLIAMS, J. S. E. Influence of variety and processing conditions on acrylamide levels in fried potato crisps. **Food Chemistry**, v.90, p.875-881, 2005.

YADA, R.; MARANGONI, A.; STANLEY, D. Avoiding chilling injury in the storage of fruits and vegetables. **Highlights Of Agricultural And Food Research In Ontario, California**, v.13, n.4; p.25-28, 1990.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review of Plant Physiology**, Stuttgart, v.57, p.781-803, 2006.

ZENG, Y.; WU, Y.; AVIGNE, W. T.; KOCH, K. E. Differential regulation of sugar-sensitive sucrose synthases by hypoxia and anoxia indicate complementary transcriptional and posttranscriptional regulation. **Plant Physiology**, Stuttgart, v.116, p.1573-1583, 1998.

ZENG, Y.; YANG, T. RNA Isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**, Atenas, v.20, p.417a-417e, 2002.

ZRENNER, R.; WILLMITZER, L.; SONNEWALD, U. Analysis of the expression of potato uridinediphosphate-glucose pyrophosphorylase and its inhibition by antisense RNA. **Planta**, Berlin, v.190, n.2, p.247-252, 1993.

ZRENNER, R.; SALANORBAT, M.; WILLMITZER, L.; SONNEWALD, U. Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants. **The Plant Journal**, Oxford, v.7, p.97-107, 1996.