

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência
e Tecnologia Agroindustrial



Dissertação

Ação do etileno na expressão do gene *MdAF3* e na atividade enzimática α -L-arabinofuranosidase em maçã (*Malus domestica Borkh.*) cv. 'Gala' durante o armazenamento refrigerado

Tatiane Timm Storch

Pelotas, fevereiro de 2011

TATIANE TIMM STORCH

Ação do etileno na expressão do gene *MdAF3* e na atividade enzimática α -L-arabinofuranosidase em maçã (*Malus domestica Borkh.*) cv. 'Gala' durante o armazenamento refrigerado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Ciência e Tecnologia Agroindustrial).

Comitê de Orientação:

César Luis Girardi

Cesar Valmor Rombaldi

Pelotas, 2011

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

S884a Storch, Tatiane Timm

Ação do etileno na expressão do gene MdAF3 e na atividade enzimática α -L-arabinofuranosidase em maçã (*Malus domestica* Borkh.) cv. "Gala" durante o armazenamento refrigerado / Tatiane Timm Storch ; orientador César Luis Girardi , Cesar Valmor Rombaldi. - Pelotas, 2011.

61f. ;

il.- Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011.

1.MdAF3 2.Parede celular 3.Firmeza de polpa 4.Etileno 5.1-MCP 6.Maça Gala I.Girardi, César Luis(orientador) II .Rombaldi, Cesar Valmor III.Título.

CDD 664.853

Banca examinadora:

César Luís Girardi

Cesar Valmor Rombaldi

Norma Machado Silva

Jorge Adolfo Silva

Dedico:

*Aos meus amados pais Ermindo e
Reni Storch, que estão sempre ao
meu lado me acompanhando em
todas as minhas conquistas.*

Agradecimentos

Ao CNPq, pela concessão da bolsa.

À Embrapa Uva e Vinho, especialmente aos laboratórios de Pós-colheita, Biologia molecular vegetal, Análise de solos e tecidos e Virologia por poder realizar meus experimentos em suas dependências.

Ao Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi pelos valiosos ensinamentos.

Ao Dr. César Luís Girardi pela orientação, receptividade, confiança depositada e apoio em todos os momentos.

À Norma, pela ajuda e ensinamentos indispensáveis à realização do projeto.

Aos amigos e colegas do laboratório de pós-colheita, em especial, Wandersom, Paula, Débora, Miguel, Mariana e Fernando.

Aos colegas do laboratório 710 do DCTA, em especial Miriane e Lírio.

Ao Marcos, secretário do DCTA pela disposição em ajudar e, pela reconhecida eficiência com que desempenha seu trabalho.

A todos os que conviveram comigo na pousada dos estagiários da Embrapa Uva e Vinho, em especial à Carol e ao Cléber pelas muitas risadas, à Cindy pela amizade e companheirismo, ao Marcelo Zart por suas palavras sempre sábias e por nos passar um pouco de sua tranquilidade e bom humor, e ao Daniel, pelas risadas, amizade e alegria que sempre proporcionou a todos na pousada.

À minha querida amiga Renata, por me acompanhar nesta caminhada e me ajudar em todas as dificuldades.

À minha irmã Rejane, e ao meu cunhado, André, por todo o apoio.

Aos meus amadíssimos sobrinhos Natasha e Matheus por encherem meu coração de alegria.

Aos meus pais pelos bons exemplos e pelo amor que me possibilitaram chegar até aqui.

E, finalmente, agradeço a Deus, que guia os meus passos, e me acompanha em todos os momentos, me dando força e sabedoria para alcançar os meus objetivos.

Muito obrigada!!!

*“Bendigo o SENHOR, que me aconselha;
pois até durante a noite o meu coração
me ensina”. Salmo 16.7*

Resumo

STORCH, Tatiane Timm. **Ação do etileno na expressão do gene *MdAF3* e atividade enzimática α -L-arabinofuranosidase em maçã (*Malus domestica* Borkh.) cv. 'Gala' durante o armazenamento refrigerado.** 2011. 61f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A maçã 'Gala' apresenta vida útil limitada devido às alterações de textura da polpa, que podem ser observadas já nos primeiros meses de armazenamento refrigerado. Essas mudanças se devem às alterações mediadas por enzimas atuantes na parede celular e na lamela média. Dentre essas enzimas, as α -L-arabinofuranosidasas atuam na hidrólise nas cadeias laterais da pectina, mostrando importância na alteração da textura dos frutos. A expressão e atividade dessas enzimas, assim como outras alterações que acompanham o amadurecimento, têm sido relacionadas com a ação do etileno, porém essa relação nem sempre é clara. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo estudar a influência do etileno sobre a expressão do gene *MdAF3* em um clone de maçã 'Gala' (Baigent) bem como avaliar a atividade enzimática α -L-arabinofuranosidase e outras alterações dos frutos, como firmeza de polpa e síntese de etileno endógeno, em resposta aos tratamentos com etileno exógeno e 1-MCP. Os níveis de transcritos de *MdAF3* foram reduzidos com a aplicação de 1-MCP e aumentados pelo tratamento com etileno, o que indica ser este gene regulado pelo hormônio. A atividade enzimática esteve mais baixa com o 1-MCP e a firmeza de polpa manteve-se mais alta com esse tratamento. Esses resultados indicam que o gene *MdAF3* codifica uma proteína com atividade α -L-arabinofuranosidase e que esta, por sua vez, participa nos processos que culminam com a mudança na textura de maçãs cv. 'Gala'. Ainda, verificou-se que atividade enzimática e transcrição do gene mostraram importância no armazenamento desta cultivar, pois nesse período alcançaram níveis mais altos quando comparados com os frutos no momento da colheita.

Palavras-chave: Maçã cv. 'Gala'. α -L-Arabinofuranosidase. *MdAF3*. Parede celular. Firmeza de polpa. Etileno. 1-MCP.

Abstract

STORCH, Tatiane Timm. **Ethylene action on gene expression *MdAF3* and α -L-arabinofuranosidase enzyme activity in apple (*Malus domestica Borkh.*) cv. 'Gala' during cold storage.** 2011. 61f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The 'Gala' apples has limited shelf life due to changes in texture of the pulp, which can be observed during the first months of storage. These changes are due to changes mediated by enzymes active in the cell wall and middle lamella of cells. Among these enzymes, the α -L-arabinofuranosidases act in the hydrolysis of pectin side chains, showing its importance in changing the texture of the fruit. Expression and activity of these enzymes, as well as other changes that occur during ripening, have been related to ethylene action, although this relationship is not always clear. Thus, the aim of this work was to study the influence of ethylene on gene expression *MdAF3* in a clone 'Gala' apple (Baigent). Additionally, evaluate the α -L-arabinofuranosidase enzyme activity, and other changes, such as firmness and endogenous synthesis of ethylene in response to treatments with exogenous ethylene and 1-MCP. The levels of *MdAF3* transcripts were reduced by applying 1-MCP and increased by treatment with ethylene, indicating that this gene is regulated by the hormone. The enzyme activity was lower with 1-MCP, and the pulp firmness remained higher with this treatment. These results indicate that the gene *MdAF3* encodes a protein with activity α -L-arabinofuranosidase, and this enzyme participates in the processes that culminate with changes in the pulp texture of apples cv. 'Gala'. Besides, it was found that both enzyme activity and gene transcription were important for the storage of this cultivar, since in this period reached higher levels when compared with the fruit at harvest.

Keywords: Apple cv. 'Gala'. α -L-Arabinofuranosidase. *MdAF3*. Cell wall. Ethylene. 1-MCP.

Lista de Figuras

Figura 1. Ponto ideal de colheita e alterações dos compostos responsáveis pela qualidade da maçã ao longo do desenvolvimento do fruto e armazenamento.....	16
Figura 2. Esquema de parede celular primária e lamela média de tecidos vegetais.....	18
Figura 3. Representação da estrutura ramnogalacturonana I, a região ramificada da pectina.....	20
Figura 4. Efeito da aplicação de etileno exógeno e 1-MCP sobre a produção de etileno em clone de maçã ‘Gala’.....	40
Figura 5. Influência dos tratamentos com etileno e 1-MCP na firmeza de polpa de maçãs armazenadas em temperatura ambiente.....	41
Figura 6. Atividade α -L-arabinofuranosidase em maçã ‘Gala’ ao longo do período de armazenamento: efeito dos tratamentos com etileno e 1-MCP em comparação ao controle.....	45
Figura 7. Gel de agarose a 1% corado com Gel Red. As bandas correspondem aos RNAs 12 dias controle (A), 12 dias etileno (B) e 12 dias 1-MCP (C).....	47
Figura 8. Quantificação relativa de transcritos do gene <i>MdAF3</i> em frutos não tratados (controle) e tratados com etileno e 1-MCP após 4 horas (A) e 12 dias (B) de manutenção a temperatura ambiente e em frutos mantidos por 2 (C), 4 (D) e 6 meses (E) em armazenamento refrigerado mais 7 dias em temperatura ambiente. Os valores representam os transcritos em comparação com a expressão do gene constitutivo <i>MdEF1β</i>	51

Lista de Tabelas

Tabela 1. Qualidade dos frutos de maçã cv. 'Gala' colhidos na maturação fisiológica: comparação com os parâmetros de colheita.....	39
Tabela 2. Qualidade de frutos de maçã cv. 'Gala' mantidos sob refrigeração por 2, 4 e 6 meses. Os resultados são observações realizadas em frutos mantidos 7 dias em temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$).....	42
Tabela 3. Resultados da avaliação da qualidade de RNAs através de densidade ótica (OD) e quantificação por espectrofotometria de UV.....	48

Lista de Abreviaturas

cmol – Centímol

CTAB - Brometo de cetiltrimetilamônio

DEPC - Dietil pirocarbonato

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DNAse – Desoxirribonuclease

dNTPs – *Kit* de nucleotídeos

EC – Enzyme commission

EDTA - Ácido etileno diamino tetracético

g – Gramas

h – Hora

lbs – Libras

LiCl – Cloreto de lítio

mg – miligramas

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mL – Mililitros

mm – Milímetros

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

NaCl – Cloreto de sódio

nm – Nanômetros

Oligo d(T) - Oligonucleotídeo T

pb – Pares de bases nitrogenadas

ppb – Partes por bilhão

ppm – Partes por milhão

PVP – Polivinilpirrolidona

RNA – Ácido ribonucléico

RNAse – Ribonuclease

rpm – Rotações por minuto

RT – Transcriptase reversa

Tris-HCl - Tris (hydroxymethyl) aminomethane Hydrochloride

U – Unidades (de enzima)

UV – Ultravioleta

μL – Microlitros

Sumário

1. Introdução geral	11
2. Revisão da literatura	15
2.1. A maçã ‘Gala’.....	15
2.2. Parede celular vegetal e alterações na textura dos frutos durante o amadurecimento.....	17
2.3. Pectina.....	19
2.4. Hidrolases de carboidratos e sua influência nas alterações da pectina durante o amadurecimento.....	22
2.5. α -L-Arabinofuranosidase.....	25
2.6. Etileno e amolecimento de frutos climatéricos.....	26
2.7. Inibidores do etileno e técnicas de conservação de frutos.....	29
3. Material e métodos	31
3.1. Material vegetal.....	31
3.2. Avaliações de qualidade.....	31
3.2.1. Cor da epiderme.....	31
3.2.2. Firmeza da polpa.....	32
3.2.3. Acidez titulável (AT).....	32
3.2.4. Teste de iodo-amido.....	32
3.2.5. Sólidos solúveis (SS).....	32
3.2.6. Etileno.....	33
3.3. Atividade enzimática.....	33
3.3.1. Obtenção do extrato bruto enzimático.....	33
3.3.2. Quantificação de proteínas pelo método de Bradford.....	34
3.3.3. Atividade α -L-Arabinofuranosidase.....	34
3.4. Expressão do gene <i>MdAF3</i> por RT-qPCR.....	35
3.4.1. Extração de RNA total.....	35
3.4.2. Tratamento com DNase.....	36
3.4.3. Transcrição reversa.....	36
3.4.4. Análise de expressão por PCR quantitativa (Real-Time PCR).....	37
4. Resultados e Discussões	39
4.1. Qualidade dos frutos no dia da colheita.....	39

4.2. Qualidade dos frutos mantidos em temperatura ambiente.....	40
4.2.1. Etileno.....	40
4.2.2. Firmeza de polpa.....	41
4.3. Avaliação físico-química dos frutos mantidos sob refrigeração.....	42
4.4. Atividade enzimática.....	44
4.5. Expressão do gene <i>MdAF3</i> por RT-qPCR.....	46
4.5.1. Extração de RNA total.....	46
4.5.2. PCR em tempo real.....	48
5. Conclusão.....	52
6. Perspectivas futuras.....	53
7. Referências.....	54

1. Introdução geral

A 'Gala' é a principal cultivar de maçã em exploração no Brasil (ABPM, 2011), visto que foi rapidamente aceita na maior parte do mundo por apresentar frutos com boa coloração, aparência e polpa crocante e suculenta (DENARDI, CAMILO, 1992). Porém, sua comercialização é limitada pelo tempo de armazenamento, o qual não deve ser muito prolongado devido ao aparecimento de distúrbios fisiológicos como a farinosidade da polpa, que é observada a partir de três meses em armazenamento refrigerado (BRACKMANN, 1992).

Do ponto de vista do consumidor, a textura é o principal atributo de qualidade para a aceitação no mercado. Na maioria dos frutos de polpa carnosa, a qualidade da textura é, geralmente, mais importante do que as propriedades aromáticas e, enquanto consumidores em diferentes países podem ter diferentes preferências quanto aos atributos de qualidade, existe uma universal busca por frutos firmes, livres de desordens fisiológicas e podridões decorrentes do ataque de patógenos (GOULAO, OLIVEIRA 2008).

A textura farinhenta em maçãs pode ser definida como uma característica sensorial, descrita como macia e seca e, em geral, considerada como um atributo negativo (GÓMEZ, FIORENZA, IZQUIERDO, COSTELL, 1998).

A farinosidade em maçãs ocorre particularmente em frutas sobremaduras e está associada às mudanças fisiológicas relacionadas à liberação de suco na superfície de tecidos fraturados. Em frutas farinhentas, a adesão celular é baixa e células individuais dificilmente se rompem. Assim, durante a mastigação, o tecido quebra-se em pequenos blocos (aglomerados) de células não danificadas. As células de maçãs não farinhentas são mais frágeis e a adesão celular é maior, de modo que as mesmas são rompidas e o suco é liberado durante a mastigação (NARA, KATO, MOTOMURA, 2001). Deste modo, se a lamela média tem uma alta

quantidade de pectina insolúvel e um alto poder de adesão, quando uma força é aplicada ao tecido vegetal a parede celular é rompida ao invés da lamela média. O suco é, então, liberado da célula, produzindo a sensação de uma textura crocante e suculenta. Por outro lado, quando a lamela média é degradada por enzimas pécticas, observa-se uma alta fragilidade em relação às paredes celulares, causando a textura farinhenta (SONE, 1972; HAARD, SALUNKE, 1975). Assim, em polpa farinhenta, acredita-se que a adesão entre as células é afrouxada pela dissolução das substâncias pécticas da lamela média, seguida por separação celular (NARA, KATO, MOTOMURA, 2001).

Algumas tecnologias têm sido eficientes no sentido de retardar a formação de polpa farinhenta em maçã 'Gala'. Dentre elas, destacam-se as que reduzem a síntese ou ação do etileno (BRACKMANN et al. 2004; SAQUET, 1997; LUNARDI et al., 2004), como o uso de 1-metilciclopropeno (1-MCP), um gás que retarda o amadurecimento de frutos, principalmente climatéricos como a maçã e o tomate, por possuir a capacidade de ligar-se aos receptores do etileno, inibindo sua ação (BLANKENSHIP, DOLE, 2003; WATKINS, 2006).

Como citado, a farinosidade de polpa em maçãs parece estar relacionada com as mudanças que ocorrem na parede celular e lamela média (SONE, 1972; HAARD, SALUNKE, 1975) durante o amadurecimento e senescência, sendo a pectina, o polímero que mais é alterado durante esses estádios devido à degradação mediada por enzimas, as chamadas hidrolases de carboidratos (PRASANNA, PRABHA, THARANATHAN, 2007).

Sendo o amadurecimento de frutos climatéricos controlado pela biosíntese do etileno endógeno, uma boa parte das pesquisas no amolecimento dos frutos tem examinado a relação entre a produção e percepção do hormônio e o acúmulo de proteínas que modificam a parede celular (CWMPs - *cell wall modifying proteins*). Porém, ressalta-se que nem sempre genes específicos codificadores de CWMPs durante o amadurecimento são diretamente regulados pelo etileno (BENNETT, LABAVITCH, 2008).

Dentre as enzimas implicadas nas alterações de textura dos frutos, destacam-se as glicanases endo e exo-poligalacturonase (PG) e pectinametilsterase (PME), extensivamente estudadas por décadas. Nos últimos anos, no entanto, têm-se dado especial atenção às enzimas que catalisam a quebra das cadeias laterais da estrutura da pectina, principalmente β -galactosidases e

α -L-arabinofuranosidases, as quais liberam os açúcares galactose e arabinose, respectivamente.

Neste contexto, NARA, KATO, MOTOMURA (2001), observaram uma grande perda de arabinose da parede celular e lamela média de maçã 'Starking Delicious', variedade com alta tendência à farinosidade durante o armazenamento. Segundo os autores, essa perda pode estar relacionada com a ação da enzima α -L-arabinofuranosidase e com a formação de polpa farinhenta.

A arabinofuranosidase hidrolisa cadeias de polissacarídeos que contêm arabinose, como arabinogalactanas, arabinanas e arabinoxilanas (PRASANNA, PRABHA, THARANATHAN, 2007). A expressão gênica e atividade da enzima têm sido estudadas em frutos como pêra (TATEISHI et al., 1996; TATEISHI et al., 2005), morango (ROSLI, CIVELLO, MARTÍNEZ, 2009), maçã (GOULAO et al., 2007; WEI et al., 2010), tomate (SOZZI et al., 2002) e pêssego (SANTO, PAGANO, SOZZI, 2009), sendo relacionada com as mudanças de textura que acompanham a maturação desses frutos.

Sozzi et al. (2002), estudaram a atividade de três isoformas da α -L-arabinofuranosidase em tomate e verificaram que uma delas é positivamente dependente do etileno, enquanto, ainda em tomate, ITAI, ISHIHARA e BEWLEY (2003) caracterizaram um gene para arabinofuranosidase (*LeARF1*) que é regulado negativamente pelo etileno. Em maçã 'Golden Delicious', a atividade α -L-arabinofuranosidase, bem como o acúmulo de transcritos de um gene que codifica para esta enzima aumentaram com a exposição ao etefon (produto que em contato com a água libera o gás etileno), ocorrendo o contrário quando as frutas foram tratadas com 1-MCP, mostrando regulação positiva pelo etileno (WEI et al., 2010).

Recentes avanços na biologia molecular têm providenciado um melhor entendimento da bioquímica da maturação dos frutos, bem como fornecido meios para a manipulação genética do processo inteiro de maturação. Assim, técnicas moleculares são usadas para investigar o papel das hidrolases de parede celular, síntese do etileno, síntese de pigmentos, degradação do amido e amolecimento da fruta durante a maturação (PRASANNA, PRABHA, THARANATHAN, 2007).

Genes que codificam para α -L-arabinofuranosidases têm sido classificados dentro de duas famílias multigênicas: GH3 (glicosil hidrolases 3), como o gene caracterizado por Tateishi et al. (2005) em pêra, e GH51 (glicosil hidrolases 51) em

frutos como morango (ROSLI, CIVELLO, MARTÍNEZ, 2009), tomate (ITALI, ISHIHARA e BEWLEY, 2003) e pêssego (SANTO, PAGANO, SOZZI, 2009).

Recentemente, um grupo de pesquisa do INRA (Institut National de la Recherche Agronomique – França) sequenciou um gene que codifica para uma α -L-arabinofuranosidase (GenBank GU937612.1), pertencente à família das Glicosil Hidrolases 3 e denominado *MdAF3* (informação verbal)¹.

O conhecimento sobre o papel das enzimas nas modificações da parede celular dos frutos é obtido principalmente através de evidências correlativas onde uma função é proposta se um aumento na quantidade de mRNA e atividade protéica *in vivo* acompanha o curso do amadurecimento do fruto (GOULAO, OLIVEIRA, 2008). Assim, o estudo de expressão dos genes que codificam para essas enzimas é importante ferramenta para o entendimento dos mecanismos que levam às mudanças de textura. Esses estudos, no entanto, devem ser a nível transcricional, que é contexto-dependente, ou seja, os níveis de mRNA variam com a fisiologia, patologia ou desenvolvimento de um dado tecido (BUSTIN, NOLAN, 2004).

Neste sentido, a transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) é uma sensível técnica para a detecção de um mRNA alvo, e sua aplicação tem se tornado o método mais empregado para quantificar níveis de mRNA (BUSTIN, NOLAN, 2004).

A PCR em tempo real difere da PCR clássica por permitir a medida do produto amplificado em cada ciclo ao longo da reação (GACHON, MINGAM, CHARRIER, 2004). Essa técnica é altamente sensível e permite a quantificação de transcritos raros e pequenas alterações na expressão gênica. Além disso, é fácil de conduzir, fornece a precisão necessária e produz resultados rápidos e seguros (PFFAFL, 2001).

O presente trabalho tem como objetivo estudar, através da técnica da transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR), a expressão do gene *MdAF3* em amostras de polpa de maçã ‘Gala’ submetida a diferentes tratamentos (1-MCP e etileno) e tempos de armazenamento, bem como relacionar essa expressão à atividade α -L-arabinofuranosidase e às modificações, reguladas pelo etileno, nos parâmetros de qualidade dos frutos, principalmente firmeza de polpa.

¹ Informação fornecida por P. NOBILE em reunião na Embrapa Uva e Vinho, em Bento Gonçalves, em outubro de 2010.

2. Revisão da literatura

2.1 A maçã ‘Gala’

A macieira (*Malus domestica Borkh*) é uma planta da família das rosáceas, sub-família das pomáceas e produz como frutos a maçã. Os frutos são de clima temperado e apresentam maior importância comercial na forma *in natura*, tanto no contexto internacional como nacional (GIRARDI et al., 2004).

No Brasil, a macieira foi implantada no início da década de 60 como um projeto experimental na região de Fraiburgo (SC). As pesquisas para seleção das espécies, variedades e porta-enxertos visando a implantação da pomicultura no Brasil se estenderam até 1975, destacando as variedades ‘Gala’, ‘Fuji’ e ‘Golden’ como as mais bem adaptadas à região Sul do Brasil. Atualmente, a maçã é produzida em mais de 35 mil hectares distribuídos quase que totalmente nos três estados do Sul do país, representando uma produção de cerca de 1 milhão de toneladas da fruta (ABPM, 2011).

As duas variedades mais importantes cultivadas no Brasil são a ‘Gala’ (normalmente colhida em janeiro e fevereiro, representando, em 2009, 58% da produção total) e ‘Fuji’ (colhida durante março e abril, com 35% da produção total). Outras variedades como ‘Eva’, ‘Golden Delicious’ e ‘Braeburn’ são responsáveis pelos 7% restantes (WAPA, 2011).

A maçã ‘Gala’, principal cultivar produzida no Brasil, é originária da Nova Zelândia, sendo resultado do cruzamento entre as variedades Kidd’s Orange Red e Golden Delicious. Tem a preferência dos consumidores brasileiros e, devido a suas características de crocância, perfeito sabor e aroma e ótimo equilíbrio entre açúcar e acidez, é também apreciada no mundo inteiro (ABPM, 2011). Essa cultivar necessita de longos períodos de frio, por isso, no Brasil ela é cultivada somente nos estados do Sul (WAPA, 2011). Apresenta um tamanho médio (135g) e listras vermelhas sobre um fundo amarelo. Apesar de ser colhida em meados de janeiro até março, as novas tecnologias de conservação utilizadas permitem a disponibilidade da maçã ‘Gala’ aos consumidores até novembro (ABPM, 2011). Porém, quando em armazenamento refrigerado, o aparecimento de distúrbios como a farinosidade de polpa logo após três meses (BRACKMANN, 1992) limitam bastante essa disponibilidade, pois diminuem a qualidade da fruta.

Para que a qualidade das maçãs seja mantida por maior tempo durante o armazenamento, deve-se respeitar o ponto ideal de colheita, que é determinado pelas modificações bioquímicas e morfológicas que ocorrem durante o desenvolvimento dos frutos (EPAGRI, 2006).

O ponto ideal de colheita para maçãs está representado na fig. 1, que demonstra também a evolução das principais alterações que ocorrem durante o amadurecimento, como a diminuição da acidez e do amido. Além disso, estão indicados na fig.1, os principais problemas que podem ocorrer como resultado de uma colheita precoce ou tardia.

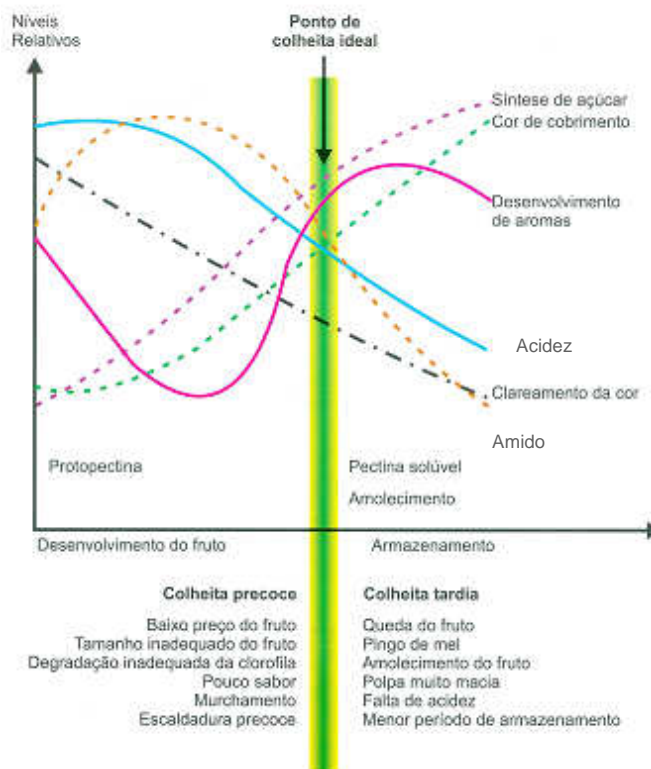


Figura 1 - Ponto ideal de colheita e alterações dos compostos responsáveis pela qualidade da maçã ao longo do desenvolvimento do fruto e armazenamento.
Fonte: Frutas do Brasil Maçã Pós-colheita, com modificações.

O ponto ideal de colheita para maçãs destinadas à armazenagem está associado ao estágio em que a taxa respiratória é mínima (pré-climatério) e ao início da síntese de etileno autocatalítico. Porém, as medidas destes parâmetros não apresentam praticidade para serem usadas pelos produtores. Por outro lado, em algumas variedades ou regiões, os parâmetros fisiológicos da maturação nem sempre se relacionam consistentemente com o período de colheita para máxima

qualidade em termos comerciais. Assim, o termo maturação comercial tem sido usado para indicar o estágio de desenvolvimento em que os frutos apresentam características de qualidade desejadas pelos consumidores antes e depois do armazenamento (EPAGRI, 2006).

2.2 Parede celular vegetal e alterações na textura dos frutos durante o amadurecimento

O amadurecimento do fruto envolve muitas mudanças metabólicas. Por exemplo, a biossíntese de clorofila pode cessar e os níveis de outros pigmentos aumentar, o grau de respiração também pode aumentar dramaticamente, enquanto os níveis de ácido são reduzidos e de açúcares elevados, e a polpa amolece (REID, 1997).

O amolecimento excessivo dos frutos é o principal fator responsável pelas limitações na vida de prateleira, transportabilidade e armazenamento, por aumentar a ocorrência de danos físicos durante a manipulação e por aumentar a suscetibilidade à pestes e doenças. Do ponto de vista do consumidor, a textura é o principal atributo de qualidade para a aceitação no mercado (GOULAO, OLIVEIRA, 2008). Além disso, o processo de amolecimento da fruta é comercialmente importante, pois dita o ponto de colheita a fim de evitar danos em uma subsequente manipulação, a qual pode resultar em falhas no desenvolvimento de cor, sabor e aroma (FISCHER, BENNETT, 1991).

O amolecimento é uma mudança nas propriedades mecânicas do tecido dos frutos, as quais são fortemente associadas com a parede celular (REID, 1997). Deste modo, o declínio na firmeza das frutas durante a maturação é resultado da desmontagem da parede celular (BRUMMEL, 2006), que é uma organela ativa e vital para o crescimento das células, metabolismo, transporte, adesão, forma, resistência e força (PRASANNA, PRABHA, THARANATHAN, 2007). Mudanças na estrutura da parede celular compreendem a ruptura da parede primária e estão associadas à dissolução da lamela média.

A lamela média é uma camada delgada de material que pode, em geral, ser vista na junção das paredes de células vizinhas. Sua composição difere do restante da parede por ser rica em pectina e conter proteínas diferentes, quando comparada à massa da parede (TAIZ, ZIEGER, 2006).

A parede celular apresenta uma camada de parede primária, que contém microfibrilas de celulose que estão de forma desordenada, e três camadas de parede secundária (S1, S2 e S3), onde as microfibrilas de celulose estão altamente ordenadas. A parede celular primária é formada durante o crescimento celular e apresenta, principalmente, celulose, hemicelulose e compostos pécnicos (TAIZ, ZIEGER, 2006), como mostra a fig. 2.

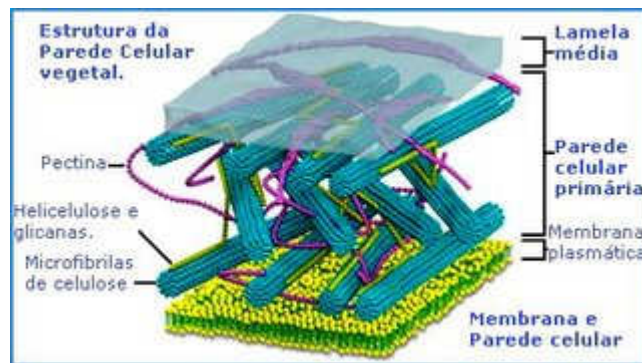


Figura 2 - Esquema de parede celular primária e lamela média de tecidos vegetais
 Fonte: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Morfofisiologiavegetal/morfovegetal14.php>

Estudos estruturais indicam dois distintos tipos de parede celular primária, os quais diferem na composição de sua matriz. Assim, foi denominada de “tipo 1”, a parede celular primária de dicotiledôneas, a qual é rica em pectina e hemicelulose, e de “tipo 2” a parede celular primária de gramíneas, que contém pequena quantidade de pectina e, proporcionalmente, mais polímeros classificados como hemicelulose (REID, 1997). A parede celular secundária é formada quando cessa o crescimento celular. Também é constituída por celulose e hemicelulose, mas geralmente não apresenta pectina. É dividida em três camadas devido a diferenças no arranjo das fibrilas de celulose nas mesmas. As paredes celulares secundárias podem se tornar altamente especializadas em estrutura e composição, refletindo o estado diferenciado da célula (TAIZ, ZIEGER, 2006).

Estruturalmente, a parede celular primária é composta por microfibrilas de celulose incorporadas numa variada matriz de pectina e hemicelulose (fig. 2). Este último polímero também é conhecido como matriz glicana, sendo composto predominantemente de açúcares neutros, sem apresentar ácido galacturônico, sendo mais abundante a xiloglucana. Já as pectinas são caracterizadas por um alto

conteúdo de ácido galacturônico, podendo ser lineares ou ramificadas (BRUMMEL, 2006).

Os polímeros estão distribuídos na parede celular primária nas seguintes proporções: cerca de 35% de pectina, 25% de celulose, 20% de hemicelulose e 10% de proteínas estruturais (PRASANNA, PRABHA, THARANATHAN, 2007). Porém, é importante ressaltar que esse conteúdo de carboidratos varia em diferentes tecidos. Assim, a parede celular da madeira é rica em celulose e hemicelulose, tendo uma quantidade muito pequena de pectina, enquanto a parede celular da polpa de frutos contém alta quantidade deste último carboidrato (REID, 1997).

Mudanças estruturais na pectina, hemicelulose e celulose são consideradas como responsáveis pela alteração da estrutura da parede celular durante a perda de firmeza associada com a maturação (GOULAO, OLIVEIRA, 2008).

Dentre os polissacarídeos da parede celular, as substâncias pécticas são os principais componentes químicos dos tecidos responsáveis pelas mudanças de textura de frutos e hortaliças (CHITARRA, CHITARRA, 1990). Assim, durante o amadurecimento, a progressiva perda de firmeza está relacionada com alterações da pectina da parede celular, como a gradual solubilização da protopectina para formar pectina e outros produtos. A solubilização, juntamente com a despolimerização e desesterificação dos polissacarídeos pécticos é a mais aparente mudança que ocorre durante o amadurecimento de muitos frutos, como pêra, maçã, tomate, melão, pimentão, morango, kiwi, damasco, pêssigo e azeitona. Pectinas de frutos maduros exibem um baixo grau de esterificação, baixo peso molecular médio e diminuição do conteúdo de açúcares neutros comparado às pectinas de frutos não maduros (PRASANNA, PRABHA, THARANATHAN, 2007).

2.3 Pectina

Pectinas ou poliuronídeos são polissacarídeos ricos em ácido galacturônico que ocorrem na lamela média e parede celular. De um modo geral, são constituídas por polímeros lineares de ligações α -(1→4) de ácido galacturônico (aproximadamente 65% da cadeia- domínio homogalacturonana) e resíduos de ramnogalacturonanas I e II (RGI e RGII), que consistem de unidades de ácido galacturônico alternadas com unidades específicas de ramnose. Nesta região ocorre perda da linearidade, devido a leves dobraduras da cadeia principal (fig. 3). Ainda,

os resíduos de ramnose carregam outros açúcares como D-galactose, D-arabinose, D-fucose, 2-O-metilfulcose, D-apiose e outros que variam em proporções dependendo da sua fonte. Os grupos carboxilas dos monômeros dos ácidos galacturônicos podem ou não estar esterificados com metanol ou ácido acético, onde a porcentagem dos grupos esterificados é expressa como grau de metoxilação ou acetilação, respectivamente (PAIVA, LIMA, PAIXÃO, 2009).

Inicialmente, acreditava-se que os componentes neutros da pectina eram polissacarídeos distintamente separados. Atualmente, sabe-se que, na parede celular, eles são ancorados às pectinas ácidas como grandes cadeias laterais. Assim, três principais estruturas são conhecidas: as arabinanas, as arabinogalactanas e as galacturonanas (REID, 1997).

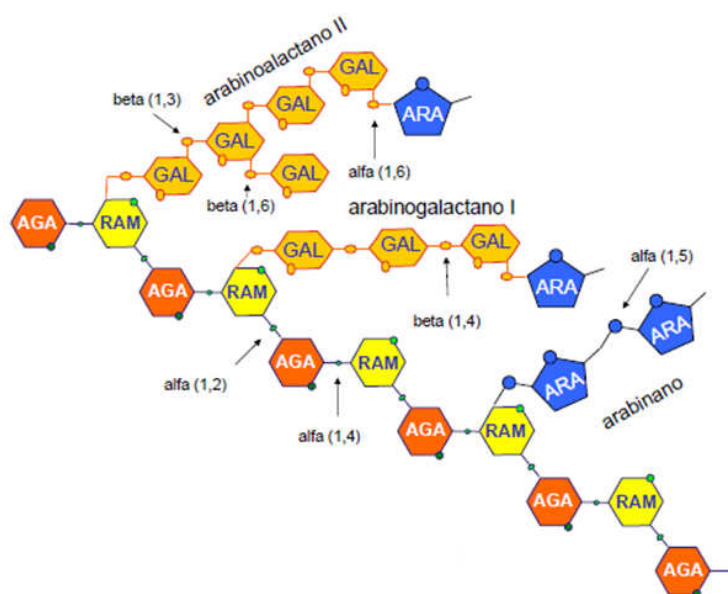


Figura 3 - Representação da estrutura ramnogalacturonana I, a região ramificada da pectina

Fonte: <http://felix.ib.usp.br/pessoal/marcos/fisio2008/PDF/PDF%20TEORICA/Parede%20celular.pdf>

Galacturonanas consistem em um diverso grupo de polissacarídeos pécnicos que contêm uma cadeia principal linear de resíduos ácido α -1-4-D-galacturônico, substituído com outros resíduos de açúcares. Arabinanas são polissacarídeos de cadeia ramificada compostos de resíduos α -1-5-L-arabinose com uma cadeia lateral L-arabinose ligada à posição O-3 ou O-2 da cadeia principal. Já as arabinogalactanas (AG) são heteropolímeros de D-galactose e resíduos L-arabinose. Duas formas estruturalmente diferentes do polímero são encontradas em plantas. AG-I é um polissacarídeo simples composto de cadeias de

β -(1 \rightarrow 4)D-galactose com único resíduo L-arabinose ligado em O-3 à galactose. Essa forma tem sido isolada de diferentes frutos, incluindo maçã, tomate e abacaxi. AG-II, por sua vez, é um polissacarídeo complexo e ramificado, consistindo de β -(1 \rightarrow 3)D-galactose ligada à β -(1 \rightarrow 6)D-galactose em O-6. As posições O-3 e O-6 das cadeias são ligadas ao terminal L-arabinose (PRASANNA, PRABHA, THARANATHAN, 2007).

Estruturalmente, as pectinas que participam da constituição da parede celular primária diferem das presentes na lamela média. Na primeira, as cadeias de ramnogalaturonana encontram-se altamente ramificadas, com longas cadeias de arabinose e galactose ou arabinogalactose. Na segunda, as ramnogalaturonanas apresentam-se ligeiramente ramificadas, com cadeias curtas dos açúcares citados, contudo, os ácidos galacturônicos da cadeia linear encontram-se altamente esterificados, apresentando complexos de ligações com cálcio (PAIVA, LIMA, PAIXÃO, 2009).

A parede celular de muitos tecidos de frutas, incluindo o tomate, é particularmente rica em pectina e, muitos trabalhos que associam o amadurecimento às mudanças da parede celular têm concentrado neste componente. No caso do tomate, evidências à luz da microscopia têm mostrado que a pectina da parede primária e da lamela média foi extensivamente degradada durante o amadurecimento (REID, 1997).

As pectinas em frutos encontram-se sob diferentes formas, caracterizadas por diferentes solubilidades. A protopectina é uma forma insolúvel em água e que, por hidrólise parcial, produz ácidos pectínicos (esterificados com grupos metílicos) ou ácidos pécticos (sem esterificação) também chamados de pectinas solúveis (CHITARRA, CHITARRA, 1990).

Durante o amadurecimento, a pectina sofre solubilização, despolimerização e desmetoxilação, e é susceptível à hidrólise química e/ou enzimática com subsequente produção de oligossacarídeos de diferentes tamanhos e composição (PAIVA, LIMA, PAIXÃO, 2009). Enquanto a solubilização é considerada uma característica universal das modificações da pectina, a despolimerização parece ocorrer adicionalmente em algumas espécies. Assim, algumas frutas, como a maçã, parecem amolecer sem extensiva despolimerização dos polissacarídeos da parede celular. Isso contrasta com o mecanismo relatado no tomate, que é o fruto climatérico modelo, onde mais significantes modificações das propriedades da

parede foram relatadas e incluem a despolimerização e a solubilização dos poliuronídeos, além da despolimerização das hemiceluloses, incluindo a xiloglucana (GOULAO, OLIVEIRA, 2008).

Juntamente com a solubilização das pectinas, a perda dos açúcares neutros das cadeias laterais parece ser um mecanismo comum que acompanha o amadurecimento em todas as espécies de frutos (GOULAO, OLIVEIRA, 2008). Realmente, a perda de açúcares neutros, especialmente galactose e arabinose é, quantitativamente, a maior mudança associada ao amadurecimento na composição da parede celular de muitos frutos (FISCHER, BENNETT, 1991).

Em cultivares de maçã, Peña e Carpita (2004) verificaram que a perda de galactana acompanhou o crescimento e maturação dos frutos, enquanto a perda de arabinana ocorreu após o amadurecimento e antecedeu a redução da firmeza de polpa.

Essa perda das cadeias laterais de arabinana e galactana da RG-I provoca um aumento no tamanho dos poros dentro da estrutura da parede celular, o que, associado com outras alterações, como o relaxamento das redes de celulose-xiloglucana, tornam a parede celular mais acessível às enzimas, resultando em sua desmontagem (BRUMMEL, 2006).

2.4 Hidrolases de carboidratos e sua influência nas alterações da pectina durante o amadurecimento

As mudanças no peso molecular de polímeros da parede celular que acompanham o amadurecimento da fruta são resultado da ação de enzimas capazes de degradar componentes específicos da parede celular, sendo a poligalacturonase (PG) uma das mais estudadas durante décadas (FISCHER, BENNETT, 1991). Neste sentido, Prasanna, Prabha e Tharanatham (2007), em seu trabalho de revisão sobre o amadurecimento dos frutos, relatam que um gene da PG foi o primeiro a ser clonado em tomate para estudo da regulação da textura na maturação dos frutos, sendo que a transformação com o gene PG antisense resultou em melhorias na firmeza da textura dos frutos e uma vida de prateleira mais longa.

Quatro classes de reações são catalisadas por enzimas de parede celular: hidrólise (de ligações éster, glicosídicas e peptídicas), transglicosilação, transacilação e redox. Entre as hidrolases, a maior parte atua em ligações

glicosídicas, destacando-se as O-glicosilhidrolases (EC 3.2.1.-), que frequentemente são denominadas de glicosidasas (FRY, 1995).

Muitas hidrolases da parede celular foram identificadas em tecidos de frutos, sendo que as mais importantes envolvidas na dissolução de polissacarídeos *in vivo* podem ser amplamente classificadas em dois grupos: glicanases e glicosidasas. Deste modo, glicanases, por definição, são enzimas que clivam polissacarídeos de alto peso molecular em cadeias curtas, enquanto as glicosidasas geralmente atuam em oligossacarídeos de cadeia curta (PRASANNA, PRABHA, THARANATHAN, 2007).

As hidrolases de carboidratos atuam nos polímeros da parede celular resultando em sua degradação. Muitas delas estão presentes em baixos níveis e são constitutivas no desenvolvimento completo, mas durante a maturação, geralmente aumentam em atividade com pico no estágio climatérico (PRASANNA, PRABHA, THARANATHAN, 2007).

Usualmente, as enzimas que modificam a parede celular são também classificadas em pectolíticas e não-pectolíticas, de acordo com a classe específica de polissacarídeos usados como substrato. Entre as pectolíticas estão as endo e exo-poligalacturonases, pectato liases, pectinametilesterases, pectinaacetilesterases, β -galactosidasas e α -L-arabinofuranosidasas. Elas são capazes de clivar ou modificar a natureza das cadeias principais dos polissacarídeos pecticos ou remover açúcares neutros das cadeias laterais ramificadas. Enzimas não pectolíticas são responsáveis pelas modificações na hemicelulose e incluem endo-1,4- β -glicanases (EGase), endo-1,4- β -xilanases, β -xilanases, xiloglicana endotransglicosilase/hidrolases (GOULAO, OLIVEIRA, 2008).

As poligalacturonases (PGs) são enzimas que catalisam a clivagem hidrolítica de ligações α -1,4-galacturonanas (FISCHER, BENNETT, 1991). Baseado em seu modo de ação, as PGs são classificadas em exo-poligalacturonase (EC 3.2.1.67) e endo-poligalacturonase (EC 3.2.1.15). A endo-PG despolimeriza o ácido pectico aleatoriamente, resultando em rápida diminuição na viscosidade e, portanto, um envolvimento no processo de maturação (PRASANNA, PRABHA, THARANATHAN, 2007). Já a exo-PG, que libera ácido galacturônico do terminal não redutor do homogalacturonano (FRY, 1995), causa um grande aumento na formação de grupos redutores e um lento decréscimo da viscosidade já que, considerando a longa cadeia poligalacturonana, a mera remoção do resíduo ácido galacturônico

terminal não resulta em muito efeito na solubilização da pectina. Assim, a endo enzima causa cerca de 50% de redução na viscosidade quando somente 3-5% das ligações glicosídicas são clivadas, enquanto a forma exo causa similar redução na viscosidade com 10-15% das ligações glicosídicas clivadas. Outra diferença entre essas enzimas é a natureza dos produtos formados no início da reação, sendo que, ao contrário da forma exo, a endo enzima não deve gerar produtos de baixo peso molecular (PRASANNA, PRABHA, THARANATHAN, 2007).

Ainda, a PG é mais ativa na degradação da pectina desmetilada do que na metilada. Assim, mostra-se importante outra hidrolase, a pectinametilsterase (PME - EC 3.1.1.11), a qual catalisa a desmetilação do grupo carboxila das cadeias de ácido galacturônico. A PME determina o quanto a pectina é acessível à degradação por PG. Deste modo, foi sugerido que o aumento da suscetibilidade da parede celular de tomate à poligalacturonase durante o amadurecimento, deve-se à ação da PME (FISCHER, BENNETT, 1991). A atividade PME foi detectada em frutas como a maçã, banana, cereja, citros, uva, papaia, pêssego, pêra, tomate e morango (PRASANNA, PRABHA, THARANATHAN, 2007).

Embora muita atenção tenha sido dada à relação entre PG e amolecimento dos frutos, existem outras enzimas que também são importantes nesse processo. É importante ressaltar que enzimas individuais não são suficientes para produzir um efeito no amolecimento de frutos, sendo evidente que a possível ação concomitante de diversas isoformas e eventos pós-transcricionais reguladores podem estar envolvidos (GOULAO, SANTOS, SOUSA, OLIVEIRA, 2007).

Neste sentido, um mutante de tomate ("rin" – ripening inhibitor) contendo pouca ou nenhuma atividade PG mostrou uma substancial perda de galactose da parede celular, sugerindo que outras hidrolases, especialmente glicosidases, desenvolvem um importante papel no amolecimento da textura durante a maturação (PRASANNA, PRABHA, THARANATHAN, 2007).

Assim, nos últimos anos, enzimas como a β -galactosidase e α -L-arabinofuranosidase, as quais atuam nas cadeias laterais da pectina têm sido estudadas e relacionadas com o amolecimento dos frutos.

2.5 α -L-Arabinofuranosidase

As α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) são enzimas acessórias que clivam as ligações α -L-arabinofuranosídicas e atuam sinergicamente com outras hemicelulases e enzimas pécticas para a hidrólise completa de hemiceluloses e pectinas (NUMAN, BHOSLE, 2006).

A arabinofuranosidase degrada a arabinana ramificada por separação do terminal α -1,3 ligado das cadeias laterais arabinofuranosil e sequencialmente quebra as ligações α -1,5 da ponta não redutora da arabinana linear. Ela atua em polímeros que contêm arabinose como arabinogalactanas, arabinanas e arabinoxilanas (PRASANNA, PRABHA, THARANATHAN, 2007).

A importância das α -L-arabinofuranosidases na pectina deve-se ao fato de que a presença dos substituintes L-arabinosídeos previnem a completa degradação do polímero (NUMAN, BHOSLE, 2006). Em pêsegos, uma grande perda de arabinose da parede celular foi reportada durante o amadurecimento, juntamente com a solubilização de poliuronídeos e substancial despolimerização da matriz glicana (BRUMMELL et al., 2004).

Em maçã, a redução no conteúdo de arabinose da lamela média e parede celular primária foi relacionada com a farinosidade em 'Starking Delicious', uma cultivar com alta tendência à formação do distúrbio (NARA, KATO, MOTOMURA, 2001).

Em relação ao controle hormonal, em tomate com inibida produção de etileno, três isoformas da enzima α -L-arabinofuranosidase foram caracterizadas, sendo que apenas uma delas apresentou atividade positivamente regulada pelo etileno, liberando resíduos arabinosil da fração péctica quando do tratamento com etileno exógeno. Ainda, duas delas mostraram atividade influenciada por aplicação de ácido giberélico e auxina sintética. Esses resultados sugerem que, em tomate, as α -L-arabinofuranosidases são codificadas por uma família gênica com variado controle hormonal (SOZZI et al., 2002).

Os genes que codificam α -L-arabinofuranosidases foram agrupados na família das glicosil hidrolases 51 (GH51) e glicosil hidrolases 3 (GH3). Tateishi et al. (2005) caracterizaram, em pêra japonesa, um gene pertencente à família 3, bem como estudaram a atividade da enzima purificada. Os autores verificaram que a enzima mostrou atividade bifuncional α -L-arabinofuranosidase/ β -xilosidase contra os

substratos artificiais *p*-nitrofenil α -L-arabinofuranosídeo e *p*-nitrofenil β -D-xilopiranosídeo. Porém, contra substratos naturais, ou seja, polissacarídeos de parede celular de pêra, observou-se apenas a liberação de arabinose, indicando ausência de atividade xilosidase.

Um gene α -L-arabinofuranosidase de maçã, o qual pertence à família GH3 e apresenta alta similaridade com o caracterizado por Tateishi et al. (2005) em pêra, foi recentemente sequenciado. O gene foi denominado de *MdAF3* (GenBank GU937612.1) (informação verbal)².

2.6 Etileno e amolecimento de frutos climatéricos

O etileno (C₂H₄) é um fitohormônio atuante em fases diversificadas, como crescimento, desenvolvimento e senescência, mas principalmente no amadurecimento de frutos climatéricos. Esse hormônio tem como precursor primário o aminoácido metionina, como intermediário o SAM (S-adenosilmetionina) e como precursor imediato o ACC (ácido aminociclopropano carboxílico) (KLUGE et al., 2002).

O etileno é produzido por todas as partes da planta em concentrações que variam com o tecido e estágio de desenvolvimento. No entanto, tais concentrações podem ser aumentadas durante o processo de senescência e de abscisão de flores, folhas e frutos, ou por ferimentos, independente do estágio fisiológico da planta. O fitohormônio é sintetizado no vacúolo e o seu transporte pode ocorrer por difusão gasosa via espaços intercelulares dos tecidos ou através do floema e do xilema (EPAGRI, 2006).

Há muito tempo é conhecido o envolvimento do etileno no amadurecimento de frutos, sendo reconhecido por muitos pesquisadores como “hormônio do amadurecimento” (CHITARRA, CHITARRA, 1990). De fato, a exposição dos frutos ao etileno acelera os processos relacionados ao amadurecimento, sendo que o início desta fase é acompanhada por um drástico aumento na produção do hormônio (TAIZ, ZIEGER, 2006). A generalização, no entanto, não pode ser aplicada a todos

² Informação fornecida por P. NOBILE em reunião na Embrapa Uva e Vinho, em Bento Gonçalves, em outubro de 2010.

os frutos já que existem exceções, como a uva, que apresenta produção de etileno muito baixa no início do amadurecimento (CHITARRA, CHITARRA, 1990).

Assim, são chamados de climatéricos todos os frutos que amadurecem em resposta ao etileno, os quais exibem, antes da fase de amadurecimento, um aumento característico da respiração, chamado de climatério. Tais frutos também apresentam um pico na produção de etileno um pouco antes do aumento da respiração. Visto que o tratamento com o fitohormônio induz o fruto a produzir etileno adicional, essa reação pode ser descrita como autocatalítica. Maçãs, bananas, abacates e tomates são exemplos de frutos climatéricos. Por outro lado, frutos que não exibem aumento na respiração e produção de etileno, como os cítricos e as uvas, são chamados de não-climatéricos (TAIZ, ZIEGER, 2006).

A aplicação de etileno em frutos não-climatéricos, em qualquer fase da maturação, resulta num aumento da atividade respiratória, proporcional à concentração aplicada, e durável até cessar a exposição ao hormônio. O efeito pode ser repetido com novas aplicações. Nos frutos climatéricos, a produção de etileno é reduzida na fase pré-climatérica, elevando-se até um máximo para, enfim, declinar. Normalmente, a aplicação exógena de etileno nestes frutos antecipa uma única vez o pico climatérico quando aplicado na fase pré-climatérica. Em fases posteriores, a aplicação de etileno produz pouco efeito (KLUGE, et al., 2002), ou seja, esses frutos tornam-se insensíveis após o estabelecimento do pico climatérico (CHITARRA, CHITARRA, 1990).

A concentração endógena de etileno em frutos varia conforme a espécie e cultivar. Assim, em maçãs, foram verificadas diferentes taxas de produção de etileno de acordo com a cultivar, sendo que 'Gala' e 'Golden Delicious' apresentam produção de etileno significativamente maior do que 'Fuji' e 'Granny Smith' (KLUGE et al., 2002).

Como mencionado, o amolecimento da textura dos frutos acompanha o amadurecimento, e deve-se às alterações dos polímeros da parede celular, as quais são catalisadas por enzimas, as também conhecidas pela sigla CWMPs (do inglês, *cell wall modifying proteins* – proteínas modificadoras da parede celular).

Considerando o amadurecimento de frutos climatéricos como um evento controlado pela biosíntese do etileno endógeno, uma considerável parcela das pesquisas no amolecimento dos frutos tem examinado a relação entre a produção e percepção de etileno e o acúmulo de CWMPs. Porém, nem sempre genes

específicos codificadores de CWMPs durante o amadurecimento são diretamente regulados pelo etileno. Deste modo, uma série de critérios tem sido rotineiramente usados para avaliar se um gene é regulado por etileno a nível de abundância de mRNA, incluindo a indução de abundância de transcritos por aplicação de etileno exógeno, redução da quantidade de transcritos pela exposição ao 1-MCP, ou a construção de frutos transformados com suprimida biosíntese ou percepção do etileno (BENNETT, LABAVITCH, 2008).

Em tomate, um estudo comparando a evolução da produção de etileno e a síntese de PG, indica que o hormônio é responsável por ativar, indiretamente, a produção da enzima (GRIERSON, TUCKER, 1983). Ainda, a influência da PG sobre a textura do mutante “*rin*” foi avaliada por Giovannoni, et al. (1989). Os autores verificaram que houve solubilização dos poliuronídeos, a qual foi remetida à ação PG, porém não foi detectado amolecimento do fruto.

Em abacate, uma relação próxima foi proposta entre o pico respiratório e de produção do etileno e atividade PG (AWAD, YOUNG, 1979).

Em maçã, a atividade e expressão das enzimas PG, PME, β -Gal e α -L-arabinofuranosidase foram reduzidas por 1-MCP e armazenamento a 0°C e realçadas pela aplicação de etileno exógeno nas cultivares ‘Fuji’ e ‘Golden Delicious’, as quais apresentam diferentes padrões respiratórios, bem como de produção de etileno. A firmeza também foi influenciada pelo etileno, principalmente na segunda cultivar, a qual mostrou redução da firmeza com a aplicação do fitohormônio e, por outro lado, manteve-se mais firme com o frio e o tratamento com 1-MCP. Obviamente, a influência dos tratamentos foi mais intensa em ‘Golden Delicious’ do que em ‘Fuji’ (WEI et al., 2010).

Em relação à α -L-arabinofuranosidase, estudos em tomate relataram um gene negativamente regulado por etileno (Itai, Ishihara, Bewley, 2003), enquanto Sozzi et al. (2002) caracterizaram uma isoforma com atividade positivamente regulada pelo hormônio.

Esses resultados mostram que, apesar do etileno influenciar nos processos de amolecimento de frutos, principalmente climatéricos, nem todos os eventos envolvidos são etileno-dependentes, especialmente no que diz respeito à expressão e atividade das hidrolases da parede celular.

2.7 Inibidores do etileno e técnicas de conservação de frutos

A maturação de frutos climatéricos, como a maçã, promove o desenvolvimento de desejáveis sabor e aparência. Entretanto, mudanças físicas e fisiológicas que ocorrem a partir da maturação resultam em deterioração dos frutos (EPAGRI, 2006). Muitas dessas mudanças, como já citado, são dependentes da ação do etileno.

Assim, tecnologias que inibem ou reduzem a síntese ou ação do etileno têm sido eficientes em elevar a vida útil de muitos frutos climatéricos.

Em maçã, o armazenamento refrigerado (AR) é uma técnica muito empregada na conservação, e é baseado no conceito de que temperaturas baixas retardam as alterações típicas do amadurecimento, bem como a síntese de etileno e o desenvolvimento de microrganismos (GIRARDI et al., 2004). Ainda, outras técnicas têm sido eficientes na manutenção da qualidade dos frutos no período pós-colheita. Destaca-se, assim, o uso de atmosfera controlada (AC) associada a baixas temperaturas como a tecnologia que mais prolonga a vida útil dos frutos, tendo sido observada a manutenção de maçã 'Golden Delicious' por até 8,5 meses, sendo a firmeza um dos parâmetros que mais foi mantido ao longo desse período (BRACKMANN, MAZARO, LUNARDI, 1998). O uso de AC baseia-se no princípio da modificação da concentração de gases na atmosfera natural, sendo a concentração de CO₂ aumentada e a de O₂ reduzida (GIRARDI et al., 2004). A AC, juntamente com o uso de filtros que diminuem os níveis de etileno dentro da câmara, resultaram em manutenção da firmeza de polpa em maçã 'Gala' por 8 meses (BRACKMANN, CERETTA, 1999).

Nos últimos anos, uma técnica que vem ganhando espaço na conservação de frutos é o uso do 1-MCP, que é um gás de peso molecular 54 e fórmula C₄H₆, o qual possui a propriedade de interagir com os receptores do etileno de tal forma que inibe a ligação do hormônio a tais receptores, bloqueando a sua ação. Além disso, a afinidade do 1-MCP a esses receptores é aproximadamente 10 vezes maior do que a do etileno, e o inibidor é ativo em concentrações muito mais baixas do que o hormônio. Também é relatado que o 1-MCP inibe a biosíntese do etileno em algumas espécies (BLANKENSHIP, DOLE, 2003).

O 1-MCP também tem grande importância para a ciência, pois é poderosa ferramenta para um melhor entendimento dos eventos envolvidos com a maturação e senescência dos frutos (WATKINS, 2006).

A literatura cita que cultivares de maçã submetidas a concentrações de 0,6-2 μ L de 1-MCP por 7 a 20 horas apresentaram manutenção da firmeza e acidez titulável, inibição do etileno, além de redução no aparecimento de escaldadura, na produção de voláteis, na perda de clorofila e amido e diminuição do grau de respiração (BLANKENSHIP, DOLE, 2003).

Outra tecnologia que visa manter a qualidade dos frutos na pós-colheita é o uso, na pré-colheita, de aminoetoxivinilglicina (AVG), composto que inibe a síntese de etileno por bloquear irreversivelmente a enzima ACC sintase (HUALI et al., 2001). Em maçãs 'Gala', o uso de AVG propiciou frutos mais firmes após 8 meses de armazenamento refrigerado, além de influenciar em outras características como respiração, acidez e cor da epiderme (BRACKMANN et al., 2009).

3. Material e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de Pós-colheita da Embrapa Uva e Vinho, em Bento Gonçalves/RS.

3.1 Material vegetal

Foram utilizadas maçãs (*Malus domestica Borkh*) do clone Baigent (cv. Gala) colhidas em pomares comerciais no município de Caxias do Sul na safra 2009. Os frutos foram transportados até a sede da Embrapa Uva e Vinho, onde receberam tratamentos com 10 ppm de etileno e 625 ppb de 1-MCP (Agro Fresh - 0,14%). Frutos controle não foram tratados. Uma parcela dos frutos tratados e não tratados foram mantidos em temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) durante 12 dias, sendo os frutos avaliados a cada 3 dias. Outra parte dos frutos colhidos (tratados e não tratados) foram armazenados por 6 meses em câmara fria a 0°C e $\pm 95\%$ de umidade relativa, sendo avaliados a cada 2 meses de manutenção sob refrigeração. A avaliação da qualidade dos frutos foi realizada a partir da instalação do experimento e após o período estabelecido de conservação (7 dias de manutenção em temperatura ambiente). Em todos os períodos analisados foram estocadas amostras de polpa para realização das análises de expressão gênica e atividade enzimática, sendo essas amostras imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em freezer a -80°C , até o momento das avaliações.

3.2 Avaliações de qualidade

As seguintes análises foram realizadas: cor da epiderme, firmeza de polpa, acidez titulável, iodo-amido (somente na colheita), sólidos solúveis totais e etileno.

3.2.1 Cor da epiderme

Para a determinação da cor da epiderme foi utilizado um colorímetro marca Minolta Chroma Meter CM-508d. As leituras foram realizadas em áreas vermelhas do fruto, pelo fato de que os clones avaliados não apresentavam cor de fundo visível. Os valores obtidos correspondem aos valores de L^*a^*b da escala tridimensional do sistema CIELAB em que " L^* " representa a luminosidade, medida em uma escala que vai de 0 a 100 onde 0 é ausência de luminosidade (preto) e

100, luminosidade total (branco); “a*” indica a progressão de cores do verde ao vermelho, medida em uma escala que vai de valores –a (cor verde) até +a (cor vermelha) e finalmente “b*” que indica a progressão de cores do azul ao amarelo, medida em uma escala que vai de valores –b (cor azul) até +b (cor amarela).

3.2.2 Firmeza de polpa

A firmeza da polpa foi medida em dois lados opostos da região equatorial do fruto, onde a epiderme foi retirada. A medição foi feita, com um penetrômetro manual, com ponteira de 11 mm de diâmetro, sendo os valores expressos em Newton (N).

3.2.3 Acidez titulável (AT)

A determinação deste parâmetro foi feita em uma amostra de 10 mL do suco de cada repetição diluídos em 90 mL de água destilada, e titulados empregando uma bureta digital com solução de hidróxido de sódio 0,1mol/L até pH 8,1 determinado com pHmetro digital. Os valores expressaram-se em cmolL⁻¹.

3.2.4 Teste de iodo-amido

O índice de iodo-amido foi realizado somente no início do experimento para determinar o estado de maturação dos frutos. Para a análise, os frutos foram cortados na zona equatorial e a metade peduncular foi imersa em solução de iodo (12 g de iodo metálico e 24 g de iodeto de potássio) por 40 segundos. Quando retirados da imersão, a presença de amido foi avaliada comparando-a com os valores da tabela elaborada por Werner (1989), onde o índice 1 representa teor máximo de amido e o índice 5 ausência do mesmo.

3.2.5 Sólidos solúveis (SS)

Para a medida dos sólidos solúveis, foi utilizado refratômetro Atago modelo PR 101 (0 a 45%) com correção para temperatura, sendo os valores expressos em Brix.

3.2.6 Etileno

A determinação de etileno foi feita por cromatografia em fase gasosa, utilizando um cromatógrafo a gás, marca CG, modelo 3537-5 equipado com uma coluna de aço inox preparado com Porapak® Q 5, e um detector de ionização de chama. As temperaturas do vaporizador, coluna e do detector foram de 140°C, 70°C e 142°C, respectivamente. Uma solução de etileno a 10ppm foi utilizada como padrão.

Para a determinação da produção de etileno, frutos numa quantidade equivalente a aproximadamente 1Kg, foram condicionados em frascos hermeticamente fechados durante 1 hora a 25°C. Passado esse período coletou-se, com auxílio de seringas hipodérmicas, 1mL da atmosfera gasosa. A quantificação foi feita correlacionando-se a média das alturas dos picos relativos a cada amostra com a média das alturas dos picos obtidos da solução padrão de etileno.

3.3 Atividade enzimática

A técnica de atividade enzimática foi dividida em três etapas principais, a saber, obtenção de um extrato enzimático bruto, quantificação de proteínas e dosagem da atividade α -L- arabinofuranosidase.

3.3.1 Obtenção do extrato bruto enzimático

A extração de enzimas foi realizada de acordo com Wei, et al. (2010), com modificações. Desse modo, 3g de amostra pulverizada de polpa de maçã distribuídos em 6 microtubos de 2mL (0,5g em cada tubo) foram acrescentadas de 1mL de solução de homogeneização (12% de polietilenoglicol e 0,2% de bissulfito de sódio). Após agitação, as amostras foram centrifugadas a 13000rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 1mL por tubo de solução de bissulfito de sódio 0,2%. Seguiu-se centrifugação a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o pellet adicionado de 1mL de tampão de extração (0,1mol/L acetato de sódio pH 5,2; 0,1mol/L NaCl e 5% m/v de PVP) em cada tubo. Após agitação os tubos foram mantidos *overnight* a 4°C para ocorrer a extração. No dia seguinte, o sobrenadante contido em todos os microtubos

foi recolhido em um tubo falcon de 20mL, consistindo, assim no extrato bruto enzimático.

3.3.2 Quantificação de proteínas pelo método de Bradford

As proteínas contidas no extrato bruto foram quantificadas segundo Bradford (1976).

A mistura contendo reagente de Bradford e extrato bruto enzimático numa proporção de 24:1 foi agitada e mantida em repouso por aproximadamente 10 minutos. Em seguida, procedeu-se leitura da absorbância a 595nm em espectrofotômetro de UV.

A quantidade de proteína foi calculada através de fórmula gerada por curva padrão de BSA (soroalbumina bovina) e expressa em mg de proteína por mL de solução.

3.3.3 Atividade α -L-arabinofuranosidase

A dosagem da atividade enzimática foi realizada de acordo com Brummell et al. (2004), através da quantificação por espectrofotometria de UV do *p*-nitrofenol, produto da reação entre a enzima α -L-arabinofuranosidase e o substrato artificial *p*-nitrofenil α -L-arabinofuranosídeo.

Para tal, 40 μ L de extrato bruto foram adicionados a um microtubo de 1,5mL contendo 400 μ L de acetato de sódio 0,1mol/L pH 5,0 e 80 μ L do substrato (16 μ L de *p*-nitrofenil α -L-arabinofuranosídeo 50mg/mL e 64 μ L de água). Um branco foi preparado da mesma forma, porém com um extrato bruto previamente ebulido a fim de inativar as enzimas. A mistura reacional foi incubada a 30°C. Após 90 minutos de reação, uma alíquota de 250 μ L da mistura de reação foi adicionada a 250 μ L de NH₄OH para cessar a reação.

Por fim, procedeu-se à leitura do *p*-nitrofenol liberado, em espectrofotômetro de UV num comprimento de onda de 400nm. Os resultados foram expressos em mmol/L de *p*-nitrofenol liberado/h/mg de proteína.

Tanto extração quanto dosagem da atividade foram feitas em triplicata.

3.4 Expressão do gene *MdAF3* por RT-qPCR

Para a análise de expressão gênica pela transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR), foram necessárias as seguintes etapas: extração de RNA, tratamento com DNase, transcrição reversa, escolha de um gene como controle endógeno e PCR em tempo real.

3.4.1 Extração de RNA total

O protocolo de extração de RNA foi adaptado de Zeng e Yang (2002). Assim, as amostras de polpa congelada foram pulverizadas com o uso de um moinho de bolas, em presença de nitrogênio líquido. Deste pó, aproximadamente 1,4g foram distribuídos em 14 microtubos tipo Eppendorf® de 2,0mL contendo 750µL de tampão de extração (2% de CTAB; 2% de PVP; 300mmol/L de Tris-HCl 1mol/L pH 8,0; 25mmol/L de EDTA 0,5mol/L; 2mol/L de NaCl ; 2% de β-mercaptoetanol e água tratada com DEPC para completar o volume desejado) em cada tubo. Após agitação em vórtex, os tubos foram mantidos em banho a 65°C por 10 minutos e, em seguida, adicionados de 750µL de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1. Os tubos foram centrifugados a 8000 rpm por 15 minutos a 4°C em microcentrífuga Hettich Zentrifugen Mikro 200R e os sobrenadantes transferidos para novos tubos Eppendorf® de 2,0mL, sendo adicionado clorofórmio:álcool isoamílico nas mesmas quantidades do sobrenadante. Fez-se nova centrifugação nas mesmas condições da anterior. Novamente, os sobrenadantes foram recolhidos em novos tubos, desta vez de 1,5mL, e submetidos à centrifugação a 15000 rpm por 20 minutos a 4°C. Logo após, os sobrenadantes foram separados de eventuais sujidades que possam ter sido depositadas no fundo do tubo e acrescentados de 0,6 volumes de isopropanol gelado e 0,1 volumes de acetato de sódio 3mol/L pH 5,5. Os tubos foram mantidos a -80°C por 25 minutos e, logo após, centrifugados a 15000 rpm por 20 minutos a 4°C. Após, todo o líquido foi descartado e os pellets suspensos em 70µL de água livre de nucleases. Juntou-se todo o material num único tubo e adicionou-se 0,25 volumes de LiCl 10mol/L frio para precipitação *overnight* sob refrigeração. No dia seguinte, procedeu-se centrifugação a 15000 rpm por 60 minutos a 4°C. Após, todo o líquido foi descartado e o pellet lavado com 500µL de etanol 75% por 3 vezes. O etanol foi descartado e o pellet deixado secar por aproximadamente 20 minutos a temperatura

ambiente. Por fim, o pellet foi ressuspenso em água livre de nucleases numa quantidade de 30 - 45 μ L, dependendo do tamanho do mesmo. Ainda, antes de serem estocados em ultrafreezer a -80 $^{\circ}$ C, foi adicionado nos RNAs 1 μ L de RNase *out* a fim de evitar a degradação por RNases. É importante ressaltar que todos os tubos e ponteiras utilizados na extração foram previamente esterilizados.

A quantificação foi feita em GeneQuant (Amersham Biosciences) obtendo-se também os valores para as relações de densidade ótica (OD), sendo utilizados para os passos seguintes apenas RNAs com mais de 500ng/ μ L e OD entre 1,8 e 2,2 tanto para 260/280 nm quanto para 260/230nm.

A integridade dos RNAs foi comprovada através de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com 1,3 μ L de Gel Red (aplicado diretamente no gel), onde as bandas de RNA ribossomal que não apresentavam arraste indicavam RNAs livres de degradação.

3.4.2 Tratamento com DNase

Em microtubos de 0,2ml adicionou-se ao volume referente a 2 μ g de RNA 0,3 μ L da enzima DNaseI (0,3 unidades) (New England BioLabs), 0,5 μ L de RNase *Out* (20 unidades) (Invitrogen), 1 μ L de tampão 10x da DNase (New England BioLabs) e água tratada com DEPC para completar o volume de 10 μ L. Os tubos foram incubados a 37 $^{\circ}$ C por 15 minutos, sendo, em seguida adicionado 1,1 μ L de EDTA 50mmol/L para proteger o RNA da degradação na etapa seguinte a 75 $^{\circ}$ C.

Por fim, a atividade DNase foi cessada com o aquecimento dos tubos a 75 $^{\circ}$ C por 10 minutos.

3.4.3 Transcrição reversa

Para a síntese da primeira fita do DNA complementar (cDNA), os RNAs tratados com DNase foram acrescentados de 1 μ L (0,5 μ g) de primer oligo (dT)₁₈ (Invitrogen), segundo indicação do fabricante da enzima transcriptase reversa (PROMEGA), e aquecidos a 70 $^{\circ}$ C durante 5 minutos. Após, os tubos foram transferidos imediatamente a um banho de gelo onde foram mantidos por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 5 μ L de tampão de reação 5x da M-MLV Reverse Transcriptase, 1,25 μ L de cada uma das bases nitrogenadas (dATP, dCTP, dGTP,

dTTP) na concentração de 10mmol/L, 1,5µL (300 unidades) da enzima M-MLV RT e água para completar o volume de 25µL. A mistura foi então aquecida a 42°C por 60 minutos e a 70°C por 15 minutos.

A eficiência do tratamento com DNase e da síntese de cDNA foi comprovada por PCR dos cDNAs com o par de primers GAPDH-F: 5' ATCAATGAAGGACTGGAGAGG 3' e R: 5' GTCAGGTCAACAACGGAAAC 3'. A reação de PCR foi realizada num volume final de 25 µL contendo 0,8 µL de cDNA, tampão da enzima 10X (Cenbiot), 1U da Taq DNA Polimerase (Cenbiot), 2,5mmol/L de MgCl₂, 24µmol/L de dNTPs, 0,16 µmol/L de cada primer. Os tubos das reações foram submetidos às seguintes condições de amplificação num termociclador MyCycler da BioRad: etapa inicial de desnaturação a 95°C/3min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 45s, 60°C por 50s, 72°C durante 30s, com uma etapa de extensão final de 72°C por 10min. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 1%, corados com Gel Red. Assim, o aparecimento no gel de banda no tamanho de 165pb indica que os cDNAs foram sintetizados com sucesso e que os mesmos não estão contaminados com DNA genômico. Tal contaminação seria indicada pelo aparecimento de uma banda com aproximadamente 300pb, devido à presença de um íntron nessa sequência.

3.4.4 PCR quantitativa (*Real-Time* PCR)

Primeiramente foi realizado um teste de eficiência dos primers a serem utilizados nas análises de expressão. Os primers testados foram: Mdaf3_1F Forward (5'- 3') ATTCACAAGGTCCATATCG e Mdaf3_1R Reverse (5'- 3')

CAGGTCACCAATTTCCAG e EF1β (par de primers obtido a partir de um trabalho ainda não publicado). Para este teste foram feitas 5 diluições (de 1:15, 1:75, 1:375, 1:1875, 1:9375) de uma mistura de cDNAs. De cada uma dessas diluições foi utilizado 9,6µL e adicionado 10,4µL de um mix contendo SYBR®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e o par de primers a ser testado na concentração de 0,2 µmol/L (concentração final na solução), totalizando uma reação de 20µL. Segundo o manual de Treinamento fornecido pela Applied Biosystems os primers precisam apresentar valores de eficiência entre 90 e 110% para serem considerados “bons”.

Com base no teste de eficiência dos primers procedeu-se a montagem da placa para a análise de expressão. Para a montagem da placa foram utilizados 7,2 μ L das amostras de cDNA (diluídas 1:100) e 7,8 μ L de um mix contendo SYBR®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e o par de primers na concentração de 0,2 μ mol/L completando uma reação com volume final de 15 μ L. Um fragmento do gene EF1 β foi utilizado como controle endógeno. A placa foi colocada num termociclador StepOne Plus Real Time PCR (Applied Biosystems) e submetida às seguintes condições: etapa inicial de desnaturação a 95°C por 10min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1min.

Cada amostra de cDNA foi analisada em replicata técnica. Os gráficos apresentados nos resultados foram obtidos pelo Software StepOne Plus v2.1 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

4. Resultados e Discussões

4.1 Qualidade dos frutos no dia da colheita

Pode-se verificar na tab. 1 que os frutos colhidos apresentavam-se dentro da faixa estabelecida pela pesquisa para a cultivar 'Gala' como ideais para um armazenamento prolongado (Girardi *et al.*, 2002). Com exceção da acidez, os valores mostraram-se dentro dos parâmetros de colheita apresentados por Girardi *et al.* (2004). Porém, é importante ressaltar que essa diferença na acidez pode ter ocorrido devido ao método empregado, já que, neste trabalho, o ponto final da titulação foi avaliado com o uso de pHmetro, enquanto a acidez apresentada pela literatura como parâmetro de colheita foi, provavelmente, analisada com o uso de solução de fenolftaleína.

Tabela 1 - Qualidade de frutos de maçã cv. 'Gala' colhidos na maturação fisiológica: comparação com os parâmetros de colheita

Atributo de qualidade	Resultados obtidos	Parâmetros de colheita
Firmeza (N)	83,85 ± 2,05	75,48 – 83,6
AT (cmol/L)	8,29 ± 0,61	5,2 – 6,0
SST (°Brix)	12,68 ± 0,90	>11
Amido (1-5)	2,33 ± 1,25	2,0 – 3,0
Cor vermelha ("a")	34,93 ± 1,75	-
Cor vermelha ("h")	23,80 ± 1,97	-
Etileno (nL.h ⁻¹ .g ⁻¹)	0,00	-

Observa-se que o índice de degradação de amido ficou em torno de 2,3, dentro de uma escala de leitura de 1 a 5 (tabela de Werner, 1989). A firmeza de polpa obteve um valor médio de 83,85 N (18,9 lbs), sendo 12,68 °brix para sólidos solúveis e 8,29 cmol/L para acidez titulável. As leituras de cor foram realizadas apenas na parte vermelha do fruto, visto que esse clone de Gala apresenta praticamente 100 % de cor vermelha de cobrimento no momento da colheita. Para isso, o valor de "a" obtido ficou na faixa de 34,93, sendo o ângulo "h" com 23,80.

4.2 Qualidade dos frutos mantidos em temperatura ambiente

4.2.1 Etileno

Observa-se na fig. 4 que os frutos tratados com etileno foram os que mais produziram esse hormônio, demonstrando que a aplicação de etileno exógeno foi capaz de estimular a síntese do hormônio, possivelmente por aumentar a expressão gênica e atividade das enzimas envolvidas na sua biosíntese. Os valores alcançados após 3 dias de manutenção à temperatura ambiente foram de $68,07 \text{ nl.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$, aumentando para $105,9 \text{ nl.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ após 6 dias e $83,19 \text{ nl.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ e $97,4 \text{ nl.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ aos 9 dias e 12 dias respectivamente. Esses valores foram superiores aos observados nos frutos controle, os quais apresentaram uma produção de etileno de $22,69 \text{ nl.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$, $87 \text{ nl.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$, $68,06 \text{ nl.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ e $83,2 \text{ nl.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ após 3, 6, 9 e 12 dias respectivamente. Já os frutos tratados com 1-MCP praticamente não produziram etileno ao longo do período estudado, comportamento observado por Fan e Matheis (1999a) em maçãs 'Fuji', onde a produção de etileno não foi detectada 15 dias após o tratamento com 1-MCP.

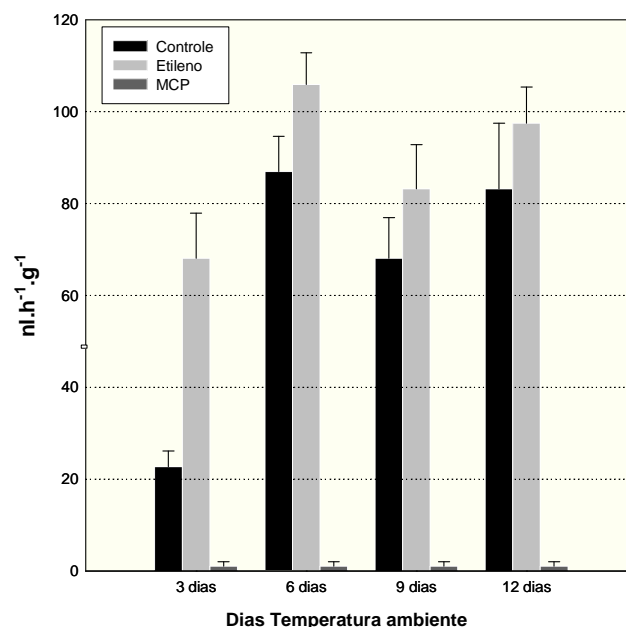


Figura 4 - Efeito da aplicação de etileno exógeno e 1-MCP sobre a produção de etileno em clone de maçã 'Gala'

4.2.2 Firmeza de polpa

Na fig. 5, pode-se verificar a variação da firmeza de polpa em função dos tratamentos com etileno e 1-MCP nos frutos mantidos em temperatura ambiente. Os frutos tratados com 1-MCP mantiveram os valores de firmeza de polpa mais altos do que os frutos controle e tratados com etileno, principalmente em 9 e 12 dias. Esse comportamento demonstra que o amolecimento da polpa desses frutos é dependente da ação do etileno, e que o uso do 1-MCP é uma alternativa eficaz para manter os frutos firmes por mais tempo após a colheita.

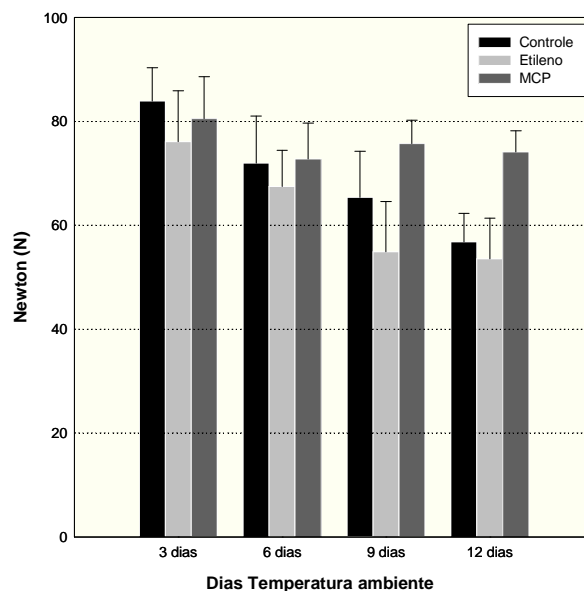


Figura 5 - Influência dos tratamentos com etileno e 1-MCP na firmeza de polpa de maçãs armazenadas em temperatura ambiente.

4.3 Avaliação físico-química dos frutos mantidos sob refrigeração

A tab. 2 apresenta os resultados correspondentes à qualidade físico-química das maçãs mantidas em armazenamento refrigerado.

Tabela 2 - Qualidade de frutos de maçã cv. Gala - clones Baigent, mantidos sob refrigeração por 2, 4 e 6 meses. Os resultados são observações realizadas em frutos mantidos 7 dias em temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$).

Variável	Tratamento	Período de conservação		
		2 meses	4 meses	6 meses
Etileno ($\text{nL.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$)	Controle	423,50 \pm 10,3	847,1 \pm 16,3	4.141,17 \pm 27,2
	Etileno	364,70 \pm 12,7	2.070,6 \pm 28,3	3.388,23 \pm 45,8
	1-MCP	0,00	0,00	0,00
Firmeza Polpa (N)	Controle	59,86 \pm 5,87	61,91 \pm 6,55	56,94 \pm 9,24
	Etileno	66,96 \pm 9,54	61,88 \pm 4,47	60,46 \pm 7,28
	1-MCP	77,35 \pm 3,95	73,11 \pm 3,84	69,99 \pm 2,95
AT (cmol/L)	Controle	6,20 \pm 0,21	5,19 \pm 0,33	4,80 \pm 0,45
	Etileno	5,62 \pm 1,03	5,65 \pm 0,33	4,83 \pm 0,52
	1-MCP	6,42 \pm 0,34	5,77 \pm 0,49	5,67 \pm 0,13
SS (Brix)	Controle	13,18 \pm 1,18	13,08 \pm 0,88	12,7 \pm 0,99
	Etileno	13,82 \pm 0,78	14,24 \pm 0,40	13,66 \pm 0,51
	1-MCP	13,86 \pm 0,89	14,08 \pm 0,29	13,46 \pm 0,34
Cor Vermelha (“a”)	Controle	29,92 \pm 1,69	32,85 \pm 0,97	31,76 \pm 1,01
	Etileno	29,10 \pm 3,33	31,28 \pm 2,14	31,93 \pm 1,18
	1-MCP	29,27 \pm 3,36	29,87 \pm 2,23	29,73 \pm 2,00
Cor Vermelha (“h”)	Controle	24,86 \pm 3,07	25,79 \pm 1,23	25,83 \pm 2,24
	Etileno	22,99 \pm 3,07	24,28 \pm 4,16	24,29 \pm 2,24
	1-MCP	25,69 \pm 5,21	25,74 \pm 5,66	24,46 \pm 3,33

Os resultados demonstram que, em relação ao controle, o tratamento com etileno exógeno teve influência positiva na produção do hormônio em 4 meses de AR, quando a mesma foi mais elevada nos frutos tratados com etileno. Já o tratamento com 1-MCP inibiu a síntese de etileno durante os 6 meses de armazenamento. Esse resultado demonstra que a síntese autocatalítica do etileno foi inibida pela inativação do hormônio, e que isso ocorreu devido à ligação do 1-MCP aos sítios receptores do etileno impedindo a entrada deste último na célula, bloqueando o estímulo fisiológico e a transdução de sinal. Autores relatam que o acúmulo de transcritos, bem como a atividade das enzimas ACC sintase e ACC oxidase, as quais fazem parte da biosíntese do etileno, são inibidas pelo uso do 1-MCP (BLANKENSHIP, DOLE, 2003; WATKINS, 2006), o que explica a inibida síntese de etileno nos frutos tratados com 1-MCP.

A firmeza de polpa foi maior ao longo de todo o período analisado nos frutos tratados com 1-MCP, o que também foi observado por Bai (2005), que relata que a firmeza das cultivares 'Gala', 'Delicious' e 'Granny Smith' tratadas com 1-MCP manteve-se mais elevada do que nos frutos controle (sem tratamento) após 8 meses de armazenamento refrigerado. Brackmann et al. (2005) observaram que, em relação ao controle, o tratamento com 1-MCP manteve a firmeza de maçãs 'Gala' mais alta após 4 e 8 meses em armazenamento refrigerado. Considerando que a firmeza dos frutos é influenciada pelas alterações que ocorrem na parede celular, esse resultado demonstra que, nas amostras armazenadas sob refrigeração (tab.2) e em temperatura ambiente (fig. 5), estes eventos, que incluem acúmulo de transcritos e atividade das hidrolases de carboidratos, são influenciados pelo etileno. Neste sentido, Wei et al. (2010) observaram que a atividade das enzimas poligalacturonase, pectinametilesterase, β -galactosidase e α -L-arabinofuranosidase foi mais alta em maçãs cv. 'Golden Delicious' tratadas com etileno, sendo a firmeza de polpa menor nos frutos deste tratamento, enquanto o contrário ocorreu nos frutos que receberam tratamento com 1-MCP, tanto em relação à atividade das enzimas como para a firmeza de polpa.

A acidez também foi influenciada pelo uso de 1-MCP, sendo mais elevada nos frutos que receberam este tratamento. Em relação aos sólidos solúveis, observou-se comportamento semelhante nos frutos que receberam tratamento com 1-MCP e etileno, mantendo-se mais elevados nestes do que nos frutos controle. Em relação à influência do uso de 1-MCP sobre estes parâmetros, resultados

semelhantes foram encontrados por Fan, Matheis (1999b) em maçãs. Os autores atribuíram este comportamento à redução da taxa respiratória, que é dependente da ação do etileno e, conseqüentemente, reduzida pela presença de 1-MCP. Assim, com a redução na respiração, o consumo das reservas energéticas como os açúcares e os ácidos orgânicos também é reduzido, resultando em valores mais elevados de acidez e sólidos solúveis.

4.4 Atividade enzimática

A evolução da atividade enzimática α -L-arabinofuranosidase está representada na fig. 6. Para as amostras controle, os valores em mmol de *p*-nitrofenol/h/mg foram de 6,27 em 9 dias em temperatura ambiente, mostrando-se superior ao encontrado nas amostras tratadas com etileno (3,61) e com 1-MCP (2,51) e nos frutos congelados logo após a colheita, que foi de 2,87. Esses valores, no entanto, foram inferiores aos observados nos frutos sob armazenamento refrigerado. Nestes, o tratamento com etileno resultou em atividade de 21,43 aos 2 meses, 5,43 aos 4 meses e 21,24 aos 6 meses, enquanto o uso de 1-MCP resultou em valores mais baixos, sendo 9,39 aos 2 meses, 2,12 aos 4 meses e 10,08 aos 6 meses. As amostras controle apresentaram os seguintes resultados durante o armazenamento refrigerado: 9,11 aos 2 meses, 8,48 aos 4 meses e 17,00 aos 6 meses.

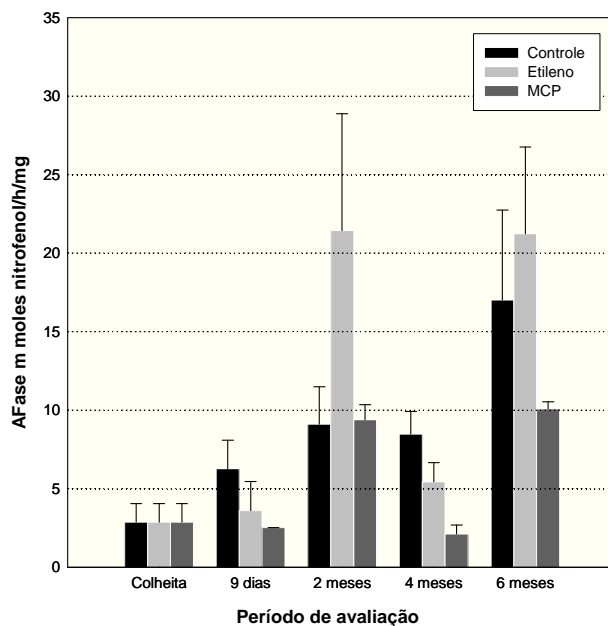


Figura 6 - Atividade α -L-arabinofuranosidase em maçã 'Gala' ao longo do período de armazenamento: efeito dos tratamentos com etileno e 1-MCP em comparação ao controle.

Como pode ser visto, enquanto o tratamento com etileno exógeno ativou grandemente a atividade enzimática em dois pontos durante o armazenamento (2 e 6 meses), o uso de 1-MCP manteve a atividade mais baixa em praticamente todos os períodos avaliados, quando comparado com os frutos controle e com os tratados com etileno. Esse resultado concorda com Wei et al (2010), que observaram que o uso de 1-MCP reduziu fortemente a atividade α -L-arabinofuranosidase em maçã 'Golden Delicious'.

Porém, o fato de o tratamento com 1-MCP não ter inibido totalmente a atividade, mesmo tendo inibido a produção de etileno (tab. 2), indica que essa atividade é regulada por outros fatores além do etileno. Também é importante considerar a existência de muitas isoformas com atividade α -L-arabinofuranosidase, e que elas podem apresentar diferentes reguladores. Diferentes isoformas da α -L-arabinofuranosidase sob distintas regulações já foram relatadas em tomate (SOZZI et al., 2002). A presença destas isoformas ativas em diferentes períodos do armazenamento também pode ser uma explicação para o comportamento da atividade nos 4 meses de AR, que não seguiu o padrão observado nos 2 e 6 meses, principalmente nos frutos tratados com etileno e 1-MCP. Esses resultados podem

indicar que, em polpa de maçã 'Gala', a atividade total α -L-arabinofuranosidase deve-se à ação de diferentes isoformas que predominam em períodos diferenciados. Em outras palavras, pode-se dizer que, por exemplo, a isoforma predominante nos 6 meses não é a mesma que predomina nos 4 meses de AR.

Observou-se também que os maiores valores de atividade α -L-arabinofuranosidase para os dois tratamentos e o controle foram verificados após 6 meses de AR, o que reforça a importância desta enzima durante o armazenamento de maçã, como já foi observado por Goulao et al. (2007) em maçãs 'Mondial Gala'.

Deste modo, considerando que a farinosidade de polpa ocorre no período de armazenamento de maçãs 'Gala', é possível estabelecer uma relação entre a atividade α -L-arabinofuranosidase e o distúrbio. Esta relação tem suporte em estudos anteriores em maçãs, que demonstraram que cultivares com alta tendência à farinosidade apresentam maior perda de arabinose do que cultivares não farinhentas (NARA, KATO, MOTOMURA, 2001), e que a perda de arabinose ocorre principalmente após a maturação (PEÑA, CARPITA, 2004). Porém, para que tal hipótese seja confirmada, é importante que farinosidade de polpa, quantidade de arabinose e atividade α -L-arabinofuranosidase sejam avaliados nos mesmos frutos a fim de que possa ser feita uma correlação entre os resultados destas análises.

4.5 Expressão do gene *MdAF3* por RT-qPCR

4.5.1 Extração de RNA total

Os RNAs utilizados no experimento apresentaram-se íntegros, o que pôde ser verificado pelas bandas visualizadas no gel de agarose, as quais mostraram-se nítidas e sem o arraste típico de degradação. A fig. 7, que corresponde às amostras 12 dias controle, 12 dias etileno e 12 dias 1-MCP, mostra exemplos de RNAs íntegros.

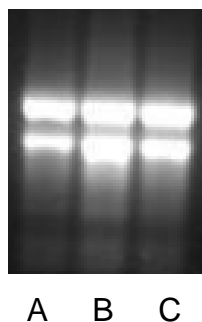


Figura 7 - Gel de agarose a 1% corado com Gel Red. As bandas correspondem aos RNAs 12 dias controle (A), 12 dias etileno (B) e 12 dias 1-MCP (C).

A pureza dos RNAs foi avaliada através da medida espectrofotométrica das ODs (densidade ótica). A tab. 3 apresenta os valores de OD, que estavam em torno de 1,8 a 2 tanto para 260/280 nm quanto para 260/230 nm. Esses valores comprovam que os RNAs estavam livres de contaminação por proteínas, polissacarídeos e compostos fenólicos, pois OD 260/280 na faixa de 1,91 a 2,02, indica que o RNA extraído está livre de contaminação por proteína, enquanto OD 260/230 em torno de 2,0, revela a ausência de grandes teores de polifenóis e polissacarídeos (GASIC et al., 2004).

É importante que os RNAs estejam livres desse tipo de contaminação para que a reação seguinte (transcrição reversa) não seja prejudicada (SALZMAN et al., 1999). Porém, extrair RNAs puros de materiais vegetais torna-se uma tarefa complicada, especialmente em frutas como maçãs e pêras, as quais são ricas em fenóis e polissacarídeos. A extração torna-se ainda mais complicada se os tecidos dos frutos estão na fase de amadurecimento (GASIC et al., 2004). A presença de polifenóis é indesejável porque eles rapidamente são oxidados a compostos que ligam-se ao RNA. Esse problema pode ser evitado através do uso de polivinilpirrolidona (PVP) solúvel, a qual tem a capacidade de ligar-se de forma imediata aos compostos fenólicos, impedindo a ligação destes ao RNA (SALZMAN et al., 1999).

Esses resultados demonstram que os RNAs estavam aptos para as etapas seguintes da RT-qPCR, além de comprovarem que o método empregado é eficiente para uso em polpa de maçã 'Gala', o que pôde ser visto, também, pelo bom rendimento do RNA total, apresentado na tab. 3.

Tabela 3 - Resultados da avaliação da qualidade de RNAs através de densidade ótica (OD) e quantificação por espectrofotometria de UV

Amostra	Quantidade (ng/ μ L)	OD 260/230	OD 260/280
Colheita C	915,2	1,819	1,911
Colheita 1-MCP	1054	1,966	1,744
Colheita Et.	699,6	1,914	2,107
12 dias C	1112,8	1,87	1,85
12 dias 1-MCP	1172	1,961	1,913
12 dias Et.	1616,8	1,954	1,922
2 meses C	1860	2,293	1,842
2 meses 1-MCP	1152	1,853	1,983
2 meses Et.	1546	1,91	1,857
4 meses C	642,8	1,977	1,936
4 meses 1-MCP	918	1,854	1,963
4 meses Et.	1457,6	2,043	1,89
6 meses C	647,2	2,342	1,949
6 meses 1-MCP	854,4	2,18	2,082
6 meses Et.	1053,2	2,115	1,898

4.5.2 Expressão do gene *MdAF3* em polpa de maçã

Confirmada a eficiência dos cDNAs, o acúmulo de transcritos *MdAF3* pôde ser avaliado por PCR em tempo real. Os resultados podem ser observados na fig. 9. Porém, é importante ressaltar que esses resultados são apenas indicativos e não conclusivos, pois o gene endógeno utilizado não mostrou-se ideal para as amostras e tratamentos avaliados, apresentando variações nos valores de C_T (do inglês *Cycle Threshold*) entre as amostras. Assim, novos testes deverão ser feitos para a obtenção de resultados totalmente confiáveis.

Os resultados obtidos indicam claramente que o gene tem regulação positiva pelo etileno, já que, em todos os períodos pós-colheita avaliados, as menores quantidades do gene *MdAF3* foram observadas nas amostras tratadas com 1-MCP, sendo o contrário observado no tratamento com etileno exógeno.

Dois genes que codificam α -L-arabinofuranosidases, um deles pertencente à família GH51 e o outro à família GH3, foram relatados como regulados pelo etileno em pêssigo, já que o acúmulo de transcritos foi maior durante o início do pico de produção do etileno e na senescência dos frutos (SANTO, PAGANO, SOZZI, 2009).

Em maçã 'Golden Delicious', um transcrito de α -L-arabinofuranosidase teve sua expressão reduzida pelo uso de 1-MCP e baixas temperaturas, revelando, assim, sensibilidade ao etileno (WEI et al., 2010).

Os frutos logo após a colheita (4 horas) apresentaram as menores quantidades de transcritos para os dois tratamentos e o controle, quando comparados com os frutos armazenados. Nos frutos mantidos 12 dias em temperatura ambiente (fig. 8B) ocorreu um aumento na quantidade de transcritos em relação aos analisados após 4 horas (fig. 8A). Comportamento semelhante foi observado para a produção de etileno, que foi mais alta nos frutos armazenados em temperatura ambiente (fig. 4) do que nos frutos analisados logo após a colheita (tab. 1), indicando uma possível relação entre acúmulo de transcritos *MdAF3* e produção de etileno. Quanto ao tempo de armazenamento refrigerado, observou-se que a quantificação relativa dos transcritos *MdAF3* não variou muito dentro dos tratamentos ao longo dos 6 meses. Porém, ainda assim pode-se dizer que a influência do etileno foi mais nítida em 2 e 4 meses (fig. 8C e 8D), quando o tratamento com 1-MCP praticamente inibiu o acúmulo dos transcritos, o qual manteve-se em níveis mais altos nos frutos que receberam etileno exógeno. Esses resultados revelam a importância deste gene durante a pós-colheita, podendo, assim, estar envolvido nos eventos que culminam com a farinosidade de polpa, que é observada após 3 meses de armazenamento refrigerado (BRACKMANN, 1992).

Em relação à atividade enzimática observada neste trabalho, não pôde-se confirmar que a mesma é referente à uma enzima codificada por *MdAF3* em todo o período avaliado. Nos frutos tratados com etileno, a atividade enzimática foi menor do que nos frutos controle em 9 dias em temperatura ambiente e 4 meses em AR (fig. 6), enquanto a quantidade de transcritos *MdAF3* foi realçada por este tratamento em todos os períodos avaliados (fig. 8). Já o tratamento com 1-MCP resultou em redução tanto da atividade α -L-arabinofuranosidase quanto da transcrição do gene. Ainda, nos frutos controle, atividade enzimática e acúmulo de transcritos apresentaram seus valores mais baixos na colheita, em relação aos períodos de armazenamento. Esses resultados podem ser um indício de que *MdAF3*

codifica para uma isoforma α -L-arabinofuranosidase com atividade durante o armazenamento de maçã 'Gala', mas que isoformas codificadas por outros genes também estão ativas neste período. Tanto o acúmulo de transcritos *MdAF3*, quanto a atividade α -L-arabinofuranosidase avaliadas nesse trabalho podem ter uma relação positiva com a redução da firmeza de polpa, a qual foi mais controlada pelo uso de 1-MCP, quando expressão e atividade apresentaram-se em níveis mais baixos.

Assim, de acordo com Goulão et al. (2007) a presença de diversas isoformas de enzimas, com distintos padrões de expressão pode mascarar a atividade total em um dado estágio de desenvolvimento. Também, a presença de transcritos de mRNA que codificam para uma isoforma específica não pode ser diretamente relacionada com a atividade enzimática total resultante, devido a diferenças nas taxas de transcrição. Por isso, é importante que os estudos de expressão sejam combinados com a avaliação da atividade enzimática.

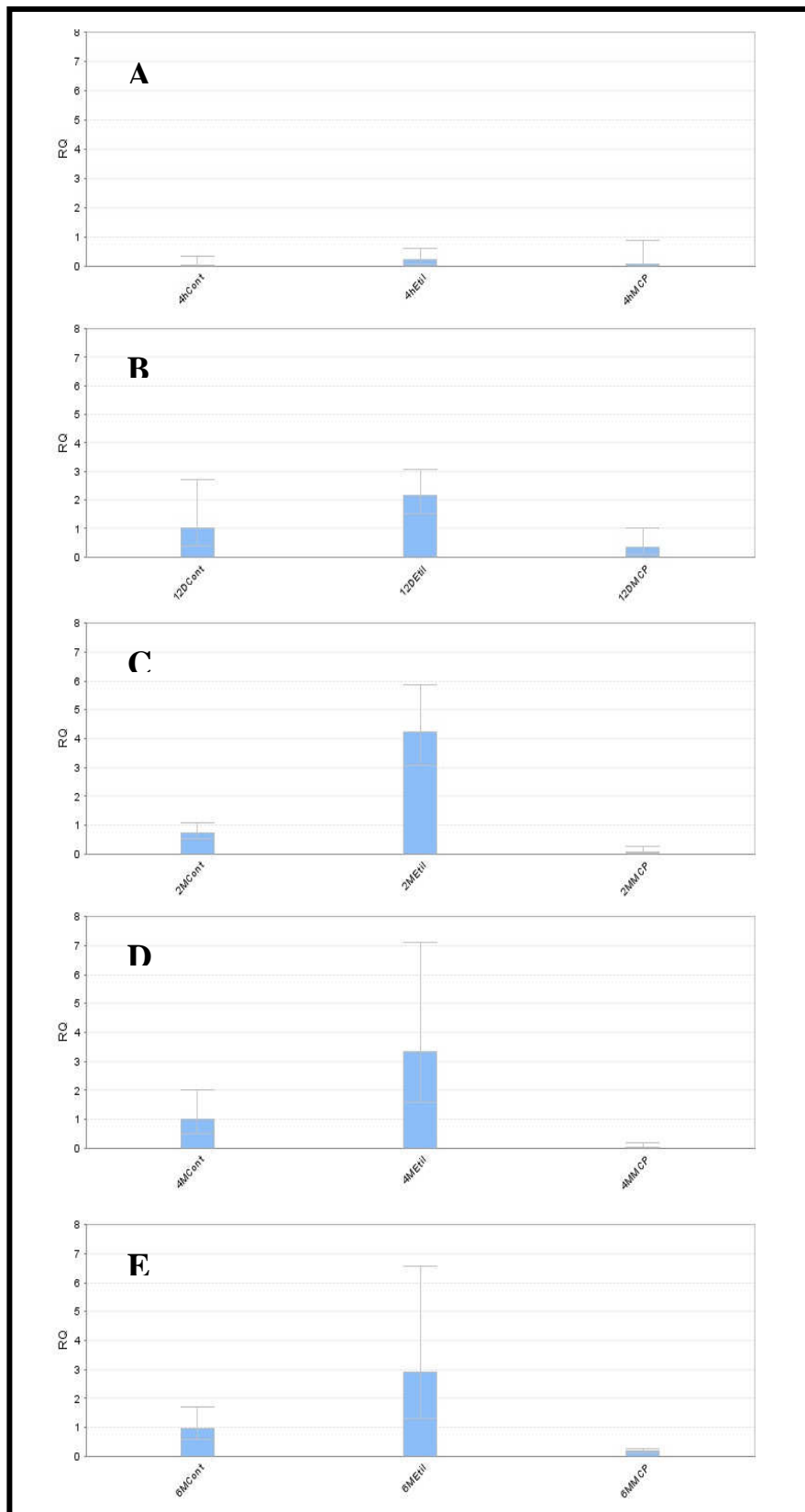


Figura 8 - Quantificação relativa de transcritos do gene *MdAF3* em frutos não tratados (controle) e tratados com etileno e 1-MCP após 4 horas (A) e 12 dias (B) de manutenção a temperatura ambiente e em frutos mantidos por 2 (C), 4 (D) e 6 meses (E) em armazenamento refrigerado mais 7 dias em temperatura ambiente. Os valores representam os transcritos em comparação com a expressão do gene constitutivo *MdEF1 β* .

5. Conclusão

A quantificação relativa dos transcritos *MdAF3* por RT-qPCR resultou em fortes indícios de que o mesmo seja positivamente regulado pelo etileno, já que o acúmulo de transcritos foi realçado pelo tratamento com etileno exógeno e reduzido através do uso de 1-MCP.

Além disso, o 1-MCP também inibiu a síntese de etileno, manteve os frutos mais firmes e com a acidez mais elevada e reduziu a atividade α -L-arabinofuranosidase, o que ressalta a influência do fitohormônio nesses eventos.

O comportamento semelhante do gene *MdAF3* e da atividade enzimática em resposta ao tratamento com 1-MCP pode ser um indício de que uma isoforma α -L-arabinofuranosidase com atividade nos períodos avaliados seja codificada por *MdAF3* na cultivar estudada.

Ainda, é possível concluir que, tanto a transcrição do gene, quanto a atividade enzimática estudadas neste trabalho, apresentam importância no período de armazenamento, quando alcançaram seus maiores níveis em comparação com os dados de colheita.

6. Perspectivas futuras

Considerando que a quantificação relativa do gene endógeno utilizado na PCR em tempo real apresentou certa oscilação, a quantificação dos transcritos *MdAF3* deverá ser refeita para resolver tal problema e assim tratar os dados estatisticamente para obter resultados mais conclusivos nas amostras de polpa de maçã avaliadas nesse trabalho, bem como em outros tecidos da planta e fases de desenvolvimento do fruto. Nestas mesmas amostras poderá, ainda, ser estudada a relação entre a atividade α -L-arabinofuranosidase e genes pertencentes à família GH51 que codificam essa enzima.

Ainda, um próximo passo no estudo do gene *MdAF3* é a caracterização do mesmo através da avaliação molecular, fisiológica e bioquímica de organismos modificados com a inserção do gene. O organismo escolhido para tal é o tomate (*Solanum lycopersicum*) devido ao seu curto ciclo de vida e pelo fato de ser o fruto climatérico modelo, além da vantagem de ter o seu genoma completamente sequenciado, o que faz desse fruto um modelo também para estudos moleculares.

7. Referências

ABPM – Associação Brasileira dos Produtores de Maçã. Disponível em: <http://www.abpm.org.br/>. Acesso em 09 de jan. de 2011.

AWAD, M; YOUNG, R.E. Postharvest variation in cellulase, polygalacturonase, and pectinmethylesterase in avocado (*Persea americana* Mill, cv. Fuerte) fruits in relation to respiration and ethylene production. **Plant Physiology**. v. 64, p. 306-308. 1979.

BENNETT, A. B; LABAVITCH, J. M. Ethylene and ripening-regulated expression and function of fruit cell wall modifying proteins. **Plant Science**. v. 175, p. 130-136. 2008.

BLANKENSHIP, S.M.; DOLE, J.M. 1-Methylcyclopropene: a review. **Postharvest Biology and Technology**. v.28, p.1-25. 2003.

BRACKMANN, A. Produção de etileno, CO₂ e aroma de cultivares de maçã. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.14, n.1, p.103-108, 1992.

BRACKMANN, A.; FREITAS, S. T. de. Efeito do 1-MCP (1–metilciclopropeno) na qualidade pós-colheita de maçãs cultivar gala em diferentes estádios de maturação. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.12, n.1, p. 44-52. 2005.

BRACKMANN, A.; SESTARI, I.; LUNARDI, R. Qualidade da maçã ‘gala’ em função do resfriamento, da temperatura de instalação de atmosfera e da umidade relativa. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, n. 2, p. 235-239, 2004

BRACKMANN, A; MAZARO, S.M; LUNARDI, R. Armazenamento da maçã cv. Golden Delicious em atmosfera controlada com altas concentrações de CO₂ e ultra-baixas de O₂. **Ciência Rural**. v. 28, n. 2, p. 215-219. 1998.

BRACKMANN, A; CERETTA, M. Efeito da redução nos níveis de etileno e da umidade relativa no armazenamento de maçã .gala. em atmosfera controlada. **Pesquisa Agropecuária**. v. 34, n. 12, p. 2169-2174. 1999.

BRACKMANN, A; WEBER, A; SESTARI, I; PETÉRLE, M. E; BOTH, V; PAVANELLO, E.P; VILELA, J. A. Manejo do etileno e sua relação com a maturação de maçãs ‘gala’ armazenadas em atmosfera controlada. **Bragantia**. v.68, n.2, p.519-525. 2009.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** v. 72, p. 248–54. 1976.

BRUMMELL, D.A. Cell wall disassembly in ripening fruit. **Functional Plant Biology**. v. 33, p. 103-119. 2006.

BRUMMEL, D.A; CIN, V.D; LURIE, S; CRISOSTO, C.H; LABAVITCH, J.M. Cell wall metabolism during the development of chilling injury in cold-stored peach fruit: association of mealiness with arrested disassembly of cell wall pectins. **Journal of Experimental Botany**. v. 55, n. 405, p. 2041-2052. 2004.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** v. 72, p. 248–54. 1976.

BRUMMELL, D; CIN, V.D; CRISOSTO, C.H; LABAVITCH, J.M. Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. **Journal of Experimental Botany**. v. 55, p. 2029-2039. 2004.

BUSTIN, A, S; NOLAN, T. Pitfalls of quantitative real-Time reverse-transcription polymerase chain reaction. **Journal of Biomolecular Techniques**. v. 15, p. 155-166. 2004.

CHITARRA, M. I. F; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL/FAEPE. 1990.

CORRENT, A. R.; GIRARDI, C. L.; PARUSSOLO, A.; TOMAZZI, R.; FRONZA, E.; ROMBALDI, C.; Efeito do 1-Metilciclopropeno em Maçãs 'Fuji' Armazenadas em Atmosfera Refrigerada e Atmosfera Controlada. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.11, n. 1, p. 91-94. 2005.

DENARDI, F.; CAMILO, A. P. Cultivares de macieira para o Sul do Brasil. **Hortisul**, Pelotas, v. 2, n. 3, p. 12-19, 1992

EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis, 2006. 743p.

FAN, X; MATTHEIS, J.P. Impact of 1-methylcyclopropene and methyl jasmonate on apple volatile production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 47, p. 2847-2853. 1999a.

FAN, X; MATTHEIS, J.P. Development of apple superficial scald, soft scald, core flush, and greasiness is reduced by MCP. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 47, p. 3063-3068. 1999b.

FISCHER, R.L; BENNETT, A.B. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Biology**. v. 42, p. 675-703, 1991.

FRY, S.C. Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 46, p. 497-520. 1995.

GACHON, C; MINGAM, A; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**. v. 55, n. 402, p. 1445–1454. 2004.

GASIC, K; HERNANDEZ, A; KORBAN, S.S. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. **Plant Molecular Biology Reporter**. v. 22, p. 437a-437g. 2004.

GIOVANNONI, J.J; DELLAPENNA, D; BENNET, A.B; FISCHER, R.L. Expression of a chimeric polygalacturonase gene in transgenic *rin* (ripening inhibitor) tomato fruit

results in polyuronide degradation but not fruit softening. **The Plant Cell**. v. 1, p. 53-63, 1989.

GIRARDI, C.L; NACHTIGALL, G.R; PARUSSOLO, A. Fatores pré-colheita que interferem na qualidade da fruta. In: GIRARDI, C.L, et al. **Maçã: Pós-colheita**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p.10, 32.

GIRARDI, C.L; SANHUEZA, R.M.V; BENDER, R.J. Manejo pós-colheita e rastreabilidade na produção integrada de maçãs. **Circular Técnica**, 31. Embrapa. 2002.

GÓMEZ, C; FIORENZA, F; IZQUIERDO, L; COSTELL, E. Perception of mealiness in apples: a comparison of consumers and trained assessors. **Z Lebensm Unters Forsch**. v. 207, p. 304-310. 1998.

GOULAO, L.F; OLIVEIRA, C.M. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. **Trends in Food Science & Technology**. v. 19, p. 4-25. 2008.

GOULAO, L.F; SANTOS, J; SOUSA, I; OLIVEIRA, C.M. Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples. **Postharvest Biology and Technology**. v. 43, p. 307-318. 2007.

GRIERSON, D; TUCKER, G.A. Timing of ethylene and polygalacturonase synthesis in relation to the control of tomato fruit ripening. **Planta**. v. 157, n. 2, p.174-179. 1983.

HARKER, F.R.; HALLETT, I.C. Physiological changes associated with development of mealiness of apple fruit during cool storage. **HortScience**. v. 27, n. 12, p. 1291–1294. 1992.

HARKER, F.R; SUTHERLAND, P.W. Physiological changes associated with fruit ripening and the development of mealy texture during storage of nectarines. **Postharvest Biology and Technology**. v. 2, n. 4, p. 269 – 277. 1993.

HUAI, Q; XIA, Y; CHEN, Y; CALLAHAN, B; LI, N, KE, H. Crystal structures of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase in complex with aminoethoxyvinylglycine and pyridoxal-5-phosphate provide new insight into catalytic mechanisms. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 276, n. 41, p. 38216-38216. 2001.

ITAI, A; ISHIHARA, K; BEWLEY, D. Characterization of expression, and cloning, of b-D-xylosidase and a-L-arabinofuranosidase in developing and ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. **Journal of Experimental Botany**. v. 54, p. 2615-2622. 2003.

KLUGE, R.A.; NACHTIGAL, J.C.; BILHALVA, A.B. **Fisiologia e manejo póscolheita de frutas de clima temperado**. 2.ed. Pelotas: UFPel, 2002. 163p.

NARA, K; KATO, Y; MOTOMURA, Y. Involvement of terminal-arabinose and – galactose pectic compounds in mealiness of apple fruit during storage. **Postharvest Biology and Technology**. v. 22, p. 141-150. 2001.

NUMAN, M.T; BHOSLE, N.B. a-L-Arabinofuranosidases: the potential applications in biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 33, p. 247-260. 2006.

PAIVA, E.P; LIMA, M.S; PAIXÃO, J.A. Pectina: propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação. **Revista Iberoamericana de Polímero**. v. 10, p. 196-211. 2009.

Paredecellular.Disponívelem:felix.ib.usp.br/pessoal/marcos/fisio2008/PDF/PDF%20TEORICA/Paredede%20celular.pdf. Acesso em: 07 de fev. de 2011.

PEÑA, M.J; CARPITA, N.C. Loss of highly branched arabinans and debranching of rhamnogalacturonan I accompany loss of firm texture and cell separation during prolonged storage of apple. **Plant Physiology**. v. 135, p. 1305-1313. 2004.

PFFAFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**. v. 29, n.9 00. 2001.

PRASANNA, V; PRABHA, T.N; THARANATHAN. R.N. Fruit Ripening Phenomena – An Overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 47, p.1-19. 2007.

REID, J.S. Grant. Carbohydrate Metabolism: Structural Carbohydrates. In: DEY, P.M; HARBORNE, J.B. **Plant biochemistry**. San Diego: Ed. Academic Press, 1997. p. 205-237.

ROSLI, H. G; CIVELLO, P.M; MARTÍNEZ, G.A. α -L-Arabinofuranosidase from strawberry fruit: Cloning of three cDNAs, characterization of their expression and analysis of enzymatic activity in cultivars with contrasting firmness. **Plant Physiology and Biochemistry**. v 47, p. 272-281. 2009.

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

SANTO, M. C. D; PAGANO, E. D; SOZZI, G. O. Differential expression of a-L arabinofuranosidase and a-L-arabinofuranosidase/b-D-xylosidase genes during peach growth and ripening. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 47, p. 562-569. 2009.

Sóbiologia.Disponívelem://www.sobiologia.com.br/conteudos/Morfofisiologiavegetal/morfovegetal14.php. Acesso em: 07 de fev. de 2011.

SOZZI, G.O; GREVE, C ; PRODY, G.A ; LABAVITCH, J.M. Gibberellic acid, synthetic auxins, and ethylene differentially modulate α -L-arabinofuranosidase activities in antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase tomato pericarp discs. **Plant physiology**. v. 129, p. 1330-1340. 2002.

TAIZ, L; ZIEGER, E; trad. SANTARÉM, E.R. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed. 2006.

TATEISHI, A; KANAYAMA, Y; YAMAKI, S. α -L-Arabinofuranosidase from cell walls of Japanese pear fruits. **Phytochemistry**. v.42, n. 2, p. 295-299. 1996.

TATEISHI, A; MORI, H; WATARI, J; NAGASHIMA, K; YAMAKI, S; INOUE, H. Isolation, Characterization, and cloning of α -L-arabinofuranosidase expressed during fruit ripening of Japanese Pear. **Plant Physiology**. v. 138, p. 1653-1664. 2005.

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

WAPA - The world apple and pear association. Disponível em: <http://www.wapa-association.org/asp/index.asp>. Acesso em: 09 de jan. de 2011.

WATKINS, C.B. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. **Biotechnology Advances**. v.24, p.389-409. 2006

WEI, J; et al. Changes and postharvest regulation of activity and gene expression of enzymes related to cell wall degradation in ripening apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**. v. 56. p. 147-154. 2010.