

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Tese

Estudo transcricional em maçãs cv. Gala durante o armazenamento

Camila Francine Paes Nunes

Pelotas, 2019

Camila Francine Paes Nunes

Estudo transcricional em maçãs cv. Gala durante o armazenamento

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Comitê de orientação: Prof. Dr. Fábio Clasen Chaves

Dr. César Luis Girardi

Pelotas, 2019

Camila Francine Paes Nunes

Estudo transcricional em maçãs cv. Gala durante o armazenamento

Data da defesa: 16 de agosto de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Camila Pegoraro (UFPel - FAEM/Departamento de Fitotecnia)

Dr. César Luis Girardi (EMBRAPA Uva e Vinho)

Dr. Cesar Valmor Rombaldi (UFPel - FAEM/Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial)

Dr^a. Vanessa Galli (UFPel - FAEM/Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial)

Dr^a. Tatiane Timm Storch (UFCSPA – Laboratórios do Complexo de Alimentos/Departamento Gerência de Laboratórios)

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

N972e Nunes, Camila Francine Paes

Estudo transcricional em maçãs cv. gala durante o armazenamento / Camila Francine Paes Nunes; Fábio Clasen Chaves, orientador; César Luis Girardi, coorientador. — Pelotas, 2019.

98 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Malus x domestica. 2. 1-mcp. 3. Etileno. 4. Amadurecimento. 5. Atmosfera de armazenamento. I. Chaves, Fábio Clasen, orient. II. Girardi, César Luis, coorient. III. Título.

CDD : 634.11

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por me capacitar e conduzir ao longo desta caminhada, por manter a minha mente e alma tranquila em momentos de dificuldades.

A minha mãe Claudia Cristiane da Silva Paes, gostaria de expressar a minha profunda gratidão pelo carinho, educação e apoio em todas as decisões de minha vida.

Ao meu esposo Gabriel dos Santos Mendes, gostaria de agradecer de todo o meu coração pelo seu amor, pelo constante apoio, carinho e motivação demonstrados ao longo desses quatro anos. Obrigada por você estar sempre ao meu lado, amo muito você.

Aos meus irmãos, Tamara, Bruna, Richard e Rayane pela torcida de sempre e pelo grande amor que tem por mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Clasen Chaves, pelos ensinamentos e oportunidades, com os quais tal trabalho se tornou possível. Obrigada por ter me recebido no seu grupo de trabalho e pela confiança em mim depositada.

Ao Dr. César Luis Girardi, pela orientação, ensinamentos e confiança, assim como pelo suporte técnico dentro da Embrapa Uva e Vinho que foi de crucial importância para a realização deste trabalho.

A todos os colegas do laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas - LaCEM (Bianca Camargo, Giovana Zandona, Jéssica Hoffmann, Marcela Garcia, Marjana Radünz, Paula Filosa e Rosane Crizel), pelo companheirismo, amizade e carinho.

Aos amigos e colugas de trabalho da Embrapa Uva e vinho, Isadora Rubin, Isis Toralles, Juliele Dambros, Naciele Marini e Tatiane Storch, por dividirem comigo bem mais que dias de trabalho em laboratório; como casa, sorrisos, angústias e uma grande amizade, em um momento que todas nós estávamos distantes de casa e de nossas famílias. Obrigada por estarem comigo, pelas conversas acalentadoras que afagavam o coração e por permitirem que eu faça parte de suas vidas. Em especial, a minha amiga Naciele por dividir a sua vida, pela sua conversa amiga, pelo seu bom humor que contagia, os caminhos de idas e vindas Pelotas – Bento Gonçalves e por ser uma mãezona sempre que eu precise. E a Isadora, que foi a minha companheirona de laboratório, que me dedicou o seu tempo, seu conhecimento, seu trabalho e seu ombro amigo.

A minha querida amiga Marjana, por ser a minha dupla em todos os momentos, pela amizade verdadeira, por ser muito parceira em todos os momentos em que mais precisei, por me incentivar com a sua palavra amiga e o seu grande bom humor, que foram muito importantes.

Aos meus colegas e grandes amigos do PPGCTA Helen Hackbart, Jardel Ribeiro e Taiane Camargo, gostaria de agradecer por me oportunizarem com sua amizade, companheirismo e pelas longas horas de risadas que tornaram os meus dias ainda mais agradáveis.

A todos os meus queridos amigos que sempre estiveram torcendo pelo meu sucesso, e que tornaram essa jornada muito mais agradável. Muito obrigada pelo apoio, carinho e amizade.

Aos membros da banca examinadora, Prof^a. Dr^a. Camila Pegoraro, Dr. César Luis Girardi, Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi, Prof^a. Dr^a. Vanessa Galli e a Dr^a. Tatiane Timm Storch, que são pessoas admiráveis e eu sou muito grata pela disponibilidade e contribuições em participar desse trabalho.

Aos demais colegas e amigos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA/UFPel).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Por fim, a todos aqueles que de alguma forma, direta ou indiretamente, fizeram parte da minha vida e contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

“Toda conquista começa com a decisão de tentar!”

(Gail Deves)

Resumo

NUNES, Camila Francine Paes. **Estudo transcricional em maçãs cv. Gala durante o armazenamento**. 2019. 98f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

A maçã é um fruto suscetível a alterações nos atributos sensoriais durante a pós-colheita. Para evitar modificações na firmeza os frutos são armazenados em atmosfera refrigerada (AR) ou controlada (AC) combinadas a aplicação de 1-metilciclopropeno (1-MCP). As alterações nos frutos durante o amadurecimento são coordenados por genes que codificam para enzimas relacionadas a montagem e desmontagem da parede celular. No entanto, ainda não está esclarecido quais são os genes atuantes na manutenção da parede celular em maçãs durante o armazenamento. O objetivo do estudo foi avaliar o acúmulo de transcritos de genes envolvidos no metabolismo da parede celular de maçãs cv. Gala durante armazenamento em AR e AC, na presença e ausência do 1-MCP. Após o armazenamento os frutos foram mantidos a 25 °C por sete dias, para simular condições de prateleira. Foram realizadas caracterização físico-química, análises de perfis de transcritos e de sacarídeos. Os frutos não tratados com 1-MCP, que foram armazenados em AR, apresentaram redução da firmeza e da acidez. No entanto, os frutos tratados com 1-MCP e armazenados em AR, mantiveram a firmeza e a acidez, do momento da colheita até seis meses de armazenamento, assim como observado para os frutos tratados e não tratados com 1-MCP, e armazenados em atmosfera controlada (AC). Na análise transcricional foram estudados seis dos genes de parede celular (*MdFLA2*, *MdGAUT9*, *MdUDP*, *MdAF3*, *MdBXL1* e *MdEXGT*), durante duas safras. De modo geral, a maioria dos genes estudados, na presença do 1-MCP mantiveram o mesmo comportamento transcricional entre as safras. Em contrapartida, na ausência do 1-MCP o acúmulo transcricional foi diferente entre as safras, principalmente para os genes de biossíntese de parede celular. Dentre os genes estudados, o *MdEXGT* apresenta potencial envolvimento no avanço do amadurecimento de maçãs durante o armazenamento por seis meses. E a aplicação do 1-MCP, assim como, a escolha da atmosfera de armazenamento foram fatores importantes para a redução do acúmulo de transcritos desse gene e para o aumento do tempo de prateleira do fruto.

Palavras-chave: *Malus x domestica*; 1-MCP; etileno; amadurecimento; atmosfera de armazenamento, parede celular.

Abstract

NUNES, Camila Francine Paes. **Transcriptional study in apple fruit Gala during storage**. 2019. 98f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

The apple fruit is susceptible to changes in sensory attributes during post-harvest. To avoid changes in firmness the fruits are stored in refrigerated (AR) or controlled (AC) atmosphere combined with the application of 1-methylcyclopropene (1-MCP). However, it is still unclear what genes are involved in maintaining the cell wall in apples during storage. Changes in fruits during ripening are coordinated by genes encoding enzymes related to assembly and disassembly of the cell wall. The objective of the study was to evaluate the accumulation of transcripts of genes involved in the cell wall metabolism of cv. Gala during storage in RA and CA, in the presence and absence of 1-MCP. After storage the fruits were placed at 25 ° C for seven days to simulate shelf life conditions. Physical-chemical characterization, transcript and saccharide profile analyzes were performed. Fruits not treated with 1-MCP, which were stored in RA, showed a reduction in firmness and acidity. However, fruits treated with 1-MCP and stored in RA, maintained firmness and acidity, from the moment of harvest until six months of storage, as observed for fruits treated and not treated with 1-MCP, and stored in controlled atmosphere (CA). In the transcriptional analysis, six of the cell wall genes were studied (*MdFLA2*, *MdGAUT9*, *MdUDP*, *MdAF3*, *MdBXL1* and *MdEXGT*) were studied for two harvests. In general, most of the genes studied in the presence of 1-MCP maintained the same transcriptional behavior between the crops. In contrast, in the absence of 1-MCP the transcriptional accumulation was different between the crops, mainly for the genes of cell wall biosynthesis. Among the genes studied, *MdEXGT* presents potential involvement in the advancement of apple maturing during storage for six months. The application of 1-MCP, as well as the choice of the storage atmosphere were important factors for the reduction of the accumulation of transcripts of this gene and for the increase of the time of storage of the fruit.

Keywords: *Malus x domestica*; 1-MCP; ethylene; maturation; storage atmosphere, cell wall.

Lista de Figuras

Figura 1: Via biosintética do etileno em duas etapas nas plantas. Na primeira etapa SAM é produzido a partir da L-metionina (MET) no “ciclo Yang” e convertido em ACC pela enzima ACC sintase. Na segunda etapa, o ACC é convertido em etileno pela enzima ACC oxidase. 33

Figura 2: Representação estrutural da parede celular de frutos: Microfibrilas de celulose interligadas numa rede de hemicelulose (compostos de xiloglicanos, glucuronoarabinoxilano, glicomanano e (1→3), (1→4) β-D-glicano), que estão incorporadas numa matriz de pectina (compostos de homogalacturonano, xilogalacturonano, ramnogalacturonano I e ramnogalacturonano II)..... 35

Figura 3: Esquema das estruturas de polissacarídeos da pectina. (A) – forma tradicional em que a pectina é encontrada. (B) - representa uma modificação onde HG encontra-se como cadeias laterais do RGI. (C) - modificação na estrutura do RGI em meio alcalino a espinha..... 37

Figura 4:Rota metabólica demonstrando a via de biossíntese dos açúcares que compõem a pectina da parede celular da maçã. Fonte: MapMan 3.6.0RC1.... 40

Figura 5: Esquema do metabolismo de açúcares e seu acúmulo em maçãs.. 46

Figura 6: Ilustração do armazenamento das maçãs cv. Gala em AR (0 °C ± 0,5 °C; 90% UR ± 5%) e AC (0 °C ± 0,5 °C; 90% UR ± 5%; 1,0% de O₂ e 2% de CO₂).....48

Figura 7: Esquema do preparo das placas para validação dos primers referência e ‘alvos’ (*Malus x domestica*)..... 55

Figura 8: Análise físico-química de maçãs "Gala" tratadas e não tratadas com 1-MCP, armazenadas em atmosfera refrigerada. Após o tempo 0, 30 e 180 dias de armazenamento foram realizadas análises físico-químicas (a) firmeza, (b) acidez

e (c) sólidos solúveis. Os resultados estão representados em média e \pm desvio padrão (n = 3)..... 62

Figura 9: Expressão relativa dos genes de biossíntese da parede celular *MdFLA2*, *MdGAUT* e *MdUDP* do clone de maçãs 'Gala' 'Maxigala', tratados e não tratados com 1-MCP e armazenados por 180 dias sob atmosfera refrigerada (AR), seguidos de sete dias de armazenamento temperatura ambiente a 25 °C. (a) Colheita do ano de 2014 e (b) Colheita do ano de 2016. Os resultados são representados em média e \pm desvio padrão (n = 3). Para os cálculos de quantificação relativa, foram utilizados resultados dos frutos do momento da colheita + 7 dias TA com normalizador. Os resultados dos gráficos foram expressos em log 2..... 63

Figura 10: Expressão relativa dos genes de degradação da parede celular *MdAF3*, *MdBXL1* e *MdEXGT* do clone de maçãs 'Gala' 'Maxigala', tratados e não tratados com 1-MCP e armazenados por 180 dias sob atmosfera refrigerada (AR), seguidos de sete dias de armazenamento temperatura ambiente a 25 °C. (a) Colheita do ano de 2014 e (b) Colheita do ano de 2016. Os resultados são representados em média e \pm desvio padrão (n = 3). Para os cálculos de quantificação relativa, foram utilizados resultados dos frutos do momento da colheita + 7 dias TA com normalizador. Os resultados dos gráficos foram expressos em log 2 65

Figura 11: Expressão de transcritos em maçãs 'Gala' em duas safras. Os frutos com e sem tratamento com 1-MCP foram armazenados por 180 dias sob atmosfera refrigerada (AR) e controlada (AC) seguida de exposição à temperatura ambiente, por sete dias. (a) e (c) representam a expressão dos genes que codificam para enzimas relacionadas a biossíntese da parede celular. b) e d) transcritos relacionados a de degradação da parede celular. Os resultados são representados em média e \pm desvio padrão (n = 3). Para os cálculos de quantificação relativa, foram utilizados resultados dos frutos do momento da colheita + 7 dias TA com normalizador. Os resultados dos gráficos foram expressos em log 2 71

Figura 12: Teores de pectina em maçãs 'Gala' tratadas e não tratadas MCP e armazenadas por 180 dias sob atmosfera refrigerada (AR). Os resultados são representados em média e \pm desvio padrão (n = 3). Médias acompanhadas de mesma letra maiúscula não se diferenciaram entre si pelo teste t ($p \leq 0.05$) e comparam entre si frutos controles (não tratados com 1-MCP) e frutos tratados com 1-MCP. Médias acompanhadas de mesma letra minúscula não se diferenciaram entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$) entre os dias de armazenamento. 69

Figura 13: Teores de pectina em maçãs 'Gala' tratadas e não tratadas com 1-MCP e armazenadas por 180 dias sob atmosfera refrigerada (AR). Os resultados são representados em média e \pm desvio padrão (n = 3). Médias acompanhadas de mesma letra maiúscula não se diferenciaram entre si pelo teste t ($p \leq 0.05$) e comparam entre si frutos controles (não tratados com 1-MCP) e frutos tratados com 1-MCP. Médias acompanhadas de mesma letra minúscula não se diferenciaram entre si pelo teste t ($p \leq 0.05$) entre os dias de armazenamento. 69

Lista de Tabelas

- Tabela 1:** Primers utilizados para análise em RT-qPCR. O ID corresponde ao genoma Malus x domestica v.1.0. As sequências iniciadoras reversas são dadas de 5' a 3' 53
- Tabela 2:** Eficiência dos primers utilizados para validação por RT-qPCR 55
- Tabela 3:** Efeito do tratamento 1-MCP e do armazenamento sob atmosfera refrigerada e controlada, mais 7 dias em TA, sob as características físico-químicas de maçãs 'Gala' 62
- Tabela 4:** Açúcares analisados por CG-MS 70
- Tabela 5:** Caracterização de açúcares (mg de açúcar/ g de maçã seca) por cromatografia gasosa (CG-MS) em polpa de maçãs armazenadas por 180 dias em AR 71
- Tabela 6:** Concentração de açúcares (mg de açúcar/ g de maçã seca) presentes na polpa de maçãs armazenadas por 180 dia em atmosfera refrigerada (AR) e atmosfera controlada (AC) 73

Lista de Abreviaturas

1-MCP	1-metilciclopropeno
AC	Atmosfera controlada
ACC	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
ACO	ACC oxidase
ACS	ACC sintase
AD	Atmosfera dinâmica
ANOVA	Análise de variância
AR	Atmosfera refrigerada
AF3	Gene que codifica para proteína –L- α -arabinofuranosidase 3
AT	Acidez titulável
BXL1	Gene que codifica para proteína β -xilosidase
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CH3	Família glicosil hidrolase 3
CH51	Família glicosil hidrolase 51
CG	Cromatografia gasosa
COBRA	Gene que codifica para proteína <i>glycosylphosphatidylinositol-anchored</i>
CT	<i>Cycle threshold</i>
CTR1	<i>Constitutive triple response 1</i>
cv.	Variedade
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIN2	<i>Ethylene-insensitive 2</i>
EIN3	<i>Ethylene-insensitive 3</i>
EGase	Endo-1,4- β -glucanase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
ERF1	<i>Ethylene –response fator 1</i>
ERS1	<i>Ethylene –response sensor 1</i>
ETRs	Receptores do etileno
ETR1	<i>Ethylene–response 1</i>
EXGT	Gene que codifica para proteína xyloglucantransferase
EXP	Expansina
EXP4	Gene que codifica para proteína Expansina 4
F	<i>Forward</i>
FADs	Desaturase de ácidos graxos

FLA2	Gene que codifica para proteína <i>Fasciclin-like arabinogalactan protein 2</i>
FP	Firmeza de polpa
Fru	Frutose
FT	Fatores transcricionais
F6P	Frutose-6-fosfato
GalA	Ácido galacturônico
Glc	Glicose
G6P	Glicose-6-fosfato
G1P	Glicose-1-fosfato
GAUT	Gene que codifica para proteína Galacturanosiltransferase
GO	Gene ontológico
GT	Glicosiltransferase
H1	Histona 1
HG	Homogalacturonano
MET	Metionina
<i>Md</i>	<i>Malus x domestica</i>
PDI	Gene que codifica para proteína disulfeto isomerase
PG	Poligalacturonase
pH	Potencial hidrogeniônico
PL	Pectina liase
PME	Pectina metilesterases
qPCR	Quantificação da reação em cadeia da polimerase
QR	Quantificação relativa
R	<i>Reverse</i>
R ₂	Coeficiente angular da reta
RGI	Ramnogalacturonano I
RE	Retículo endoplasmático
RGII	Ramnogalacturonano II
RNA	Ácido ribonucleico
SAM	S-adenosil metionina
SS	Sólidos solúveis
Sor	Sorbitol
Suc	Sacarose
SUS	Sacarose sintase
TA	Temperatura ambiente
UBQ	Gene que codifica para proteína ubiquitina
UDP	Gene que codifica para proteína glicose-6-fosfato

UDP-D-GLc	UDP-D-glicose
UDP-D-GLcA	UDP-D-glicurônico
UR	Unidade relativa do ar
XGA	Xilogalacturonano
XTH	Xiloglucano endotransglicosidase/hidrolase
α -AF	α -arabinofuranosidase
β -GAL	β -galacturonase

Lista de Siglas e unidades de medida

±	Mais ou menos
~	Aproximadamente
%	Percentual
A	Letra grega alfa
B	Letra grega beta
+	Mais
-	Menos
°C	Graus celsius
µL	Microlitros
S	Segundos
Min	Minutos
H	Horas
L	Litros
D	Dias
M	Metros
G	Gramas
Rpm	Rotação por minutos
Ppm	Partes por milhão
Kg	Quilograma
kPa	Kilopascal
Mg	Miligramas
mL	Mililitros
Mm	Milímetro
µm	Micrômetro
µL	Microlitro
Cmol	Concentração molar
mM	Milimolar
N	Newton
M	Molar
Nm	Nanômetros
meq.	Miliequivalente

Sumário

1.	Introdução.....	23
2.	Objetivos.....	26
2.1	Objetivo Geral	26
2.2	Objetivos Específicos	26
3.	Revisão da literatura	27
3.1	Maçã	27
3.2	Armazenamento	28
3.3	Etileno	32
3.4	Parede celular	35
3.5	Genes responsáveis pela biossíntese da parede celular	39
3.6	Genes responsáveis pela degradação da parede celular	42
3.7	Açúcares	45
4.	Materiais e Métodos.....	47
4.1	Maçãs e aplicação do 1-MCP	47
4.2	Armazenamento dos frutos	47
4.3	Análises físico-químicas.....	48
4.4	Perfil de transcritos da parede celular por RT-qPCR	49
4.5	Extração e quantificação de pectina	56
4.6	Extração de açúcares.....	57
4.7	Quantificação dos açúcares por CG-EM.....	58
4.8	Análise estatística	59
5.	Resultados.....	59
5.1	Características físico-químicas gerais das maçãs	59

5.2	Transcritos relacionados a parede celular de maçãs em 180 dias de armazenamento mais 7 dias em TA.....	62
5.3	Sacarídeos	68
6.	Discussão	74
6.1	Características físico-químicas gerais das maçãs	74
6.2	Transcritos relacionados à parede celular de maçãs em 180 dias de armazenamento mais 7 dias em TA.....	75
6.3	Sacarídeos	78
7.	Considerações finais.....	79
8.	Referências bibliográficas.....	80

1. Introdução

Existem mais de 7500 cultivares de macieira (*Malus x domestica*, Rosaceae) amplamente cultivadas em regiões de clima temperado (BAPAT et al., 2010; SILVA et al., 2019). A produção mundial está estimada em mais de 58 milhões de toneladas e a China é o país com a maior produção de maçã, representando pouco mais de 49% do total da produção mundial (FAO, 2017; ZHANG et al., 2018). A cultivar Gala e seus clones têm uma elevada aceitação em virtude das suas qualidades sensoriais, como alta firmeza de polpa, crocância, suculência, coloração mais avermelhada na epiderme e sabor adocicado levemente ácido (ALBERTI et al., 2016; BRACKMANN et al., 2008; THEWES et al., 2015a). Durante a pós-colheita o fruto *in natura* está suscetível a várias alterações fisiológicas, principalmente aquelas que estão relacionadas com o amadurecimento do fruto, como alterações na firmeza de polpa que afetam diretamente as características sensoriais da maçã (COSTA et al., 2008; LOUGHI et al., 2013). O ponto de maturação é um aspecto importante no momento da colheita para evitar e/ou reduzir alterações na pós-colheita (ALBERTI et al., 2016). Segundo GIRARDI et al. (2004), as maçãs 'Gala' devem ser colhidas com uma firmeza de polpa entre 75,5 e 84,5N, o teor de sólidos solúveis superior a 11 °Brix e uma acidez titulável entre 5,2 e 6,0 cmol.L⁻¹.

A maçã por ser um fruto climatérico apresenta elevada produção de etileno na pós-colheita e para prolongar a manutenção de seus atributos de qualidade, os frutos têm sido predominantemente armazenados sob atmosfera refrigerada (AR), ou atmosfera controlada (AC) ou atmosfera dinâmica (AD) (GWANPUA et al., 2014; MAZZURANA et al., 2016). O emprego de AC associada à refrigeração tem se mostrado eficiente na conservação de maçãs, pois o uso de baixas concentrações de O₂ com concentrações mais elevadas de CO₂ favorece a redução da respiração e da

produção de etileno, proporcionando aos frutos uma maior preservação da firmeza de polpa em comparação a AR (BRACKMANN et al., 2005, BRACKMANN et al., 2010; GWANPUA et al., 2014; MAZZURANA et al., 2016). Essas tecnologias de conservação têm sido normalmente aplicadas em combinação com 1-metilciclopropeno (1-MCP), um potente inibidor da ação do fito-hormônio etileno, o qual potencializa e prolonga o tempo de armazenamento dos frutos, principalmente por limitar as reações etileno-dependentes como a redução na firmeza dos frutos (ARGENTA et al., 2001; BRACKMANN et al., 2010; THEWES et al., 2015b).

A alteração de firmeza de polpa é uma das principais mudanças que ocorrem durante o amadurecimento de maçãs, e sua redução, após a colheita, pode estar relacionada com modificações nas estruturas que compõe a parede celular do fruto (GWANPUA et al., 2014). A parede celular de maçãs, assim como a de outros frutos, é uma estrutura complexa composta por uma rede de hemiceluloses ligadas a microfibrilas de celulose, que estão incorporadas numa matriz de polissacarídeos compostos por pectina e glicoproteínas (ATMODJO et al., 2011; GOULÃO et al 2007). A modificação da parede celular durante o amadurecimento é coordenada por uma série de enzimas hidrolíticas (NG et al., 2013, 2015).

Os dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos da parede celular são sintetizados pelas glicosiltransferases (GT), que são uma grande família de enzimas que catalisam a transferência de moléculas de açúcar para formação de ligações glicosídicas (TEMPLE et al., 2016). Dentre as GT relacionadas aos sacarídeos de parede se destacam as galacturonosiltransferases (GAUTs) que, juntamente com a UDP-glicose desidrogenase, são responsáveis pela biossíntese da pectina. As enzimas arabinogalactanas (FLAs), são glicoproteínas de superfície celular, e podem estar relacionadas com o início da síntese de celulose da parede secundária (MACMILLAN et al., 2010; SEIFERT & ROBERTS, 2007).

Os genes de biossíntese de parede estão ativos nas primeiras fases do desenvolvimento do fruto; no entanto, durante a pós-colheita ainda não está bem esclarecido o que acontece com estes genes. Evidências indicam que esses genes são pouco expressos ou inibidos, enquanto que os genes que codificam para enzimas responsáveis pela degradação e expansão da parede celular como poligalacturonases, β -galactosidases, pectatolases, arabinofuranosidases, pectina metilesterases e expansinas, passam a atuar de forma intensa (CAO et al., 2012; GWANPUA et al., 2014, 2016; LOUGHI et al., 2013; SMITH et al., 1990; VELASCO et al., 2010). Desse modo, a manutenção da firmeza de polpa parece estar associada à inibição das enzimas de degradação da parede celular. No entanto, é possível que genes codificadores de enzimas envolvidas na biossíntese de polissacarídeos de parede também atuem na preservação e manutenção da textura da maçã em resposta à aplicação de 1-MCP sob armazenamento refrigerado. Contudo, não há estudos com foco no efeito dos referidos tratamentos no metabolismo biossintético de açúcares de parede celular.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar e compreender o metabolismo de maçãs cv. Gala durante armazenamento em duas atmosferas (refrigerada e controlada) na presença ou ausência do 1-MCP, através de análises físico-químicas e transcricionais.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar o comportamento transcricional dos genes *MdFLA2*, *MdGAUT9*, *MdUDP*, *MdBXL1*, *MdAF3* e *MdEXGT*, durante o armazenamento em atmosfera refrigerada e controlada, na presença do 1-MCP. E verificar a relação desses genes com a manutenção ou progressão do amadurecimento de maçãs cv. Gala.

Quantificar o teor de pectina e mono e dissacarídeos presentes nas maçãs cv. Gala. E verificar se a redução do polímero de pectina e o aumento dos açúcares simples tem uma relação com os genes estudados.

3. Revisão da literatura

3.1 Maçã

A macieira (*Malus x domestica*), pertencente à família *Rosaceae*, é uma das fruteiras mais produzidas e é cultivada principalmente em regiões com clima temperado (FAO, 2017; SILVA et al., 2019). No Brasil o cultivo de maçã tem menos de 50 anos e teve início em Fraiburgo, Santa Catarina com mudas vindas da França (ABPM, 2016). Segundo a Associação Brasileira de Produtores de Maçãs, em 2018 a produção anual no Brasil foi de 1,1 milhão de toneladas, concentradas nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul que contribuem com 95% do total da produção nacional (THEWES et al., 2015a).

As principais variedades de maçãs produzidas no Brasil são a Gala, a Fuji, Golden Delicious e a Granny Smit, além de suas mutações. Sendo que a cultivar Gala e seus clones (Galaxy, Imperial Maxigala, Royal Gala, etc.) representam mais de 40% da produção nacional (AMARANTE et al., 2010; THEWES et al., 2015b). Esta cultivar de maçã apresenta forma arredondada, pouco cônica, listras vermelhas claras sobre fundo de cor creme a amarelo claro polpa com alta firmeza, alto teor de sólidos solúveis, leve acidez e possui calibre médio, em torno de 135 gramas (BRACKMANN et al., 2008; CORRENT et al., 2004; THEWES et al., 2015a).

3.2 Armazenamento

Com a alta produção de maçã em um curto período do ano, praticamente toda a colheita ocorre nos primeiros 4 meses do ano, sendo necessário o uso do armazenamento pós-colheita para disponibilizar ao mercado consumidor um produto de qualidade com alta firmeza de polpa ao longo do ano (BRACKMANN et al. 2008; GIRADI et al. 2004; SCOLARO et al., 2015). A redução da temperatura durante o armazenamento é fundamental para a conservação das qualidades físicas e químicas dos frutos e na prevenção ou na diminuição da incidência de doenças (BRACKMANN et al. 2010; MOURA et al., 2011). As baixas temperaturas minimizam os processos metabólicos, principalmente a respiração dos frutos, retardando o amadurecimento, resultando em maior período de conservação (BRACKMANN et al., 2008). No entanto, o armazenamento refrigerado por longos períodos pode ocasionar o aparecimento de distúrbios fisiológicos como a farinosidade (STORCH et al., 2015).

O armazenamento dos frutos em diferentes atmosferas, como refrigerada (AR), controlada (AC) e a dinâmica (AD), juntamente com o tratamento com 1-metilciclopropeno, ajudam a estender a vida útil dos frutos na pós-colheita (KITTEMANN et al 2015). O AR reduz a velocidade dos processos metabólicos dos frutos, reduzindo também a incidência de distúrbios fisiológicos (SHAFIQ et al., 2011). Temperaturas de armazenamento entre 0 e 1°C tem sido recomendadas como ideais para a maioria das cultivares de maçãs, incluindo Gala, Golden Delicious, Red Delicious e Fuji (MAZZURANA et al., 2016). No entanto, a utilização de AR para conservação de maçãs é eficiente apenas por um curto período de tempo (três a quatro meses), uma vez que com o passar do tempo o fruto começa a perder firmeza de polpa e suculência, levando a formação de textura farinhenta (BULENS et al., 2012; MAZZURANA et al., 2016). Estas alterações

devem-se ao enfraquecimento da parede celular, o que também torna os frutos mais suscetíveis a podridões e distúrbios fisiológicos (MOURA et al., 2011).

Neste contexto, outros métodos de armazenamento têm sido utilizados para ampliar o período de conservação e prolongar a vida útil dos frutos (THEWES et al., 2015a). O uso de AC associada a refrigeração é uma alternativa eficiente na conservação de maçãs, pois reduz em até 50% a respiração dos frutos e também diminui a biossíntese de etileno e os danos fisiológicos causados pelas baixas temperaturas, que são ocasionados durante armazenamentos prolongados (BRACKMANN et al., 2005, MAZZURANA et al., 2016). A AC se baseia no controle dos gases, oxigênio e gás carbônico presentes no interior da câmara, combinados com baixa temperatura e alta umidade (BRACKMANN et al., 2010).

A baixa concentração de oxigênio reduz os processos oxidativos da polpa e principalmente os relacionados a biossíntese do etileno, pois reduz a atividade da ACC oxidase (BRACKMANN et al., 2005; HO et al., 2013). A alta concentração de gás carbônico reduz a atividade da ACC sintase e de enzimas chave do ciclo de Krebs, particularmente a succinato desidrogenase, reduzindo assim a atividade respiratória (HO et al., 2013). Por isso, o controle desses gases nas concentrações ideais, é importante na regulação do avanço da maturação dos frutos durante o período de armazenamento (AMARANTE et al., 2010; BRACKMANN et al., 2010; GWANPUA et al., 2014; MAZZURANA et al., 2016).

As condições do armazenamento em AC podem variar em função da cultivar de maçã, local de cultivo e ano de colheita (BULENS et al., 2011; BRACKMANN et al., 2008). Estudos mostram que temperaturas entre 0 e 2°C em condições de baixa (1,5 kPa) ou ultrabaixa (0,7-1,0 kPa) pressão de O₂ não resultam em perdas significativas de firmeza de polpa. No entanto,

quando a pressão é de 1-3 kPa de O₂ e de 3-4 kPa de CO₂, é observada perda de sabor nos frutos após quatro meses de armazenamento (BRACKMANN et al., 1995; 2000; SAQUET et al., 1997). Além do controle da pressão dos gases e da temperatura, é possível utilizar outras tecnologias para a manutenção dos parâmetros fisiológicos do fruto, como o uso de compostos inibidores da resposta do etileno (GUNES et al., 2000; NOCK & WATKINS, 2012; VILLALOBOS-ACUÑA et al., 2011). Neste contexto, destaca-se o 1-metilciclopropeno (1-MCP), que possui uma estrutura semelhante ao etileno e desta forma, liga-se aos receptores do etileno localizados nas membranas do retículo endoplasmático, impedindo a ligação do fito-hormônio aos receptores. Com a inibição do estímulo fisiológico e da transdução de sinal para a síntese de enzimas que atuam nos processos bioquímicos característicos do amadurecimento, a degradação da parede celular e a quebra da clorofila serão inibidas (ARGENTA et al., 2001; BRACKMANN et al., 2010; THEWES et al., 2015b). A aplicação do 1-MCP ocorre logo após a colheita, através da diluição do 1-MCP em água, o qual volatiliza tanto em temperatura ambiente como sob refrigeração. A concentração de 1-MCP utilizada depende do volume da câmara onde os frutos ficarão armazenados. O recipiente contendo o 1-MCP diluído em água é então mantido juntamente com as maçãs durante o período de 24h, conforme recomendação do fabricante do produto (AgroFresh, 2016; DeEll et al., 2016).

Mazzurana et al. (2016) demonstraram que o armazenamento em AC com níveis baixos de oxigênio em conjunto com 1-MCP pode resultar na manutenção da qualidade dos frutos. No entanto, a aplicação de concentrações muito baixas de oxigênio pode afetar o armazenamento quando ele for muito prolongado, proporcionando a ocorrência de distúrbios fisiológicos tais como rachaduras na epiderme, desenvolvimento de degenerescência causada pelo CO₂, escurecimento da polpa, podridões e a formação de etanol como produto dos processos fermentativos

(BRACKMANN et al., 2012; DeEll et al., 2016). De maneira geral, têm se verificado que maçãs cv. Gala tratadas com 1-MCP conservam-se bem com níveis de 1,2-1,8 kPa O₂ e 2,0-2,5 kPa CO₂ (BRACKMANN et al., 2010; MAZZURANA et al., 2016).

A resposta de maçãs frente ao tratamento com 1-MCP pode ser afetada por vários fatores, incluindo o tipo de cultivar, a temperatura e o tempo de exposição dos frutos ao inibidor do etileno após a colheita (DeEll et al., 2016). O ponto de maturação também é um fator importante em relação à eficácia da ação do 1-MCP. Segundo Brackmann et al. (2010), em países como o Brasil em que as empresas apresentam grandes áreas de plantio de maçã, é difícil efetuar a colheita de todos os frutos com maturação adequada e uniforme. Com isso, muitos frutos são colhidos em estágio bastante avançado de maturação, o que dificulta e afeta diretamente o processo de resfriamento dos frutos e a ação do inibidor do etileno dentro das câmaras de armazenamento.

3.3 Etileno

No século XIX a queima do carvão era muito utilizada, pois a combustão parcial do carvão produzia um gás chamado de *coal gas* utilizado como fonte de iluminação (CHAVES et al., 2006). Em 1864, Girardin verificou que as árvores que estavam próximas de luminárias com o gás de iluminação apresentavam sintomas de senescência (CHAVES et al., 2006). E por um longo tempo o gás de iluminação foi apontado como o responsável por acelerar as propriedades fisiológicas que levam a senescência das plantas (CHAVES et al., 2006). Em 1886, Dimitry Neljubov descobriu que o etileno presente no gás de iluminação era o responsável pela inibição do crescimento de caule e raízes, abscisão foliar, aceleração do crescimento e da senescência em plantas (CHANG, 2016). Em 1934, Richard Gane descobriu que as plantas também biosintetizam a molécula de etileno (CHANG, 2016).

O etileno é um hidrocarboneto (C_2H_4) gasoso nas condições ambientes que é amplamente produzido e utilizado na fabricação de inúmeros produtos, como borracha, plásticos, tintas, detergentes e brinquedos (CHANG, 2016). Nas plantas o etileno regula numerosos processos de desenvolvimento e respostas de estresse a fatores bióticos e abióticos (JU et al., 2015; YANG et al., 2013). Pode ser produzido em quase todas as partes da planta, e em elevadas concentrações na fase de abscisão foliar, senescência floral, bem como durante o amadurecimento de muitos frutos, especialmente os climatéricos (LI et al., 2011). O etileno influencia o crescimento e desenvolvimento das plantas, a germinação de sementes, a produção de raízes, a expansão das folhas, o desenvolvimento de flores e a determinação do sexo (JU et al., 2015).

Existem dois sistemas envolvidos na biossíntese do etileno. O primeiro sistema atua durante o crescimento vegetativo normal, e é responsável pela

produção de níveis basais de etileno sintetizado por todos os tecidos vegetais, incluindo frutos não climatéricos. O segundo sistema funciona durante a fase de amadurecimento em fruto climatérico, e é marcado pela produção autocatalítica de etileno, resultando em elevada concentração do fitohormônio (BAPAT et al., 2010; BULENS et al., 2012). O aumento da síntese de etileno é um processo fisiológico crítico, o qual é determinante na velocidade da maturação e senescência dos frutos após a colheita (LI et al., 2012; YANG et al., 2013). A taxa de síntese do etileno é baixa no período que antecede o climatério, mas um aumento acentuado de sua produção ocorre com o início da maturação (BULENS et al., 2012; SHANGGUAN, et al., 2014). A biossíntese do etileno ocorre através da conversão da L-metionina (MET) a s-adenosil metionina (SAM) e então a ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), que é convertido a etileno em presença de O₂. Neste processo destaca-se a atuação de duas enzimas chave, ACC sintase (ACS) e ACC oxidase (ACO), que são codificadas por famílias multigênicas expressas diferencialmente, e que catalisam, respectivamente, a conversão de SAM a ACC e a oxidação do ACC a etileno (Figura 1) (LI et al., 2011).

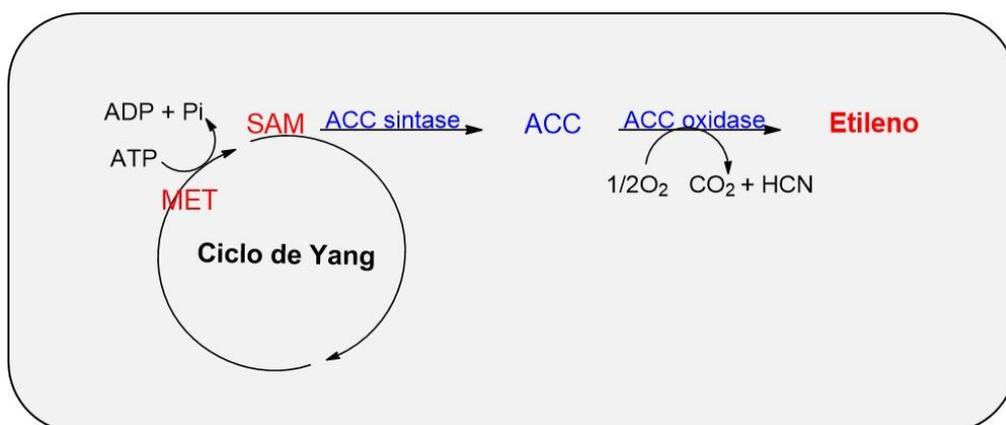


Figura 1: Via biosintética do etileno em duas etapas nas plantas. Na primeira etapa SAM é produzido a partir da L-metionina (MET) no “ciclo Yang” e convertido em ACC pela enzima ACC sintase. Na segunda etapa, o ACC é convertido em etileno pela enzima ACC oxidase.

Fonte: Adaptado de CHANG, 2016.

Uma vez que a conversão de ACC em etileno só ocorre em presença de O₂, em condições anaeróbicas a formação do fito-hormônio é completamente suprimida. Deste modo, o ACC sintetizado pode ser convertido a N-malonil ACC pela ação da N-maloniltransferase (BULENS et al., 2012).

A maçã é um fruto climatérico e, como tal, apresenta um aumento significativo na respiração e na produção de etileno durante a maturação (JOHNSTOS et al., 2002; YANG et al., 2013). A regulação da biossíntese de etileno é autocatalítica e mediada pela ligação do etileno com receptores ETRs (*ETHYLENE RECEPTORS*) que desencadeiam uma cascata de sinalização até a ativação de fatores de resposta ao etileno ERFs (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR*) e ERSs (*ETHYLENE RESPONSE SENSOR*) que ativam genes de resposta, desencadeando alterações fisiológicas, como o amolecimento da polpa, a produção de compostos voláteis e a própria produção de etileno (BAPAT et al., 2010; CHIRIBOGA et al., 2012; JU e CHANG, 2015). Se os receptores são bloqueados, conseqüentemente a cascata de sinalização é bloqueada, impedindo que os eventos dependentes do etileno ocorram (CHIRIBOGA et al., 2012). Um inibidor bastante eficiente da ação do etileno é o 1-metilciclopropeno (1-MCP). O 1-MCP se liga aos receptores do etileno, os quais permanecem em estado inativo, resultando na inibição da percepção ao fito-hormônio e, deste modo, na prevenção de respostas dependentes de etileno (BULENS et al., 2012). No entanto, a ação do 1-MCP é temporária, pois com o tempo o fruto tratado com 1-MCP sintetiza novos receptores restaurando a ação do etileno, principalmente durante o *shelf-life*, período em que o fruto se encontra exposto em condições comerciais à temperatura ambiente (CHIRIBOGA et al., 2012). Desta forma, o efeito do 1-MCP consiste em provocar um atraso na entrada do pico climatérico nos frutos (CHIRIBOGA et al., 2012).

3.4 Parede celular

A parede celular de maçãs, assim como de outros frutos é altamente complexa e dinâmica, composta por uma rede de hemiceluloses ligadas a microfibrilas de celulose, que estão incorporadas numa matriz de polissacarídeos de pectina e outros componentes menos abundantes, como compostos fenólicos, proteínas estruturais e enzimas (**Figura 2**) (GOULÃO et al 2007; GWANPUA et al., 2014).

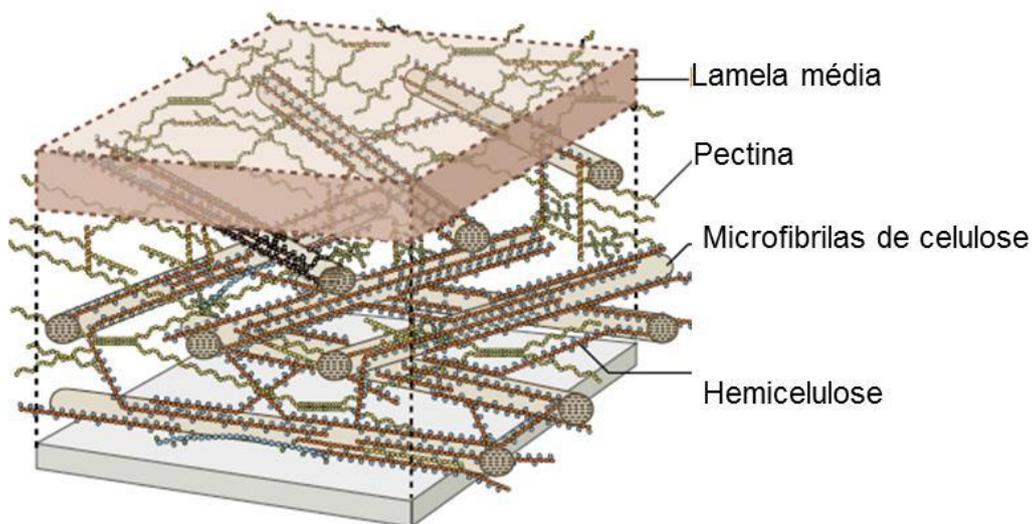


Figura 2: Representação estrutural da parede celular de frutos: Microfibrilas de celulose interligadas numa rede de hemicelulose (compostos de xiloglicanos, glucuronoarabinoxilano, glicomanano e (1→3), (1→4) β-D-glicano), que estão incorporadas numa matriz de pectina (compostos de homogalacturonano, xilogalacturonano, ramnogalacturonano I e ramnogalacturonano II).

Fonte: Adaptado de CARPITA et al., 2015.

A celulose forma o esqueleto básico das células vegetais e sua estrutura filamentosa e altamente resistente confere rigidez à parede celular. A celulose é um polissacarídeo composto por unidades monoméricas de glicose que estão ligadas entre si por ligações beta 1→4 (CHEN et al., 2014).

A hemicelulose é uma classe diversificada de polissacarídeos que inclui xilanos, xiloglicanos, mananos, arabinoxilanos e glicomananos. Dentre estes os xiloglicanos se destacam, pois cobrem e reticulam as microfibrilas de celulose através de ligações não-covalentes permitindo que elas fiquem ancoradas umas nas outras (BETHKE et al., 2016; BRUMMELL et al., 1999).

Os xiloglicanos têm sua estrutura principal composta por ligações β -D-1,4-glicose com ramificações laterais de moléculas de xilose, galactose e fucose (JUNIOR et al., 2006). A principal função dos xiloglicanos é a de coordenar a disposição das microfibrilas de celulose na parede celular vegetal (JUNIOR et al., 2006). Os arabinoxilanos possuem um esqueleto principal de β -D-1,4-xilano ramificados com moléculas de arabinose. Mananos são caracterizados por ter um esqueleto central de β -D-1,4-manose que também podem estar ligados a outros resíduos de monossacarídeos, tais como a β -D-1,4-glicose (LIAOTRAKOON et al., 2013).

A pectina é um polissacarídeo formado por monômeros de ácido galacturônico unidos entre si por ligações glicosídicas (Figura 3). A matriz de pectina é responsável pela manutenção da integridade da parede celular juntamente com as estruturas de celulose e microfibrilas (VICENTE et al., 2007). A pectina é o polissacarídeo da parede celular mais complexo estruturalmente, que requer pelo menos 67 enzimas da família das transferases para sua biossíntese e aproximadamente 16 tipos de monossacarídeos, dos quais o ácido galacturônico (GalA) é o mais abundante (~ 70%), seguido pela D-galactose e L-arabinose (ATMODJO et al., 2011; LIAOTRAKOON et al., 2013; STERLING et al., 2006; YAPO, 2011).

Os polissacarídeos que compõem a pectina são divididos em quatro grupos independentes, mas que interagem entre si. São eles: homogalacturonano (HG), xilogalacturonano (XGA), ramnogalacturonano II (RG-II) e ramnogalacturonano I (RG-I), como é ilustrado na **Figura 3** (BRUMMELL et al., 1999; GODOY et al., 2013).

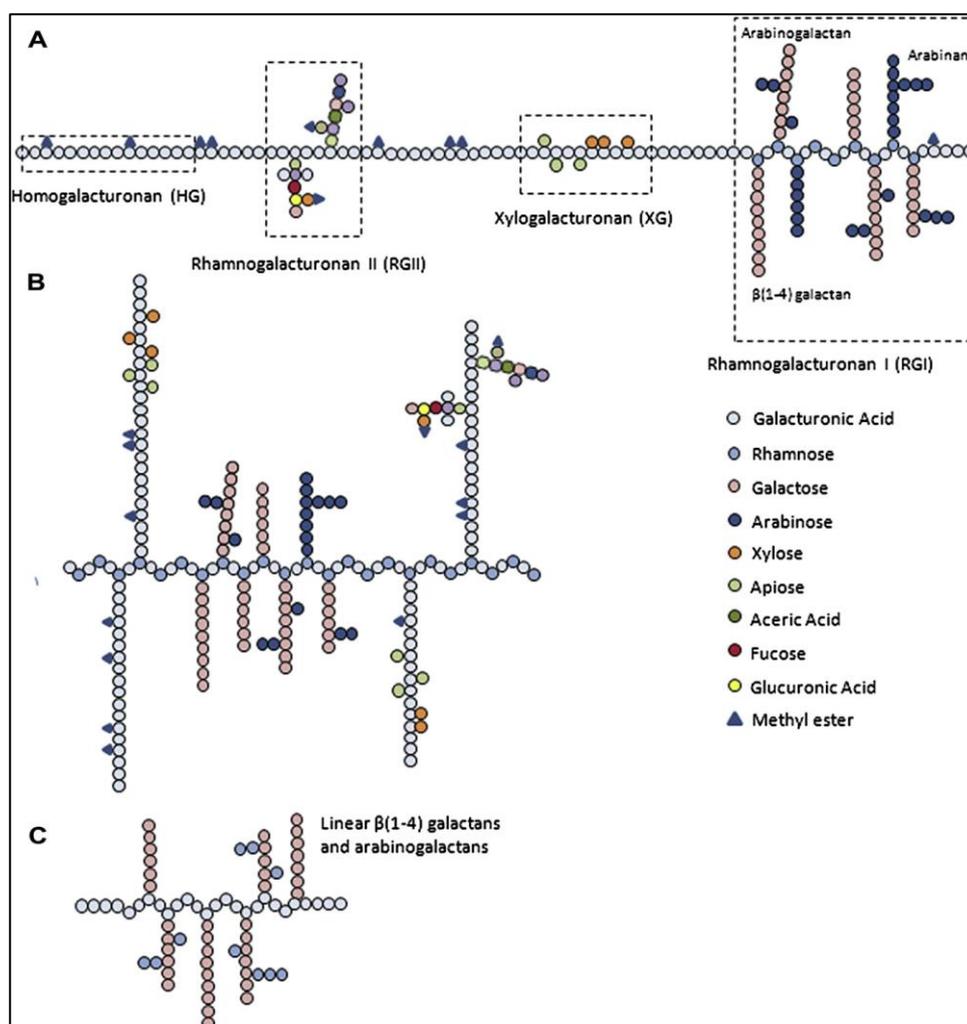


Figura 3: Esquema das estruturas de polissacarídeos da pectina. (A) – forma tradicional em que a pectina é encontrada. (B) - representa uma modificação onde HG encontra-se como cadeias laterais do RGI. (C) - modificação na estrutura do RGI em meio alcalino a espinha.

Fonte: MAXWELL et al., 2012.

HG é um polímero linear conhecido como "região lisa" da pectina, e é composto por ligações entre α -D-1,4-GalA ligadas a resíduos de galacturonanos. O HG é parcialmente metil esterificado no carbono 6 (C6), podendo também ser O-acetilado em C2 e C3. Também cabe destacar que entre as quatro macromoléculas que compõem a pectina o HG é a mais abundante (~ 65%) (LIAOTRAKOON et al., 2013; BETHKE et al., 2016). XGA é um HG com ramificações de xilose na cadeia lateral, que estão ligadas na posição O-3 em resíduos do ácido galacturônico. O RG-II é uma estrutura muito complexa que tem como esqueleto central o HG ligado a cadeias laterais compostas por 12 diferentes resíduos de glicosil e aproximadamente 30 moléculas de açúcares individuais que podem estar interligados por mais de 20 ligações glicosídicas diferentes, resultando em macromoléculas (YAPO, 2011). Dentre os açúcares presentes no RG-II destacam-se arabinose, ramnose, galactose, xilose e fucose (BETHKE et al., 2016). O RG-I é o único polissacarídeo da pectina cuja estrutura principal não é exclusivamente composta de ácido galacturônico, mas também pelo dissacarídeo (α -D-1,4-GalA e α -L-1,2-Rha) com resíduos de L-ramnose e galactose (LIAOTRAKOON et al., 2013). O RG-I possui cadeias laterais de arabinano, galactano, e arabinogalactano que são altamente ramificadas por moléculas de açúcares como α -L-arabinose e β -D-galactose (GODOY et al., 2013; MAXWELL et al., 2012). Resíduos de GalA do RG-I podem ser O-acetilados no C3 e/ou no C2. De um modo geral a estrutura da pectina é o RG-I, RG-II e XGA ligados covalentemente a espinha central do HG (YOPA, 2011). A estrutura da pectina descrita acima é ilustrada na **Figura 3A**. A **Figura 3B** e **3C** mostram outros rearranjos que a pectina pode apresentar.

A pectina apresenta múltiplas funções no crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo funções de resistência a doenças, adesão celular (lamela média), além de apresentar características como porosidade, alongamento e limitação da flexibilidade na parede celular

(ATMODJO et al., 2011). A pectina fornece suporte estrutural para a parede primária, e também influencia na formação da parede secundária através das moléculas sinalizadoras de oligossacarídeos (ATMODJO et al., 2011).

3.5 Genes responsáveis pela biossíntese da parede celular

A formação da parede celular nos frutos ocorre após a antese, entre as fases de divisão e expansão celular (NG et al., 2015). À medida que as células se expandem o fruto aumenta de tamanho, e esse processo é coordenado por uma série de enzimas (NG et al., 2013). Os dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos da parede celular são sintetizados por glicosiltransferases (GT), que são enzimas que catalisam a transferência de moléculas de açúcar para um acceptor específico formando ligações glicosídicas (TEMPLE et al., 2016). Segundo Uehara et al. (2017), são necessárias 50 GT para a biossíntese da pectina. Estas enzimas participam da via secretora do retículo endoplasmático e atuam na N-glicosilação de glicoproteínas no Golgi, que é onde ocorre a biossíntese de hemicelulose e pectina (TEMPLE et al., 2016).

Os polissacarídeos que compõem a hemicelulose e a pectina são formados no complexo de Golgi e transportados para a parede celular, onde são remodelados, utilizando UDP-glicose como substrato doador (Figura 4), para formação de redes interligando as microfibrilas de celulose (REBOUL et al., 2011). A UDP-glicose desidrogenase converte UDP-D-Glicose (UDP-D-Glc) à ácido UDP-glucurônico (UDP-D-GlcA) (Figura 4) (REBOUL et al., 2011; BETHKE et al., 2016). Um estudo com *Arabidopsis* demonstrou que o UDP-DGlcA é um precursor importante na síntese de arabinose, xilose, ácido galacturônico e resíduos de apiose, que contribuem com até 50% de biomassa de parede celular (REBOUL et al., 2011). A UDP-glicose desidrogenase também compete com a enzima sacarose-6-fosfato sintase

pelo substrato UDP-D-Glc que é liberado pela sacarose sintase (SUS), que é importante precursor na via de biossíntese de açúcares simples (REBOUL et al., 2011).

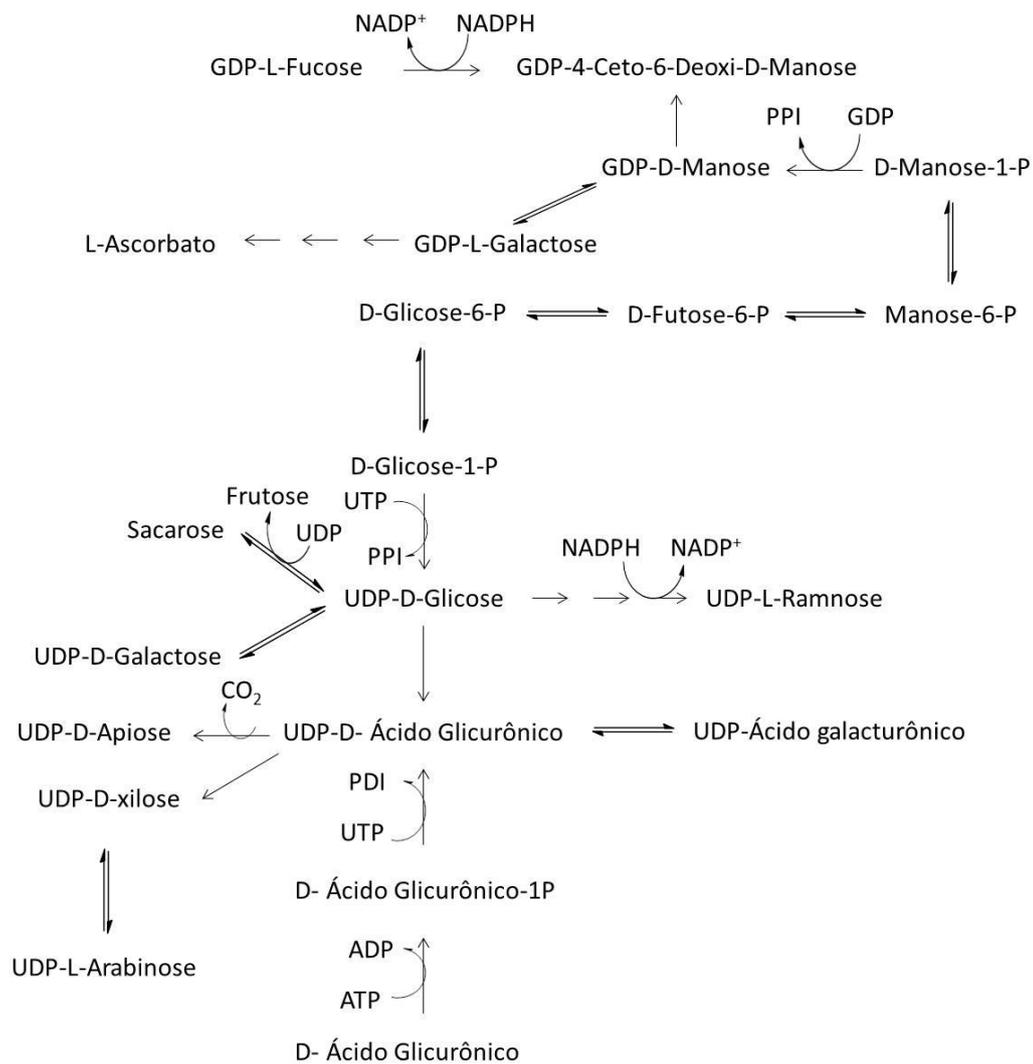


Figura 4: Rota metabólica demonstrando a via de biossíntese dos açúcares que compõem a pectina da parede celular da maçã. Fonte: MapMan 3.6.0RC1

As enzimas galacturonosiltransferases (*GAUTs*) são responsáveis pela biossíntese de pectina e pertencem a grande família das GT que juntamente com outras enzimas ativadoras de carboidratos modelam a parede celular (GODOY et al., 2013). Atmodjo et al. (2011) demonstraram que em *Arabidopsis* os genes *GAUT1* e o seu homólogo *GAUT7* codificam para enzimas responsáveis pela biossíntese do homogalacturonano, que é um constituinte importante da pectina.

As FLAs são um grupo de glicoproteínas de superfície celular que normalmente tem ancorados em sua estrutura moléculas lipídicas de glicosilfosfatidilinositol (SEIFERT & ROBERTS, 2007). As FLAs podem atuar como moduladores e receptores morfogênicos através de canais que mantêm a comunicação com o exterior da membrana plasmática; e por terem característica anfipática são considerados um dos principais mediadores no transporte de moléculas entre a parede celular, membrana plasmática e citoplasma (SEIFERT & ROBERTS, 2007). A transcrição de genes que codificam para enzimas FLAs, pode estar relacionada com o início da síntese de celulose da parede secundária (MACMILLAN et al. 2010). As glicoproteínas FLA também podem apresentar a função de adesão entre células (MACMILLAN et al. 2010).

As enzimas COBRAs fazem parte da família das glicosilfosfatidilinositol (GPI) e são proteínas ancoradas que apresentam uma região hidrofílica no centro de sua estrutura (ROUDIER et al., 2002). O gene *COBRA* é regulador chave na orientação da expansão celular e no estado de cristalinidade da celulose (NIU et al., 2015). Em um estudo realizado com tomates, o gene *SICOBRA* foi altamente expresso no desenvolvimento inicial de frutos (CAO et al., 2012). Apesar dos muitos estudos do gene *COBRA* em várias espécies de plantas, este é o primeiro relato de genes relacionados com a biossíntese de parede celular sendo ativamente expressos em frutas durante o estágio de

maturação dos frutos (BEN-TOV; KASIRAJAN; LI et al., 2018; NIU et al., 2015). Mais estudos são necessários para estabelecer quais genes estão relacionados com a montagem e a modelagem da estrutura da parede celular e qual sua relação com o avanço da maturação dos frutos após a colheita.

3.6 Genes responsáveis pela degradação da parede celular

A firmeza, a crocância e a suculência da maçã possuem relação direta com a manutenção das complexas estruturas da parede celular do fruto, que por sua vez depende das reações de síntese e degradação dos seus constituintes (GOULAO et al., 2007; GOULAO & OLIVEIRA, 2008; GWANPUA et al., 2012, 2014; PAULL et al., 1999). Embora a biossíntese da parede celular seja um evento bem compreendido, não existem estudos demonstrando se essa rota metabólica mantém-se ativa após a colheita dos frutos durante o período de armazenamento. Além das rotas de biossíntese, a degradação da parede celular também está relacionada com os eventos de amadurecimento após a colheita, principalmente a redução da textura e da firmeza de polpa (GOULAO & OLIVEIRA, 2008; GWANPUA et al., 2012).

As alterações na parede celular do fruto durante o amadurecimento indicam mudanças estruturais na pectina, hemicelulose e celulose que juntas são responsáveis pela alteração da estrutura da parede celular (PAULL et al., 1999). Durante o amadurecimento de frutos, várias enzimas modificadoras da parede celular podem fazer com que os polímeros de pectina sofram amplas modificações estruturais que ocasionam o afrouxamento da coesão entre as células.

Segundo Gwanpua et al. (2014), a perda de coesão e o afrouxamento entre as ligações da rede de pectina que cobre a hemicelulose são as

principais responsáveis pela perda de firmeza nos frutos durante o amadurecimento. Esses processos são coordenados por uma grande variedade de enzimas de parede que são etileno-dependentes, dentre elas as poligalacturonases (exo-PG EC 3.2.1.67; e endo-PG; EC 3.2.1.15) que se destacam por serem enzimas chave na degradação da parede celular em maçãs e outros frutos. As endo-PGs catalisam a clivagem hidrolítica das ligações α -1,4-galacturonano (GHIANI et al., 2011).

O processo de despolimerização da pectina tem início com a atuação das enzimas α -L-arabinofuranosidase (α -AF) e β -galacturonase (β -GAL), que degradam as cadeias laterais da pectina, composta por arabinose, xilose, galactose (Velasco et al., 2010). Dessa forma, a cadeia principal da pectina fica desprotegida para a atuação da pectina metilesterase (PME) e da PG para completarem o processo de degradação da estrutura pectínica (CAO et al., 2012; GHIANI et al., 2011; GWANPU et al., 2016; LOUGHY et al., 2013; SMITH, 1990). Outras enzimas também são importantes no processo de modificação da parede celular como, as pectato liases (PL), endo-1,4- β -glucanases (EGase), xiloglucano endotransglicosilase / hidrolases (XTH) e as expansinas (VILLARREAL et al., 2008; NOBILE et al., 2011). Goulao et al. (2007), observaram que o amolecimento de maçãs apresenta uma relação direta com a elevada expressão de EXP, PLs e pelo menos uma isoforma de β -Gal. No entanto, o silenciamento individual de cada um dos genes que codificam para essas enzimas não impediu o amolecimento do fruto (GOULAO et al., 2007).

A degradação da parede celular além de ocasionar a perda da firmeza de polpa também desencadeia o aparecimento de distúrbios fisiológicos. Em maçãs, é muito comum o distúrbio da farinosidade, que é decorrente da separação celular e a perda excessiva de suco (NOBILE et al., 2011; MAZZURANA et al., 2016). O aumento da farinosidade está relacionado a

liberação da arabinose terminal mediada por α -L-arabinofuranosidases (α -AFases; EC 3.2.1.55) que hidrolisam resíduos de arabinofuranosil não-redutores da matriz de pectina (NOBILE et al., 2011). Existem duas famílias de hidrolases glicosídicas de α -AFases, a GH3 e GH51 (TATEISHI, 2008). A atividade de α -AFase e a transcrição de *MdAF3*, que pertence à família GH3, parece estar associada com a farinosidade e o amolecimento em maçãs, sendo positivamente regulada pelo etileno (NOBILE et al., 2011; STORCH et al., 2015).

As expansinas, que são codificadas por grandes famílias multigênicas são associadas ao crescimento em muitos tecidos de plantas, incluindo folhas, raízes e o próprio fruto (BRUMMELL et al., 1999). As expansinas atuam no afrouxamento das ligações da parede celular através da quebra de ligações não-covalentes entre a matriz de hemicelulose e as microfibrilas de celulose, que provocam o enfraquecimento da estrutura péctica (COSTA et al., 2008; GWANPUA et al., 2014; TRUJILLO et al., 2012). As expansinas podem desempenhar um papel no afrouxamento entre as ligações dos polissacarídeos de parede celular em frutas facilitando a atuação de outras enzimas degradantes (TRUJILLO et al., 2012).

Durante o período de amadurecimento de tomates a alta expressão do *Exp1* está relacionada a baixa firmeza de polpa (BRUMMELL et al., 1999; ROSE et al. 1997).

3.7 Açúcares

O sabor das frutas é influenciado pelos teores de açúcares e ácidos orgânicos (LIN et al., 2015). Os açúcares solúveis, incluindo sacarose (Suc), glicose (Glc) e frutose (Fru), são conhecidos por atuar como moléculas de sinalização na regulação da expressão de muitos genes chave envolvidos nos processos metabólicos e na defesa das plantas a fatores bióticos e abióticos (LI et al., 2012). Eles também são um indicador de qualidade e maturação no momento da colheita. Os açúcares solúveis são derivados da fotossíntese nas folhas e se acumulam na polpa do fruto. Após a colheita esses compostos são catabolizados para suprir as necessidades fisiológicas do fruto na ausência das reações fotossintéticas (ZHU et al., 2013).

As plantas desenvolveram um sistema elaborado para o metabolismo de açúcares e o seu acúmulo sincronizado nas células, denominado por LI et al. (2012) como ciclo Suc-Suc. Cabe destacar, que este ciclo determina o teor e a composição dos açúcares nas frutas (ZHU et al., 2013). Neste sistema, uma vez que a Suc é transportada para o citosol das células do fruto, raiz ou para as pontas de brotação, ela é convertida em Fru e Glc pela enzima invertase neutra, ou em Fru e UDP-glicose pela enzima sacarose sintase (SUS). Além da sacarose, o sorbitol (Sor) é também carregado para o interior da célula, mas é transportado por um sistema diferente (**Figura 5**).

O Sor é absorvido pelas células do parênquima através da via transportadora do sorbitol e a Suc é transportada diretamente para células do parênquima por transportador de sacarose ligado à membrana plasmática ou é convertido em Fru e Glc no espaço da parede celular pela enzima invertase da parede celular, e depois são transportadas para as células por transportador de hexose (**Figura 5**) (ZHU et al., 2013).

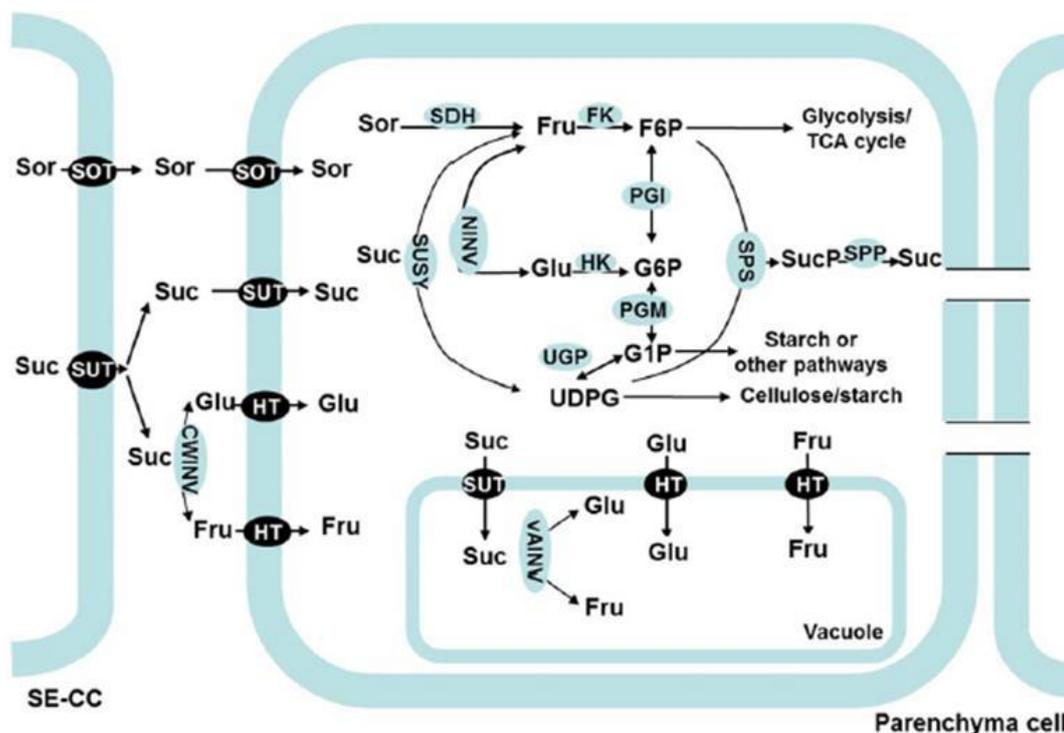


Figura 5: Esquema do metabolismo de açúcares e seu acúmulo em maçãs.

Fonte: LI et al., 2012.

No citosol da célula os resíduos de Glc e Fru são fosforilados, formando glicose-6-fosfato (G6P) e frutose-6-fosfato (F6P) por uma hexoquinase e frutoquinase, respectivamente. As interconversões entre F6P, G6P, G1P (glicose-1-fosfato) e UDP-glicose são catalisadas por fosfoglucoisomerase, fosfoglucomutase e UDP-glicose pirofosforilase. A F6P produzida atua no metabolismo dos açúcares (glicólise) para gerar energia e intermediários para outros processos. A G1P é usada para a síntese de amido e a UDP-glicose é aplicada na síntese de celulose ou pode ser combinada com a F6P para realizar novamente a síntese da Suc via sacarose fosfato sintase e sacarose-fosfatase. A Fru, Glc e Suc que não são metabolizadas, são transportadas para o vacúolo por transportadores especiais, para serem armazenadas (**Figura 5**) (LI et al., 2012).

4. Materiais e Métodos

4.1 Maçãs e aplicação do 1-MCP

Neste trabalho foram utilizadas maçãs da variedade Gala (*Malus x domestica*), clone Maxigala (porta-enxerto M9) colhidas no mês de fevereiro nos anos de 2014 e 2016, em pomar da empresa Schio Agropecuária Ltda, situada no município de Vacaria, Brasil - RS. Após a colheita, as maçãs foram transportadas em caixas plásticas até o laboratório de pós-colheita da Embrapa Uva e Vinho, sede Bento Gonçalves/RS, onde foram divididas em dois grupos, cada um com aproximadamente 100 kg frutos. O primeiro grupo foi tratado com uma solução 1-MCP (SmartFresh™) de 1 ppm ($1\mu\text{L L}^{-1}$). Posteriormente, os frutos foram acondicionados em caixas plásticas de 140 L, por 24 h e mantidos à 0 °C. O segundo grupo não recebeu tratamento com 1-MCP (grupo controle), mas foi submetido às mesmas condições.

4.2 Armazenamento dos frutos

Para a realização do armazenamento das maçãs 'Gala' o trabalho foi dividido em dois experimentos. Experimento 1 - os frutos tratados e não-tratados com 1-MCP foram armazenados por 180 dias em câmara fria com atmosfera refrigerada (AR – 0 °C \pm 0,5 °C; 90% umidade relativa \pm 5%) (**Figura 6**). Frutos foram analisados no tempo 0 e aos 30 e 180 dias de armazenamento.

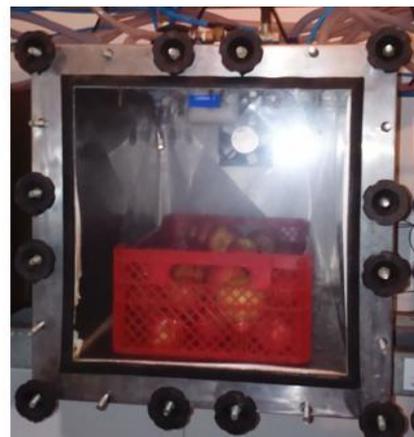
Experimento 2: As maçãs foram armazenadas em AR, nas condições descritas acima, e em AC (1% de O₂ e 2% de CO₂) por 180 dias em microcâmaras experimentais 112 L (instaladas dentro da câmara fria com

temperatura de $0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) e foram amostradas nos tempos 0 e 180 dias (**Figura 6**).

Em ambos os experimentos, os frutos foram removidos do armazenamento e acondicionados em câmara com temperatura ambiente (TA) a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante sete dias, para a simulação do *shelf-life* e, somente após esse período, foram realizadas as análises físico-químicas, transcricionais e de açúcares.



Atmosfera refrigerada (AR)



Atmosfera controlada (AC)

Figura 6: Ilustração do armazenamento das maçãs cv. Gala em AR ($0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$; $90\% \text{ UR} \pm 5\%$) e AC ($0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$; $90\% \text{ UR} \pm 5\%$; $1,0\% \text{ de O}_2$ e $2\% \text{ de CO}_2$).

4.3 Análises físico-químicas

A firmeza de polpa (FP) dos frutos foi determinada utilizando um penetrômetro automático (modelo P830075, Fruit Texture Analyzer), com uma

ponteira de 11 mm. Os frutos foram medidos duas vezes em lados opostos da porção equatorial central, utilizando 15 frutos por cada tratamento. Os resultados foram expressos em Newton (N). A determinação da acidez titulável (AT) foi realizada com 10 mL do suco da fruta, obtido através de centrifugação (Philips walita juicer, modelo R/1852), que foi diluído em 90 mL de água destilada por titulação com uma bureta graduada, contendo uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N, até observar a mudança da coloração do indicador de fenolftaleína. Os valores foram expressos em meq. de ácido málico 100 mL⁻¹. Para a medida dos sólidos solúveis (SS), foi utilizado refratômetro digital (Atago®, modelo PR 101), sendo os valores expressos em °Brix (STORCH et al., 2015).

4.4 Perfil de transcritos da parede celular por RT-qPCR

Para a extração do RNA total foram usadas 6 g de polpa de um pool de nove maçãs previamente maceradas em presença de nitrogênio líquido utilizando um moinho de bolas com câmara fechada (Marca MARCONI, modelo MA350, com uma bola de inox ISI304, Piracicaba – SP, Brasil) e liofilizada (LIOBRAS®, modelo L101). A extração de RNA foi realizada conforme protocolo de Zeng e Yang (2002), com as adaptações descritas a seguir.

A amostra foi extraída com aproximadamente 75 µL de acetato de sódio 3 M pH 5,5 e isopropanol gelado (4 °C), seguido de uma agitação vigorosa e uma etapa de repouso sobre refrigeração (- 80 °C) por 25 min. A amostra foi então centrifugada a 20.000 x g durante 20 min a 4 °C, o precipitado foi resuspendido em 50 µL de água Nuclease Free (Invitrogen, MA, USA) e foram adicionados aproximadamente 175 µL de LiCl 10M e a solução foi deixado

em repouso *overnight* e o precipitado formado foi lavado com etanol 75% (STORCH et al., 2017).

O RNA total extraído foi quantificado através da análise de absorvância (260/280 nm e 260/230 nm) em espectrofotômetro Epoch Micro-volume (BioTek, VT, USA) com o software Gen5. A integridade dos RNAs extraídos foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com 1 µL do fluoróforo GelRed™ (Biotium).

Antes da síntese de cDNA, usado 1 µg de RNA total foi acrescentado de 1 µL de DNase I (Invitrogen, MA, USA) e para eliminação de contaminação com DNA genômico. O protocolo seguiu a indicação do fabricante da enzima, sendo 1 µg de RNA total acrescentado de 1 µL de DNase I, 1 µL de solução tampão e 7,2 µL de água livre de RNase. A solução foi aquecida a 25 °C por 15 min, adicionada de 1 µL de EDTA e novamente aquecida a 65 °C por 10 min.

Para comprovação da eliminação de DNA, os RNAs tratados foram submetidos a PCR em Tempo Real com o gene *MdH1* (histona 1). A reação foi conduzida em equipamento StepOne™ Real Time PCR Systems (Life Technologies) usando o kit SYBR™ Green PCR Master Mix (Life Technologies).

Os RNAs livres de contaminação com DNA foram então submetidos à síntese de cDNA com o kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Assim, os RNAs foram adicionados de 1 µL de oligo dT, 1 µL do mix de DNTP e submetidos a aquecimento a 65 °C por 5 min, seguido de resfriamento 0 °C por 1 min. Adicionou-se então 2 µL de RT Buffer 10x, 4 µL de MgCl₂ (25 mM), 2 µL de 1,4-Dithiothreitol (0,1 M), 1 µL de RNase OUT (40U µL⁻¹) e 1 µL de SuperScript™ III, sendo a reação incubada a 50°C por 50min, seguido de mais 5min a 85 °C. Por fim, foi adicionado 1 µL de RNase H e aquecido a 37 °C por

20 min. Todas as operações de aquecimento e resfriamento foram conduzidas em termociclador My Cyclor™ (Bio-Rad).

A verificação da qualidade dos cDNAs sintetizados foi realizada através de PCR convencional em termociclador My Cyclor™ (Bio-Rad) com o primer que codifica para a ubiquitina (UBI), sendo utilizado o kit Red Taq Ready Mix™ PCR (Sigma) (1 µL de cDNA, 16,5 µL de mix e 2,5 µL de UBI F/R). As condições de reação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5min, seguida de 35 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 60 °C e 45 s a 72 °C, e extensão final por 5 min a 72 °C. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com 1 µL de GelRed (Biotium). A eletroforese foi realizada em sistema Bio-Rad PowerPac™ Basic e a visualização do gel em fotodocumentador Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad) (STORCH et al., 2017).

Neste estudo foi avaliada a transcrição de genes relacionados à biossíntese e degradação da parede celular com base em estudos de microarranjo realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa. Os dados das análises de microarranjos encontram-se disponíveis no site Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) sob o número de acesso GEOGSE59728 e também estão disponibilizados no trabalho de Isadora et al. (2016). Os primers foram desenhados no software Primer3Plus (UNTERGASSER et al., 2007) e estão apresentados na **Tabela 1**. Foram testados cinco genes de referência (*MdACT*, *MdPDI*, *MdUBQ*, Drought-responsive family protein e WD-40 repeat family protein), sendo escolhidos os três mais estáveis, *MdACT*, *MdPDI* e *MdUBQ* de acordo com a análise de estabilidade utilizando o software geNorm (Vandesompele et al., 2002) que considera como estáveis os genes que apresentam valor $M < 1,5$.

As reações foram conduzidas em equipamento StepOne™ Real Time PCR Systems (Life Technologies) usando o kit SYBR™ Green PCR Master Mix (Life Technologies). O volume final das reações foi 15 µL, sendo 7,5 µL do kit, 0,6 µL de primer Forward/Reverse, 5,9 µL de água livre de nuclease e

1 μ L de cDNA. As condições de reação foram: desnaturação a 95 °C por 10 min, seguida de 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C, com posterior curva de dissociação (desnaturação a 95 °C por 15 s, resfriamento a 60 °C por 1 min e elevação gradual de 0,3 °C até atingir 95 °C). Um controle negativo (sem cDNA) foi utilizado para garantir a ausência de contaminação nos reagentes. Foram utilizadas três replicatas analíticas para cada amostra.

Tabela 1: Primers utilizados para análise em RT-qPCR. O ID corresponde ao genoma *Malus x domestica* v.1.0. As sequências iniciadoras reversas são dadas de 5' a 3'

Gene	Sequência dos primers			Temperatura de anelamento	
	ID	Forward	Reverse	Forward	Reverse
Biossíntese de parede celular					
Fasciclin-like arabinogalactan protein 2 (<i>MdFLA2</i>)	MDP0000282305	CAACCTCAAAGGCGGTAAAG	TTGTATGGCATCTCCAGCAC	60	60
Galacturonosyltransferase 9 (<i>MdGAUT9</i>)	MDP0000290004	GTGGTGTGGAGTCGAAGGAT	CTCCTTTGACTCCCCAATCA	60	60
Glucose-6-dehydrogenase putative (<i>MdUDP</i>)	MDP0000193220	AGCAGCGCAGAGAAAAGAAC	AGCTGCTTTACCAGCTCCAA	60	60
Degradação de parede celular					
β -Xylosidase 1 (<i>MdBXL1</i>)	MDP0000121374	CTCGAAACCCGATAACGAGA	CCAACAGCCTGATCTTCTCC	60	60
α -L-Arabinofuranosidase 3 (<i>MdAF3</i>)	MDP0000140483	ATTTACAAGGTCCATATCG	CAGGTCACCAATTTCCAG	56	54
Endo-xyloglucantransferase (<i>MdEXGT</i>)	MDP0000398765	GACGGCGTAGGAGTGGTAAG	AAACAACGAACACGACGAGA	64	58
Referência					
Actin (<i>MdACT</i>)	MDP0000170174	GGCTCTATTCCAACCATCCA	TAGAAGCAGTGCCACCACAC	60	62
Ubiquitin 2 (<i>MdUBI</i>)	MDP0000498429	TTGATCTTTGCTGGGAAACAG	CACCACCATCATTCAACACC	60	60
Protein disulfide isomerase (<i>MdPDI</i>)	MDP0000233444	TGCTGTACACAGCCAACGAT	CATCTTTAGCGGCGTTATC	60	60
Drought-reponsive family protein WD-40 repeat family protein	MDP0000217860	ACGCAAGAGGAAGACAAGGA	GGGTGGCATGCTAACAAAAT	60	58
	MDP0000251161	CCTGATGGGACATCTTGAAG	GTACTIONCATCCACCTGTAATC	60	62

As avaliações da eficiência (**Tabela 2**) e especificidade dos primers foram feitas por análise da curva padrão e da curva de dissociação, respectivamente, sendo preparadas diluições seriadas (1:5; 1:25; 1:125; 1:625; 1:3125) de um *pool* com os cDNAs de todas as amostras (**Figura 7**). Foram considerados apenas os primers com pico único na curva de dissociação (específicos) e com eficiência variando de 85%-110%.

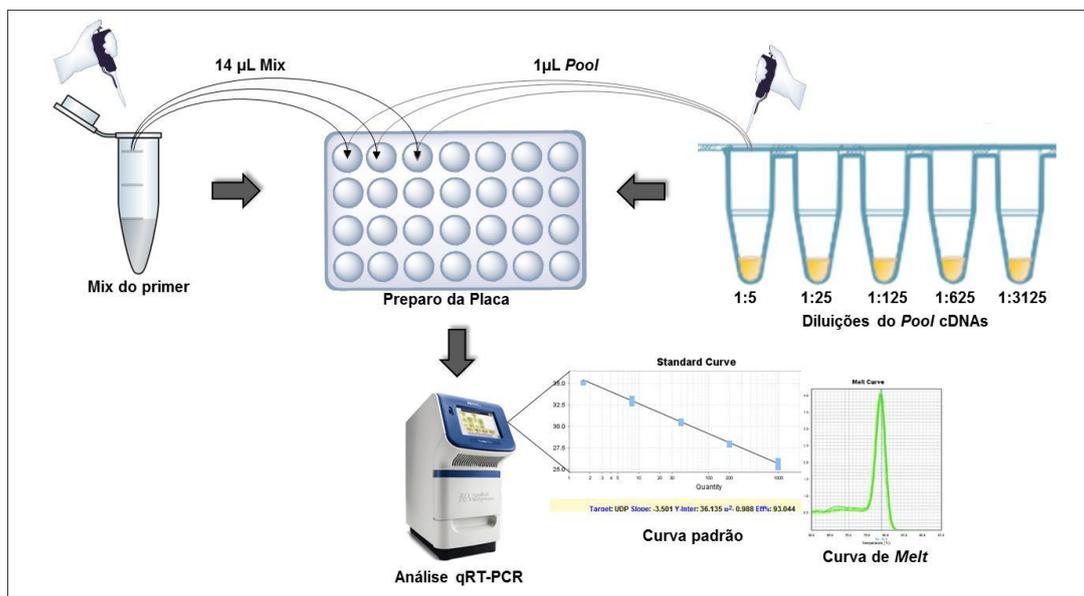


Figura 7: Esquema do preparo das placas para validação dos primers referência e 'alvos' (*Malus x domestica*).

Tabela 2: Eficiência dos *primers* utilizados para validação por RT-qPCR

Gene	Slope*	R²*	Eficiência%
<i>MdFLA2</i>	-3,558	0,978	90%
<i>MdGAUT9</i>	-3,336	0,981	99%
<i>MdUDP</i>	-3,501	0,988	93%
<i>MdBXL1</i>	-3,534	0,997	92%
<i>MdAF3</i>	-3,520	0,999	92%
<i>MdEXGT</i>	-3,513	0,997	92%
<i>MdACT</i>	-3,303	0,963	100%
<i>MdUBI</i>	-3,508	0,978	93%
<i>MdPDI</i>	-3,439	0,988	95%
<i>Md2178</i>	-3,549	0,989	91%
<i>Md2511</i>	-3,602	0,997	98%

*Os valores do *Slope* e do R² (coeficiente angular da reta) são gerados pelo programa do Real time, através da curva padrão formada pelos resultados das diluições dos pares F/R dos genes analisados.

A quantificação relativa (QR) foi conduzida em equipamento StepOne™ Real Time PCR Systems (Life Technologies) usando o kit SYBR™ Green PCR Master Mix (Life Technologies). As reações foram realizadas em um volume final de 15 µL, consistindo de 7,5 µL de SYBR Green PCR Master Mix, 0,6µL de primer Forward/Reverse, 5,9 µL de água livre de nuclease e 1 µL de cDNA com a diluição 1:25 que se mostrou mais eficiente entre as testadas, e nas mesmas condições de reação descritas acima. Um controle negativo (sem cDNA) foi utilizado para garantir a ausência de contaminação nos reagentes.

Cabe destacar que os cálculos de quantificação relativa (QR) através da equação $\Delta\Delta CT$ (**Equação 1**), foram baseados nos resultados de expressão das maçãs expostas sete dias à temperatura ambiente (25 °C) logo após a colheita. Se escolheu esta amostra (7d) para ser a calibradora, em virtude de todas as análises só ter sido realizadas após os frutos serem retirados do

armazenamento e expostos sete dias à TA para simulação do tempo prateleira. Deste modo, todos os resultados de QR foram expressos em relação à amostra zero dia de armazenamento mais sete dias em TA.

$$\begin{aligned}\Delta CT &= CT \text{ gene alvo} - CT \text{ gene de referência} \\ * \Delta \Delta CT &= \Delta CT \text{ amostra} - \Delta CT \text{ amostra normalizadora} \\ QR &= 2^{-\Delta \Delta CT}\end{aligned}$$

Equação 1: Cálculo da quantificação relativa aplicados para os genes relacionados a parede celular de maçãs, baseado na fórmula $\Delta \Delta CT^*$.

Fonte: Biosystems

4.5 Extração e quantificação de pectina

A pectina foi extraída de 0,5 g da amostra, previamente liofilizada (Marca LIOBRAS, modelo L101) e macerada (MARCONI®, modelo MA350), conforme protocolo adaptado de Zambiasi (2010). A amostra foi adicionada de 8 mL de água ultrapura (Megapurity®, modelo Mega RO) e aquecida por 1h à temperatura de 100 °C. Posteriormente, a amostra ficou em repouso até atingir a temperatura de 25 °C. Em seguida, foi agitada em agitador magnético (Fisatom®, modelo 752A), filtrada em papel filtro (Quanty® JP41) para um balão 10 mL e avolumada com água ultrapura com temperatura de 100 °C. Uma alíquota de dois mililitros foi retirada dessa amostra e diluída em seis mililitros água ultrapura e adicionada de 200 µL da solução de hidróxido de sódio 1 N. A solução foi agitada continuamente com bastão de vidro e posteriormente ficou em repouso *over night*.

Após esse tempo foi adicionado 1 mL da solução de ácido acético 1 N e 1mL da solução de cloreto de cálcio a 2 N, sob agitação com temperatura de

100 °C por 60 segundos. A amostra ficou novamente em repouso por mais 1 h e após esse período foi filtrada e lavada com água ultrapura a 100 °C. A amostra de pectina extraída foi seca em estufa a 100 °C por três horas, colocada em dessecador para esfriar e pesada.

A quantidade de pectina presente nas amostras foi calculada conforme a **Equação 2**, na qual P representa o peso de amostra de maçã (aproximadamente 0,5 g) e N o peso do papel filtro com pectina extraída.

$$\text{Gramas de pectato da calcio \%} = \frac{N \times 100}{P}$$

Equação 2: Cálculo para a quantificação de pectina presente nas amostras de maçãs.

4.6 Extração de açúcares

Os açúcares foram extraídos de 0,01 g de amostra liofilizada de acordo com a metodologia proposta por Lisec et al. (2006). Para extração, dos sacarídeos as amostras liofilizadas de maçã 'Gala' foram adicionadas em tubos de 2 mL contendo 1.400 µL de metanol grau HPLC pré-resfriado a -20 °C. Posteriormente foi adicionado 60µL do padrão interno (0,2 mg mL⁻¹ Ribitol em água ultrapura) e homogenizado em vórtix por 10 s. A amostra foi colocada no termomisturador (Eppendorf, termomixer 5436) por 10 min. a temperatura de 70 °C com agitação de 900 rpm. Posteriormente foram centrifugadas por 10 min. a 11.000 x g e o sobrenadante foi coletado em tubos de 15mL e adicionado de 1.500 µL de água ultrapura refrigerada a 4 °C, 750 µL de clorofórmio grau HPLC pré-resfriado a -20 °C e agitado em vórtix durante 10 s. A amostra foi centrifugada (Sorvall, RC5C) por 15 min a 22.000 x g e 30 µL sobrenadante foi transferido para vial de 1,5 mL e seco com gás nitrogênio.

No processo de derivatização dos sacarídeos, foram adicionados 40 μL do reagente de metoxiaminação (cloridrato de metoxiamina a 20 mg mL^{-1} em piridina) e agitado por 2 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ em termomisturador. Após, foram adicionados 70 μL de MSTFA [N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida] e agitado por 30 min. a 37 $^{\circ}\text{C}$. A mistura foi transferida para frascos com inserts de 200 μL e injetadas no CG-EM.

4.7 Quantificação dos açúcares por CG-EM

Os açúcares foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas utilizando o equipamento modelo CG-EM QP2010 Ultra (Shimadzu, Japão) com biblioteca de espectrometria de massa NIST 2011. Injetou-se 1 μL de amostra utilizando gás hélio como gás carreador de acordo com o protocolo descrito por Koubaa et al. (2012). A injeção foi feita no modo splitless com fluxo 1,93 mL/min . A coluna capilar utilizada foi um Rxi-1MS (30 m \times 0,32 mm \times 0,25 μm) com programação de temperatura de 120 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min e uma temperatura de rampa de 10 $^{\circ}\text{C}$ por min até 190 $^{\circ}\text{C}$, mantida por 5 min e após este tempo aumentou novamente a temperatura em 10 $^{\circ}\text{C}$ por min até 270 $^{\circ}\text{C}$ e mantida por 5 min. Os parâmetros da MS foram: a temperatura da fonte de ions e da interface de 300 $^{\circ}\text{C}$, com varredura no intervalo m/z 29 a 1000 a 0,2 scans por segundo. A identificação e quantificação dos açúcares foram realizadas por comparação com os padrões analíticos L - (+) - Arabinose, D - (-) - Frutose, D - (+) - Galactose, D - (+) - Glicose, D - (+) - Manose, L-ramnose monohidratada, sacarose, D - (-) - sorbitol, D - (+) - Maltose monohidratada e D - (+) - Xilose de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

4.8 Análise estatística

Para a interpretação dos resultados das análises realizadas nas maçãs cv. Gala foram aplicados ANOVA e teste t, com um nível de significância de 5%, usando o *software* STATISTICA, versão 7.

5. Resultados

5.1 Características físico-químicas gerais das maçãs

A firmeza de polpa (FP) e os teores de acidez titulável (AT) e de sólidos solúveis (SS) foram os atributos físico-químicos avaliados para caracterizar o estágio de maturação das maçãs da variedade Gala no momento da colheita e durante o período de armazenamento sob refrigeração em atmosfera refrigerada (AR) e atmosfera controlada (AC). Os frutos referentes à safra do ano de 2014 (S1) apresentaram, no momento da colheita, uma firmeza de polpa de 81,9 N, acidez titulável de 5,8 meq. de ácido málico 100 mL⁻¹ e teor de sólidos solúveis de 12,2 °Brix, enquanto os frutos colhidos em 2016 (S2) apresentavam 83,2N, 4,5 meq de ácido málico 100 mL⁻¹ e 10,3 °Brix (**Figura 8**).

As maçãs armazenadas em atmosfera refrigerada (AR), que não receberam o tratamento com 1-MCP (os frutos controle) apresentaram redução significativa da firmeza de polpa no último mês de armazenamento, para ambas as safras (**Figure 8a**). Em contrapartida, os frutos que receberam o tratamento com 1-MCP mantiveram a FP durante todo o período de armazenamento para ambas as safras (**Figure 8a**). A acidez total apresentou

redução significativa desde o primeiro mês de armazenamento. Essa redução foi mais precoce em comparação aos dados encontrados para a FP. Os dados obtidos na análise de AT, mostraram que o tratamento com 1-MCP apresentou um menor efeito sobre os ácidos orgânicos presentes na polpa dos frutos, que não se mantiveram até 180d (**Figure 8b**). Os frutos tratados com 1-MCP mantiveram os teores de SS ao longo do armazenamento, no entanto os frutos não tratados reduziram os SS até o final do armazenamento no primeiro ano de colheita (**Figure 8c**).

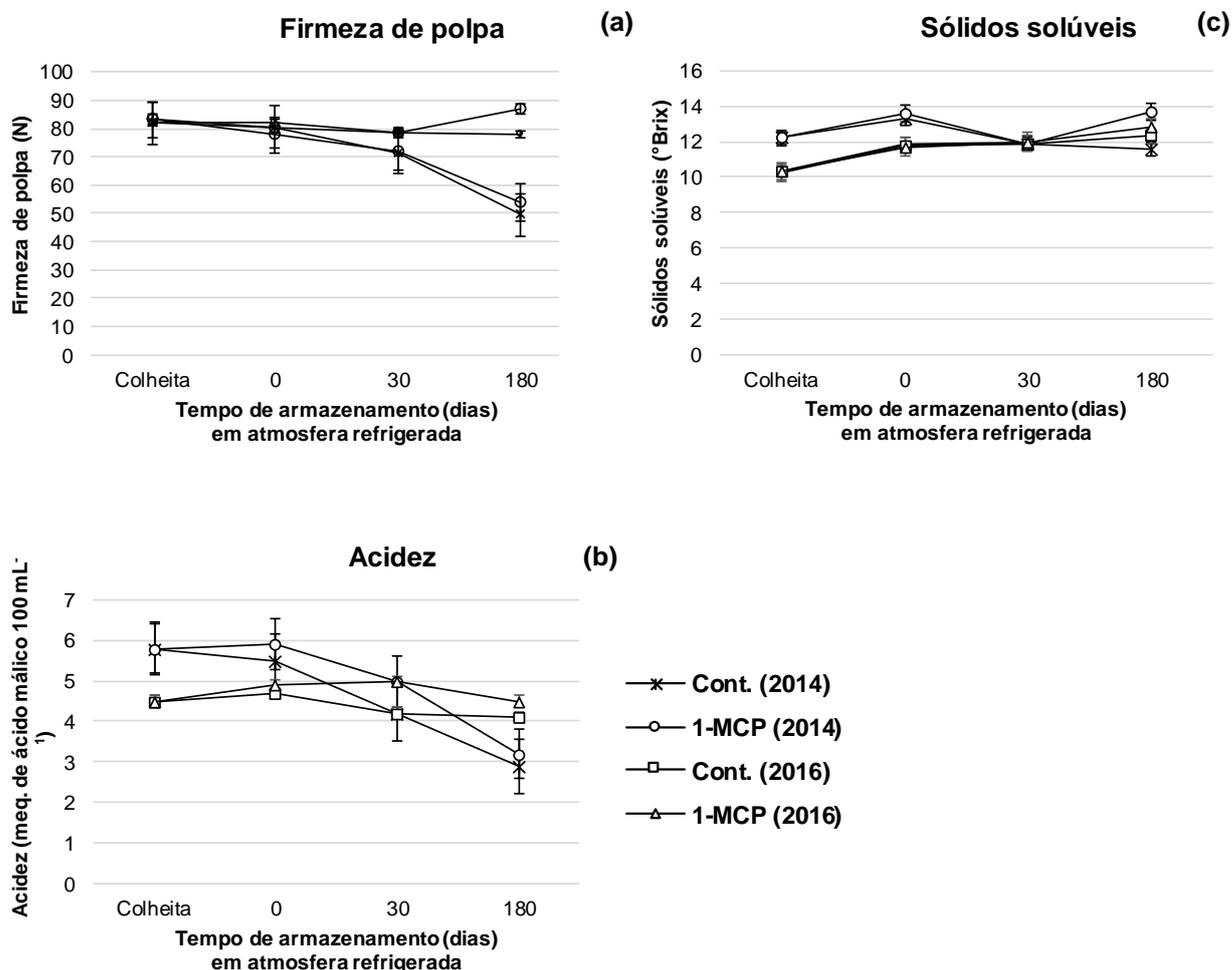


Figura 8: Análise físico-química de maçãs "Gala" tratadas e não tratadas com 1-MCP, armazenadas em atmosfera refrigerada. Após o tempo 0, 30 e 180 dias de armazenamento foram realizadas análises físico-químicas (a) firmeza, (b) acidez e (c) sólidos solúveis. Os resultados estão representados em média e \pm desvio padrão ($n = 3$).

No experimento 2, nas safras S1 e S2 aos 180d de armazenamento sob AR os frutos, com e sem 1-MCP, apresentaram o mesmo comportamento descrito para o experimento 1, ou seja, tiveram uma redução de FP e SS somente para os frutos não tratados com 1-MCP. A AT reduziu para ambos os tratamentos em AR aos 180d. No entanto, tanto os frutos não tratados com 1-MCP, como os frutos tratados com 1-MCP mantidos sob atmosfera

controlada, não sofreram alteração nas variáveis FP, AT e SS em 180 dias de armazenamento mais 7 dias a TA (**Tabela 3**).

Tabela 3: Efeito do tratamento 1-MCP e do armazenamento sob atmosfera refrigerada e controlada (180 dias), mais 7 dias em TA, sob as características físico-químicas de maçãs ‘Gala’

Ano de Colheita	Atmosfera	FP (N)		AT (meq. ácido málico 100mL ⁻¹)				SS (°Brix)	
		Controle	1-MCP	Controle	1-MCP	Controle	1-MCP		
2014 (S1)	AR	49,6 bB	77,7 aA	2,9 bB	3,2 aA	11,5 bB	13,6 aA		
	AC	74,0 aA	73,6 aA	5,0 aA	5,2 aA	13,6 aA	13,2 aB		
2016 (S2)	AR	53,7 bB	76,2 aA	4,0 bA	4,4 bA	12,3 aB	12,8 aA		
	AC	86,6 aA	81,3 aA	5,0 aA	5,2 aA	12,4 aA	12,1 aA		

*Os resultados são representados em média e \pm desvio padrão (n = 3). Médias acompanhadas de mesma letra maiúscula não se diferenciaram entre si pelo teste t ($p \leq 0.05$) e comparam entre si frutos controles (não tratados com 1-MCP) e frutos tratados com 1-MCP dentro da mesma atmosfera de armazenamento. Médias acompanhadas de mesma letra minúscula não se diferenciaram entre si pelo teste t ($p \leq 0.05$) e comparam as atmosferas de armazenamento AR e AC.

5.2 Transcritos relacionados a parede celular de maçãs em 180 dias de armazenamento mais 7 dias em TA

Durante o armazenamento refrigerado de maçãs da variedade Gala foram estudados o comportamento transcricional de três genes relacionados a montagem da parede celular (*MdFLA2*, *MdGAUT9* e *MdUDP*) e três genes de degradação (*MdAF3*, *MdBXL1* e *Md EXGT*) (**Tabela 1**). Dentre os três genes de biossíntese o *MdGAUT9* foi o que mostrou um acúmulo transcricional de RNAm nas safras S1 e S2, para ambos os tratamentos (com e sem 1-MCP). Os frutos não tratados com 1-MCP só tiveram acúmulo transcricional em 30d. Em contrapartida, os frutos tratados com 1-MCP apresentaram um aumento transcricional desde a colheita até o primeiro mês

de armazenamento, e esse aumento representou 60% em comparação com os frutos não tratados com 1-MCP (**Figuras 9a e b**).

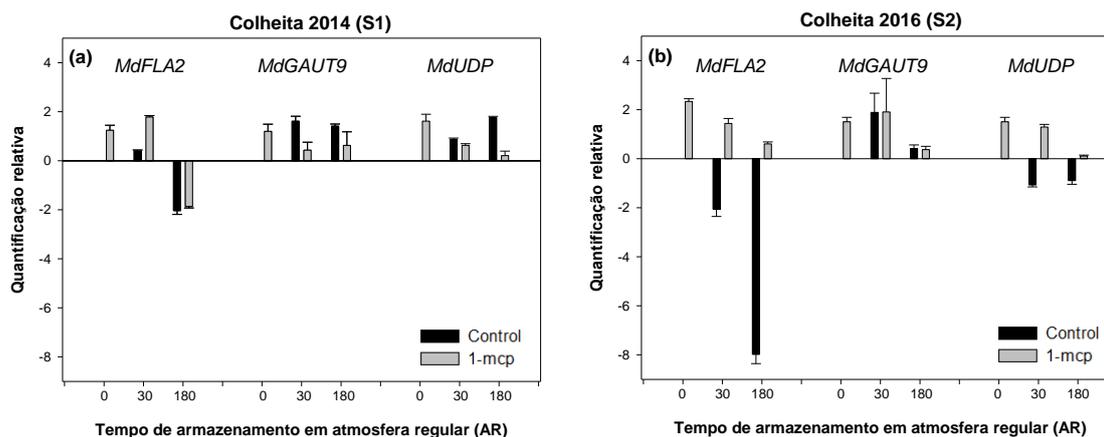


Figura 9: Expressão relativa dos genes de biossíntese da parede celular *MdFLA2*, *MdGAUT9* e *MdUDP* do clone de maçãs 'Gala' 'Maxigala', tratados e não tratados com 1-MCP e armazenados por 180 dias sob atmosfera refrigerada (AR), seguidos de sete dias de armazenamento temperatura ambiente a 25 °C. (a) Colheita do ano de 2014 e (b) Colheita do ano de 2016. Os resultados são representados em média e \pm desvio padrão ($n = 3$). Para os cálculos de quantificação relativa, foram utilizados resultados dos frutos no momento da colheita + 7 dias TA como normalizador. Os resultados dos gráficos foram expressos em \log_2 .

O *MdGAUT9* foi o único gene expresso durante todo o período de armazenamento e isso foi observado para S1 e S2. No entanto, na S1 ocorreu o mesmo grau de acúmulo transcricional para ambos os tratamentos. Na S2 os frutos que não foram tratados com 1-MCP apresentaram um aumento transcricional de aproximadamente 60% em relação aos que foram tratados (**Figuras 9a e b**).

O acúmulo de transcritos de *MdUDP* variou entre S1 e S2 para os frutos não tratados com 1-MCP. Nos frutos controle, os genes se mantiveram reprimidos ao longo de todo o experimento, para S1 enquanto em S2 eles apresentaram um aumento gradativo no acúmulo de RNAm até 180d. Em contrapartida, os frutos tratados com 1-MCP tiveram o mesmo comportamento em ambas safras S1 e S2, apresentando uma redução gradativa no conteúdo de RNAm ao longo do armazenamento.

Os genes que codificam para enzimas que degradam os sacarídeos de parede celular estudados, apresentaram uma grande variabilidade na expressão transcricional entre S1 e S2 (**Figuras 10a e 10b**). Na S1 (**Figura 10a**), os genes de degradação tiveram relativamente baixa expressão durante todo o experimento. Essa redução transcricional foi maior nos frutos que receberam o tratamento com o 1-MCP, com exceção do *MdEXGT* que em 180d apresentava-se expresso em ambos os tratamentos.

Na S2s frutos tratados e não tratados com 1-MCP apresentaram um acúmulo de RNAm muito semelhante para os genes *MdAF3* e *MdBXL1*. Nos frutos não tratados com 1-MCP estes dois genes tiveram um aumento transcricional até o primeiro mês de armazenamento e mantiveram o nível de expressão até 180d (**Figura 10b**).

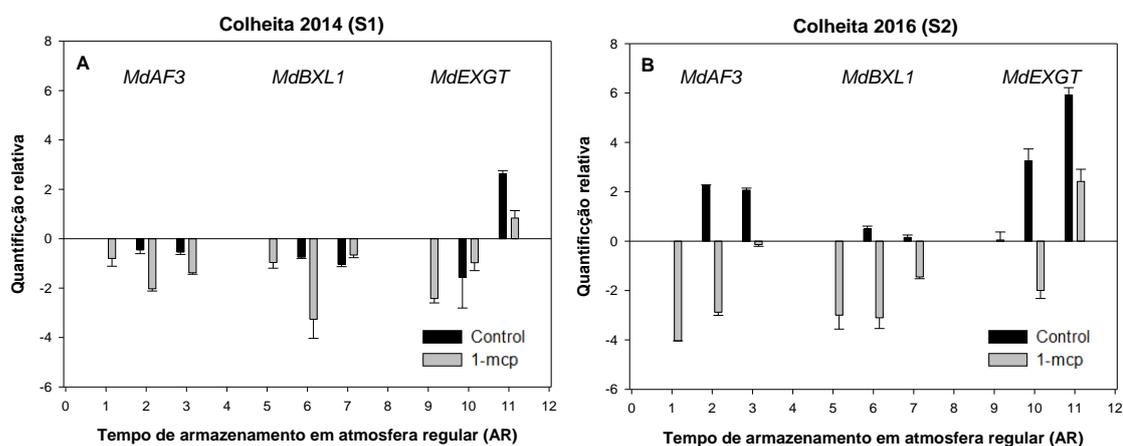


Figura 10: Expressão relativa dos genes de degradação da parede celular *MdAF3*, *MdBXL1* e *MdEXGT* do clone de maçãs 'Gala' 'Maxigala', tratados e não tratados com 1-MCP e armazenados por 180 dias sob atmosfera refrigerada (AR), seguidos de sete dias de armazenamento temperatura ambiente a 25 °C. (a) Colheita do ano de 2014 e (b) Colheita do ano de 2016. Os resultados são representados em média e \pm desvio padrão ($n = 3$). Para os cálculos de quantificação relativa, foram utilizados resultados dos frutos no momento da colheita + 7 dias TA como normalizador. Os resultados dos gráficos foram expressos em \log_2 .

O *MdEXGT* teve uma expressão transcricional bem diversificada tanto entre os tratamentos quando entre os anos de colheita. Durante a S1 o acúmulo de transcritos de *MdEXGT* foi baixo no primeiro mês de armazenamento nos frutos não tratados com 1-MCP e naqueles tratados com 1-MCP. Na S2, durante a colheita não foram observados transcritos do gene para ambos os tratamentos. Após a colheita os frutos não tratados com 1-MCP aumentaram o seu acúmulo de transcritos, chegando a 45% de aumento no final do experimento, em relação a 30d (**Figura 10b**). Os frutos não tratados com 1-MCP também tiveram uma maior expressão de transcritos (50%) em comparação aos frutos tratados com 1-MCP, em S2 (**Figura 10a**).

De modo geral os genes que codificam para enzimas envolvidas na modelagem e desestruturação da parede celular (PC) apresentaram uma variabilidade transcricional de uma safra para outra em ambas as atmosferas estudadas (AR e AC).

No momento da colheita (0d de armazenamento em AR e AC), se tinha um pequeno acúmulo de transcritos para os genes relacionado a biossíntese dos polissacarídeos de PC e uma repressão para os genes de degradação, dados não apresentados no trabalho (**Figura 11a**).

Na safra de 2014 (S1), os genes *MdGAUT9* e *MdUDP* de maçãs não tratadas e armazenadas em AR, tiveram um aumento transcricional em comparação aos frutos tratados com 1-MCP. Em contrapartida, em frutos de ambos tratamentos o *MdFLA2* manteve sua expressão reprimida (**Figura 11a**). Na AC os frutos tratados com 1-MCP apresentaram maior acúmulo de transcritos para todos genes avaliados, se destacando o *MdFLA2* com um acúmulo 65% maior aos demais genes estudados (**Figura 11**).

Na safra de 2016 (S2), o tratamento com 1-MCP promoveu um aumento no acúmulo de transcritos para os genes relacionados à montagem da parede celular em comparação aos controles (não tratados com 1-MCP), durante o AR (**Figura 11c**).

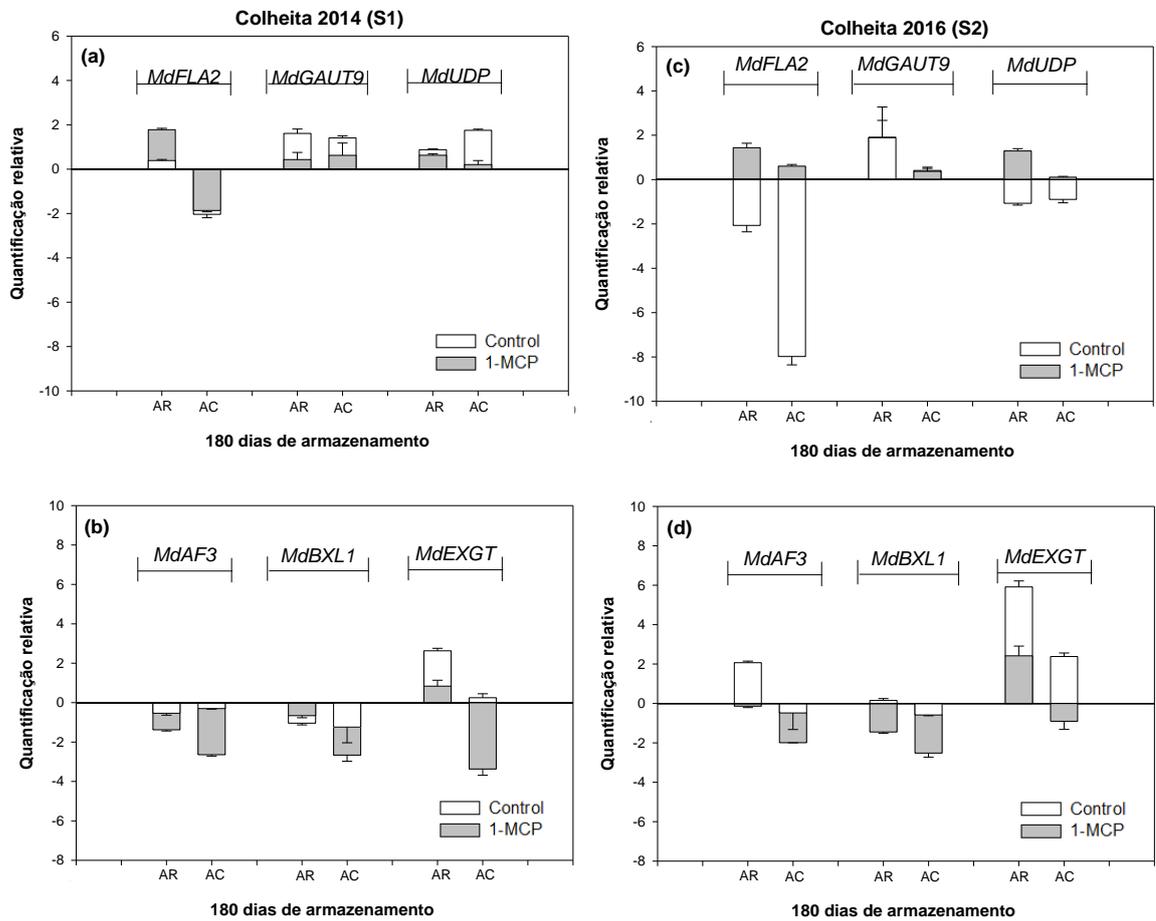


Figura 11: Expressão de transcritos em maçãs ‘Gala’ em duas safras. Os frutos com e sem tratamento com 1-MCP foram armazenados por 180 dias sob atmosfera refrigerada (AR) e controlada (AC) seguida de exposição à temperatura ambiente, por sete dias. (a) e (c) representam a expressão dos genes que codificam para enzimas relacionadas a biossíntese da parede celular. b) e d) transcritos relacionados a de degradação da parede celular. Os resultados são representados em média e \pm desvio padrão ($n = 3$). Para os cálculos de quantificação relativa, foram utilizados resultados dos frutos no momento da colheita + 7 dias TA como normalizador. Os resultados dos gráficos foram expressos em \log_2 .

Os genes *MdAF3* e *MdBXL1* se mantiveram reprimidos para ambos os tratamentos e atmosferas testadas, na safra de 2014 (S1). Em contrapartida, o *MdEXGT* aumentou sua expressão em AR, sendo este aumento maior para os frutos não tratados com 1-MCP (frutos controle). Durante o AC, o acúmulo relativo de transcritos foi menor em comparação com AR (**Figura 11b**).

Na safra de 2016 (S2), as maçãs tanto armazenadas em AR quanto em AC tiveram os seus genes de degradação (*MdAF3*, *MdBXL1* e *MdEXGT*) aproximadamente 75, 65 e 90% menos expresso na presença do 1-MCP, respectivamente (**Figura 11d**).

5.3 Sacarídeos

A seguir são apresentados os resultados encontrados para pectina, mono e dissacarídeos presentes nas maçãs cv 'Gala', referente a dois anos de colheita 2014 (S1) e 2016 (S2).

Na safra S1, o teor do polissacarídeo totais se manteve constante nas maçãs até 30d, para ambos os tratamentos, e após esse período os frutos tiveram uma redução no teor de pectina (**Figura 12a**).

Na safra S2, os frutos não tratados com 1-MCP apresentaram uma maior redução no % de pectina do 0d ao 180d de armazenamento em AR, em comparação com a safra S1 no mesmo período, sendo essa perda de aproximadamente 30%. O mesmo comportamento foi observado para as maçãs tratadas com 1-MCP (**Figura 12b**).

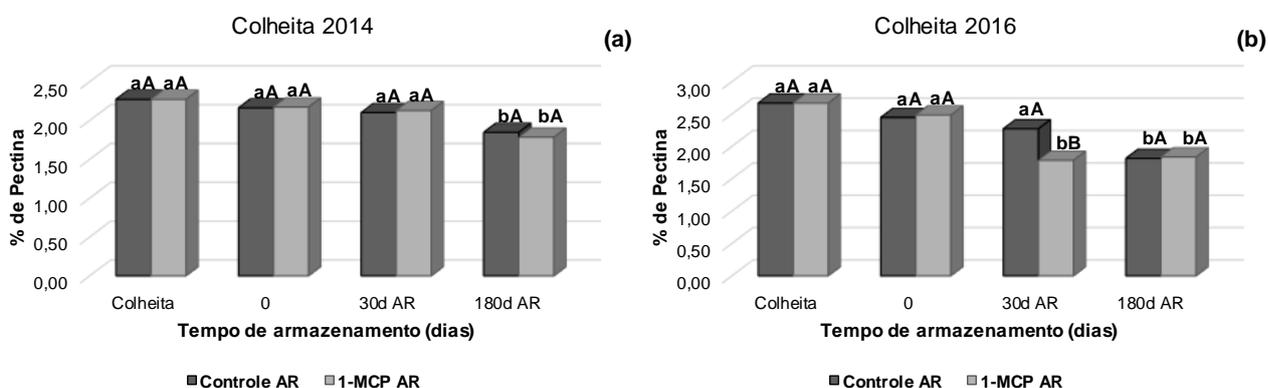


Figura 12: Teores de pectina em maçãs 'Gala' tratadas e não tratadas com 1-MCP e armazenadas por 180 dias sob atmosfera refrigerada (AR). Os resultados são representados em média e \pm desvio padrão ($n = 3$). Médias acompanhadas de mesma letra maiúscula não se diferenciaram entre si pelo teste t ($p \leq 0.05$) e compararam entre si frutos controles (não tratados com 1-MCP) e frutos tratados com 1-MCP. Médias acompanhadas de mesma letra minúscula não se diferenciaram entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$) entre os dias de armazenamento.

Maçãs armazenadas por 180d em AR apresentaram uma perda de pectina 20 a 30% maior do que maçãs armazenadas pelo mesmo período em AC, independentemente do tratamento com 1-MCP, e do ano de colheita (Figura 13a e b).

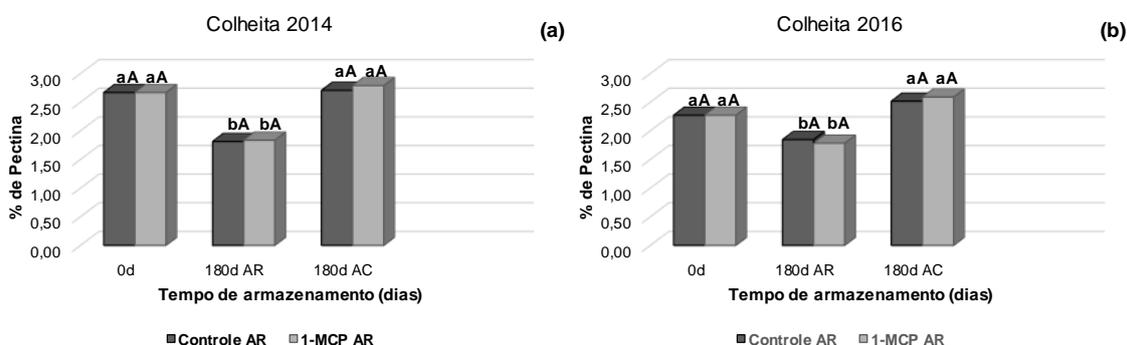


Figura 13: Teores de pectina em maçãs 'Gala' tratadas e não tratadas com 1-MCP e armazenadas por 180 dias sob atmosfera refrigerada (AR). Os resultados são representados em média e \pm desvio padrão ($n = 3$). Médias acompanhadas de mesma letra maiúscula não se diferenciaram entre si pelo teste t ($p \leq 0.05$) e compararam entre si frutos controles (não tratados com 1-MCP) e frutos tratados com 1-MCP. Médias acompanhadas de mesma letra minúscula não se diferenciaram entre si pelo teste t ($p \leq 0.05$) entre os dias de armazenamento.

A identificação e quantificação dos mono e dissacarídeos presentes nas maçãs foram realizadas por CG-EM através da comparação com o tempo de retenção e os espectros de massa obtidos para os padrões (**Tabela 4**).

Tabela 4: Açúcares analisados por CG-EM

Nº	Compostos	Fórmula molecular	R _t	Massa dos compostos derivatizados	Principais íons
	<i>D</i> -Xilose (isomero1)	C ₁₈ H ₄₅ NO ₅ Si ₄	7.211	467	103 ,217, 307
2	<i>D</i> -Xilose (isomero2)	C ₁₈ H ₄₅ NO ₅ Si ₄	7.306	467	103 ,217, 307
3	<i>L</i> -Arabinose	C ₁₈ H ₄₅ NO ₅ Si ₄	7.394	467	103 ,217, 307
4	<i>L</i> -ramnose (isomero1)	C ₁₉ H ₄₇ NO ₅ Si ₄	8.021	481	117, 160, 277
5	<i>L</i> -ramnose (isomero2)	C ₁₉ H ₄₇ NO ₅ Si ₄	8.103	481	117, 160, 277
6	<i>D</i> -Frutose (isomero1)	C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ Si ₅	10.112	569	103, 217, 307
7	<i>D</i> -Frutose (isomero2)	C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ Si ₅	10.269	569	103, 217, 307
8	<i>D</i> -Manose	C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ Si ₅	10.375	569	147, 205, 319
9	<i>D</i> -Galactose (isomero1)	C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ Si ₅	10.375	569	147, 205,319
10	<i>D</i> -Glicose (isomero2)	C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ Si ₅	10.536	569	147, 205, 319
11	<i>D</i> -Galactose (isomero2)	C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ Si ₅	10.788	569	147, 205, 319
12	<i>D</i> -Glicose (isomero2)	C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ Si ₅	10.788	569	147, 205, 319
13	<i>D</i> -Sorbitol	C ₂₄ H ₆₂ NO ₆ Si ₆	11.458	614	147, 205, 319
14	Sacarose	C ₃₆ H ₈₆ NO ₁₁ Si ₈	21.133	918	147, 217, 361
15	<i>D</i> -Maltose (isomero1)	C ₃₇ H ₈₉ NO ₁₁ Si ₈	22.093	947	147,204, 361
16	<i>D</i> -Maltose (isomero2)	C ₃₇ H ₈₉ NO ₁₁ Si ₈	22.346	947	147,204, 361

A análise cromatográfica permitiu a identificação de um dissacarídeo (sacarose) e quatro monossacarídeos (xilose, frutose, glicose, manose e sorbitol) (**Tabela 5**). Dentre os açúcares identificados, a frutose foi o sacarídeo mais abundante no fruto, representando aproximadamente 35% do total de açúcares.

De um modo geral, o teor dos açúcares aumentou gradativamente até primeiro mês de armazenamento e reduziu no final do armazenamento (180d) para valores próximos aos apresentados na colheita (0d) (**Tabela 5**). Esse efeito foi observado para ambos os tratamentos e anos de colheita (**Tabela 5**).

Tabela 5: Caracterização de açúcares (mg de açúcar/ g de maçã seca) por cromatografia gasosa (CG-EM) em polpa de maçãs armazenadas por 180 dias em AR

Compostos	Tratamento	Colheita 2014							
		Colheita		0d		30d		180d	
<i>D</i> -Xilose (isomero 1)	Controle	Nd		0,116	aB	0,134	bB	0,128	bB
	1-MCP	Nd		0,101	aA	0,124	bA	0,128	bA
<i>D</i> -Xilose (isomero 2)	Controle	0,035	aA	0,044	bB	0,050	cB	0,047	bcA
	1-MCP	0,035	aA	0,036	aA	0,043	bA	0,051	cA
<i>D</i> -Frutose (isomero 1)	Controle	2,042	aA	2,803	bB	3,132	bB	2,230	aB
	1-MCP	2,042	aA	2,392	abA	2,805	bA	2,688	bA
<i>D</i> -Frutose (isomero 2)	Controle	2,079	bA	2,736	cB	2,958	cB	1,517	aA
	1-MCP	2,079	abA	2,284	bA	2,078	abA	1,558	aA
<i>D</i> -Glicose (isomero)	Controle	0,509	aA	0,725	bB	0,835	bB	0,581	aB
	1-MCP	0,509	aA	0,662	bA	0,641	bA	0,808	cA
<i>D</i> -Manose e	Controle	0,236	aA	0,321	abA	0,367	bA	0,329	abB
	1-MCP	0,236	aA	0,325	bA	0,348	bA	0,457	cA
<i>D</i> -Sorbitol	Controle	0,131	abA	0,165	cB	0,143	bA	0,115	aB
	1-MCP	0,131	aA	0,187	aA	0,129	aA	0,129	bA
Sacarose	Controle	1,140	bA	1,414	bB	1,266	bA	0,326	aA
	1-MCP	1,140	bA	1,160	bA	1,018	bA	0,392	aA
Açúcares totais	Controle	6,172	bA	8,324	cB	8,885	dB	5,273	aA
	1-MCP	6,172	aA	7,046	bA	7,062	bA	6,083	aB

Continua

Tabela 6: Caracterização de açúcares (mg de açúcar/ g de maçã seca) por cromatografia gasosa (CG-EM) em polpa de maçãs armazenadas por 180 dias em AR

Compostos	Tratamento	Colheita 2016							
		Colheita		0d		30d		180d	
<i>D</i> -Xilose (isomero 1)	Controle	Nd		0,094	bB	0,087	bA	0,093	aA
	1-MCP	Nd		0,098	cA	0,078	bB	0,076	aB
<i>D</i> -Xilose (isomero 2)	Controle	0,029	aA	0,029	aB	0,032	aB	0,043	bB
	1-MCP	0,029	bA	0,025	aA	0,022	aA	0,026	abA
<i>D</i> -Frutose (isomero 1)	Controle	1,740	aA	2,054	aA	2,017	aA	1,788	aA
	1-MCP	1,740	bA	1,780	bA	1,749	bA	1,346	aA
<i>D</i> -Frutose (isomero 2)	Controle	1,665	bA	1,634	bA	1,599	bB	1,173	aA
	1-MCP	1,665	cA	1,203	bA	1,263	bA	0,796	aA
<i>D</i> -Glicose (isomero)	Controle	0,241	aA	0,435	bB	0,624	cA	0,576	cA
	1-MCP	0,241	aA	0,455	bcA	0,398	bA	0,488	cA
<i>D</i> -Manose e	Controle	0,159	aA	0,251	bA	0,345	cA	0,316	bcA
Glicose (isomero2)	1-MCP	0,159	aA	0,282	cA	0,229	bA	0,271	cA
	Controle	0,088	aA	0,089	aA	0,089	aA	0,099	aA
<i>D</i> -Sorbitol	1-MCP	0,088	abA	0,084	abA	0,097	bA	0,082	aA
	Controle	0,593	bA	0,589	bA	0,534	bB	0,253	aB
Sacarose	1-MCP	0,593	cA	0,421	bA	0,525	bcA	0,135	aA
	Controle	4,515	bA	5,175	bB	5,327	bB	4,341	aB
Açúcares totais	1-MCP	4,515	cA	4,25	bA	4,283	bA	3,144	aA

*Nd: composto não identificado.

Os resultados são representados em média e \pm desvio padrão ($n = 3$). Médias acompanhadas de mesma letra maiúscula não se diferenciaram entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$) e compararam entre si frutos controles (não tratados com 1-MCP) e frutos tratados com 1-MCP dentro da mesma atmosfera de armazenamento. Médias acompanhadas de mesma letra minúscula não se diferenciaram entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$) e compararam os diferentes tempos de armazenamento (0, 7, 30 e 180 dias).

Na safra S1, os frutos não tratados com 1-MCP tiveram o teor de açúcares totais semelhante para ambas atmosferas de armazenamento (AR e AC) (**Tabela 6**). Em contrapartida, os frutos tratados com 1-MCP se diferenciaram em relação ao teor de açúcares totais (**Tabela 6**).

Na safra S2, as atmosferas AR e AC não houve diferença significativa, e isso foi observado tanto para os frutos não tratados com 1-MCP quanto para os com 1-MCP. Destacando que os frutos não tratados com 1-MCP em AR e AC apresentaram aumento no teor de açúcares em comparação com a colheita (**Tabela 6**).

Tabela 7: Concentração de açúcares (mg de açúcar/ g de maçã seca) presentes na polpa de maçãs armazenadas por 180 dia em atmosfera refrigerada (AR) e atmosfera controlada (AC)

Compostos	Tratamento	Tempo (dias) – Colheita 2014		Compostos	Tratamento	Tempo (dias) - Colheita 2016					
		AR 180d	AC 180d			AR 180d	AC 180d				
D-Xilose (isomero1)	Controle	0,128	bB	0,116	aB	D-Xilose (isomero1)	Controle	0,093	bB	0,078	aB
	1-MCP	0,128	bA	0,115	aA		1-MCP	0,076	aA	0,080	bA
D-Xilose (isomero2)	Controle	0,047	bA	0,036	aA	D-Xilose (isomero2)	Controle	0,043	bB	0,027	aB
	1-MCP	0,051	bA	0,035	aA		1-MCP	0,026	aA	0,020	aA
D-Frutose (isomero1)	Controle	2,230	aA	2,406	bB	D-Frutose (isomero1)	Controle	1,788	aA	1,731	aA
	1-MCP	2,688	aA	1,906	aA		1-MCP	1,346	aA	1,497	aA
D-Frutose (isomero2)	Controle	1,517	bA	1,318	aA	D-Frutose (isomero2)	Controle	1,173	aB	0,972	aA
	1-MCP	1,558	aA	0,957	aA		1-MCP	0,796	aA	0,909	aA
Glicose (isomero1)	Controle	0,581	aA	0,870	bB	Glicose (isomero1)	Controle	0,576	aA	0,682	aA
	1-MCP	0,808	aA	0,699	aA		1-MCP	0,488	aA	0,538	aA
D-Manose e	Controle	0,329	aA	0,463	bB	D-Manose e	Controle	0,316	aA	0,373	aA
Glicose (isomero2)	1-MCP	0,457	aA	0,394	aA	Glicose(isomero2)	1-MCP	0,271	aA	0,300	aA
D-Sorbitol	Controle	0,115	aA	0,121	aB	D-Sorbitol	Controle	0,099	aA	0,099	aA
	1-MCP	0,129	aA	0,099	aA		1-MCP	0,082	aA	0,075	aA
Sacarose	Controle	0,326	aA	0,243	aA	Sacarose	Controle	0,253	bB	0,142	aA
	1-MCP	0,392	aA	0,150	aA		1-MCP	0,135	aA	0,207	bB
Açúcares totais	Controle	5,273	aA	5,573	aB	Açúcares totais	Controle	4,341	aB	4,104	aB
	1-MCP	6,211	bB	4,355	aA		1-MCP	3,22	aA	3,626	aA

*Os resultados são representados em média e \pm desvio padrão (n = 3). Médias acompanhadas de mesma letra maiúscula não se diferenciaram entre si pelo teste t ($p \leq 0.05$) e comparam entre si frutos controles (não tratados com 1-MCP) e frutos tratados com 1-MCP dentro da mesma atmosfera de armazenamento. Médias acompanhadas de mesma letra minúscula não se diferenciaram entre si pelo teste t ($p \leq 0.05$) e comparam as atmosferas de armazenamento AR e AC.

6. Discussão

6.1 Características físico-químicas gerais das maçãs

A redução na firmeza ocorre de forma natural durante o amadurecimento do fruto (BULENS et al., 2012; CASTAÑEDA et al., 2014). De modo que, a FP é considerada um indicador do amadurecimento em maçãs durante a pós-colheita, e sua redução está associada principalmente à degradação e modificações nos componentes da parede celular que acarretam uma redução na resistência do fruto (CASTAÑEDA et al., 2014).

As modificações de textura ocasionadas no fruto durante a maturação são normalmente reguladas pelo fito-hormônio etileno (GWANPUA et al., 2016). Estudos têm mostrado a importância da aplicação do 1-MCP em maçãs durante a pós-colheita para a manutenção da textura durante o armazenamento (BULENS et al., 2012; COSTA et al., 2010; GWANPUA et al., 2016; STORCH et al., 2015).

Esse efeito positivo do 1-MCP foi observado em ambas as safras estudadas (S1 e S2). Essa manutenção da firmeza dos frutos pode ser associada também à firmeza de polpa (FP) no momento da colheita. Maçãs colhidas com FP muito acima de 80N, ainda não estão com o seu desenvolvimento totalmente completo, comprometendo assim, a maturação do fruto durante a pós-colheita (GIRARDI et al., 2004). Já, os frutos colhidos com uma maturação mais avançada, ou seja, com FP inferior 70N não devem ser armazenados por longos períodos, pois o seu metabolismo está muito avançado e possivelmente já se tenha um grande aumento na síntese autocatalítica do fito-hormônio etileno (BENDER & LUNARDI, 2001). A colheita de maçãs cv. Gala com uma FP próxima a 80 N reduziu as perdas

nas características sensoriais e proporcionou frutos mais firmes e com maior teor de SS por um período mais prolongado (BULENS et al., 2012; GIRARDI et al., 2004), assim como foi mostrado nesse trabalho (**Figura 9**).

A ação do 1-MCP, preveniu a perda da FP, Acidez (AT) e os sólidos solúveis (SS) durante 180d em AR (**Tabela 3 e Figura 9**). De modo, que em a AC também gera esse resultado sem a presença do 1-MCP no mesmo período (**Tabela 3 e Figura 9**). Esses dados mostram ser desnecessário a aplicação do 1-MCP durante o armazenamento por até 180d em AC. Resultados semelhantes já foram relatos por BRACKMANN et al. (2010) e, segundo GWANPUA e colaboradores (2014), a baixa concentração de O₂ e alta concentração de CO₂ minimizam processos oxidativos da polpa do fruto e reduzem a biossíntese de etileno, contribuindo para a conservação dos frutos.

6.2 Transcritos relacionados à parede celular de maçãs em 180 dias de armazenamento mais 7 dias em TA

A maioria dos trabalhos (GHIANI et al., 2011; GWANPUA et al., 2014, 2016; LOUGHI et al., 2013; STORCH et al., 2015) que abordam o metabolismo de despolimerização de parede celular de frutas, dão ênfase a genes e enzimas, principalmente de degradação de pectina, como é o caso da endo e exo poligalacturonase, pectina metilesterase, β -galactosidases, pectatolases e arabinofuranosidases (GWANPUA et al., 2014; NOBILE et al., 2011; VELASCO et al., 2010). De fato, essas enzimas estão altamente envolvidas no amolecimento de frutos climatéricos (COSTA et al., 2010; YANG et al., 2013) e não climatéricos (VILLARREAL et al., 2010). Em maçãs,

os genes mais estudados são poligalacturonase (PG), pectina metilesterase (PME) e arabinofuranosidase (AF) (GWANPUA et al., 2016; PEGORARO et al., 2016; STORCH et al., 2015; 2017; TRUJILLO et al., 2012).

Estudos com maçãs têm mostrado que o *MdPGs* e *MdPMEs* são os genes que apresentam maior acúmulo transcricional durante o período de armazenamento (GWANPUA et al., 2014; 2016; WEI et al., 2010). Sendo que o *MdPME* tem uma maior atividade na fase inicial do amadurecimento, enquanto que o *MdPG* tem uma maior expressão na fase final (GWANPUA et al., 2014). Isso, se deve ao fato das PMEs catalizarem as reações de desmetilação da cadeia lateral do polímero de pectina, facilitando a posterior atuação das PGs na clivagem dos α -1,4-glicosídico do ácido D-galacturônico presentes na estrutura principal da pectina (LIU et al., 2017). O acúmulo transcricional dos *MdAFs* não se modifica durante o período de armazenamento. E assim, como relatado para o *MdPG*, ele tem sua maior atividade durante o período de *shelf life* (GWANPUA et al., 2014; WEI et al., 2010).

Nesse trabalho foram avaliados outros genes, que apresentaram uma resposta transcricional durante a análise de microarranjo. Três dos genes (*MdFLA2*, *MdGAUT9* e *MdUDP*) são putativamente relacionados à biossíntese da parede celular e os outros três (*MdAF3*, *MdBXL1* e *MdEXGT*) estão provavelmente envolvidos com a degradação da parede celular. Desse estudo se verificou que quando as maçãs recebem a aplicação de 1-MCP antes do armazenamento, há uma manutenção no aumento do acúmulo relativo de transcrito dos genes envolvidos com a biossíntese da parede celular. Em contraste, sem a aplicação do 1-MCP, há um aumento no acúmulo de transcritos de genes de degradação da parede celular. Esse resultado indica que o 1-MCP mantém uma provável melhora homeostase celular, já que são genes implicados na síntese da parede celular, fato que ocorre em

células, tecidos e órgãos em estágio de crescimento (HUERTA-OCAMPO et al., 2012; GIOVANNONI, 2007; NG et al, 2012; 2015; PANG et al., 2006).

Dentre os genes aqui estudados, o *MdEXGT* foi o que apresentou estar fortemente atuante em maçãs durante a pós-colheita, principalmente em AR e no final do armazenamento. Esse gene parece estar vinculado ao avanço do amadurecimento de maçãs, e pode estar diretamente relacionado com degradação dos componentes pécicos da parede celular, e, conseqüentemente, com aumento da perda de firmeza de polpa. Assim, como já relatado para o *MdPG* (GWANPUA et al., 2014; WEI et al., 2010). E o *MdAF3* não se mostrou muito ativo durante os seis meses de armazenamento. Esse resultado, vai ao encontro do relatado por Gwanpua e colaboradores (2014), que justificaram que esse gene não se faz expresso na presença do frio e principalmente quando há redução na síntese de etileno.

O fato dos frutos mantidos em atmosfera refrigerada e tratados com 1-MCP apresentaram uma redução do acúmulo de transcritos de biossíntese após seis meses de armazenamento, já era previsto. De modo que, ao final de armazenamentos prolongados, possivelmente ocorra a síntese de novos receptores do fito-hormônio etileno, e com isso, reestabelendo a cascata de sinalização do etileno e como consequência aumentando a transcrição de genes de degradação (GWANPUA et al., 2016).

6.3 Sacarídeos

Durante o armazenamento em atmosfera refrigerada se observou uma manutenção da pectina e dos açúcares até o primeiro mês de armazenamento. Isso era esperado, em virtude do frio reduzir o metabolismo do fruto, principalmente das enzimas catabólicas (HU et al., 2016). No final do armazenamento (180d) se observou uma redução simultânea da pectina e dos açúcares. Isso sugere que polissacarídeos estavam sendo degradados a açúcares e os mesmos estavam sendo, provavelmente, convertidos a subprodutos como alcoóis, aldeídos e ácidos orgânicos (FIDLER, 1967; NELSON & COX, 2011). Esses subprodutos são normalmente formados no final do amadurecimento do fruto e são responsáveis por alterações na textura e pelas características sensoriais, que às vezes são desagradáveis (SALAS et al., 2011; THEWES et al., 2015).

7. Considerações finais

Os genes estudados relacionados a biossíntese (*MdFLA2*, *MdGAUT9* e *MdUDP*) e degradação (*MdAF3*, *MdBXL1* e *MdEXGT*) de parede celular, responderam a presença do 1-MCP e as diferentes atmosferas de armazenamento. No entanto, se sugere que os três genes de biossíntese estudados se mostrou atuante na manutenção da firmeza de polpa. Dentre os genes de degradação da parede celular o gene *MdEXGT* se mostrou estar envolvido na despolimerização da parede celular e possivelmente estar relacionado com a progressão do amadurecimento dos frutos. Por fim cabe enfatizar a importância destes resultados em virtude de serem os primeiros relatos da expressão destes genes de biossíntese e do *MdEXGT* em maçãs durante o armazenamento pós-colheita. São necessários mais estudos para compreender a regulação da expressão destes genes e estabelecer quais outros que poderiam estar ligados à alteração da firmeza de polpa e o amadurecimento de maçã durante a pós-colheita.

8. Referências bibliográficas

ABPM – Brazilian Apple Growers and Exporters. Disponível em:

<http://www.abpm.org.br/wp-content/uploads/2018/06/Anuario_maca_2018.pdf> Acesso em: 01 de maio. 2019.

AgroFresh. Disponível em: <<https://www.agrofresh.com/>> Acesso em: 8 de dez. 2016.

AMARANTE, CVT.; ARGENTA, LC.; VIEIRA, MJ.; STEFFENS, CA. Changes of 1-MPC efficiency by delaying its postharvest application on 'Fuji suprema' apples. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.32, n.4, p.984-992, 2010. doi.org/10.1590/S0100-29452010005000131

ARGENTA, LC.; MATTHEIS, J; XUETONG, F. Delaying 'fuji' apple ripening by 1-mcp treatment and management of storage temperature. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.23, n.2, p.270-273, 2001. doi.org/10.1590/S0100-29452001000200013

ATMODJO, MA.; SAKURAGI, Y.; ZHU, X.; BURRELL, AJ.; MOHANTY, SS.; ATWOOD, JA.; ORLANDO, R.; SCHELLER, HV.; MOHNEN, D. Galacturonosyltransferase (GAUT)1 and GAUT7 are the core of a plant cell wall pectin biosynthetic homogalacturonan: galacturonosyltransferase complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.108, n.50, p.20225-30, 2011. doi.org/10.1073/pnas.1112816108

BAPAT, VA.; TRIVEDI, PK.; GHOSH, A.; SANE, VA.; GANAPATHI, TR.; NATH, P. Ripening of fleshy fruit: Molecular insight and the role of ethylene. **Biotechnology Advances**. v.28, n.1, p.94-107, 2010.

doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.10.002

BEN-TOV D, IDAN-MOLAKANDOV A, HUGGER A, BEN-SHLUSH I, GÜNL M, YANG B, USADEL B, HARPAZ-SAAD S. The role of COBRA-LIKE 2 function, as part of the complex network of interacting pathways regulating Arabidopsis seed mucilage polysaccharide matrix organization. **The Plant Journal**. v.94, n.3, p.497-512, 2018. doi.org/10.1111/tpj.13871

BENDER, RJ. & LUNARDI, R. Perdas qualitativas de maçãs cv. Gala em armazenamento refrigerado. **Revista Brasileira Fruticultura**. v.23, n.3, p.563-567, 2001. doi.org/10.1590/S0100-29452001000300023

BETHKE, G.; THAO, A.; XIONG, G.; LI, B.; SOLTIS, NE.; HATSUGAI, N.; HILLMER, RA.; KATAGIRI, F.; KLIEBENSTEIN, DJ.; PAULY, M.; GLAZEBROOK, J. Pectin biosynthesis is critical for cell wall integrity and immunity in Arabidopsis thaliana. **The Plant Cell**. v.28, n.2, p.537-557, 2016. doi.org/10.1105/tpc.15.00404

BRACKMANN, A. & SAQUET, AA. Armazenamento de maçã cv. Gala em atmosfera controlada. **Revista Brasileira de Agrociência**. v.1, n.2, p.55-60, 1995. doi.org/10.1590/S0103-84782003000400009

BRACKMANN, A.; MELLO, A.; VIZZOTTO, M.; NEUWALD, DA.; STEFFENS, CA. Temperatura e condição de atmosfera controlada na qualidade da maçã cultivar Gala. **Revista Brasileira de Agrociência**. v.6, n.3, p.197-199, 2000. doi.org/10.18539/CAST.V6I3.348

BRACKMANN, A.; HETTWER GIEHL, RF.; ANTES, RB.; NEUWALD, DA.; SESTARI, I.; PINTO, J. Controlled atmosphere-storage conditions for 'Royal Gala' apples of different sizes. **Ciência Rural**. v.35, p.1049-1053, 2005. doi.org/10.1590/S0103-84782005000500010

BRACKMAN, A.; WEBER, A.; PINTO, JAV.; NEUWALD, DA.; STEFFENS, CA. Postharvest quality maintenance of 'Royal Gala' and 'Galaxy'. **Ciência Rural**. v.38, n.9, p.2478-2484, 2008. doi.org/10.1590/S0103-84782008000900010

BRACKMANN, A.; ANESE, RO.; PINTO, JAV.; BOTH, V.; VENTURINI, TL.; SCHORR, MRW. Application of 1-methylciclopropene and ethylene absorption on 'Royal Gala' apple late harvested. **Ciencia Rural**. v.40, n.10, p.2074-2080, 2010. doi.org/10.1590/S0103-84782010005000157

BRACKMANN, A.; GASPERIN, AR.; BOTH, V.; PAVANELLO, EP.; SCHORR, MRW.; ANESE, RO. Application of 1-methylcyclopropene, initial low oxygen stress and storage in ultralow oxygen on Fuji apples quality. **Ciência Rural**. v..42, n.8, p.1386-1391, 2012. doi.org/10.1590/S0103-84782012000800009

BRUMMELL, DA.; HARPSTER, MH.; CIVELLO, PM.; PALYS, JM.; BENNETT, AB.; DUNSMUIR, P. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. **The Plant Cell**. v.11, n.11, p.2203-2217, 1999. doi.org/10.2307/3871019

BULENS, I.; VAN, B.; HERTOOG, ML.; DE PROFT, MP.; GEERAERD, AH.; NICOLAÏ, BART M. Protocol: An updated integrated methodology for analysis of metabolites and enzyme activities of ethylene biosynthesis. **Plant Methods**. v.7, p.17-17, 2011. doi.org/10.1186/1746-4811-7-17

BULENS, I.; VAN DE PB ; HERTOOG, M.; DE PROFT, MP.; GEERAERD, AH.; NICOLAI, BM. Influence of harvest time and 1-MCP application on postharvest ripening and ethylene biosynthesis of 'Jonagold' apple.

Postharvest Biology and Technology. v.72, p.11-19, 2012.

doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.05.002

CAO, Y.; TANG, X.; GIOVANNONI, J.; XIAO, F.; LIU, Y. Functional characterization of a tomato COBRA-like gene functioning in fruit development and ripening. **BMC Plant Biology**. v.12, n.1, p.211-226, 2012.

doi.org/10.1186/1471-2229-12-211.

CARPITA, NC.; RALPH, J.; MCCANN, MC. **The Cell Wall**. BUCHANAN, BB.; GRUISSEM, W.; JONES, RL., Biochemistry & molecular biology of plants. ed. 2^a, John Wiley & Sons, (2015), pp:45-108.

CASTAÑEDA, LMF.; BENDER, RJ.; SILVA, SJNS.; PEREIRA, C. Avaliação pós-colheita de maçãs cv. Fuji revestidas com solução filmogênica de quitosana. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**. v. 20, n. 1/2, p.108-117, 2014.

CELTON, J.M.; GAILLARD, S.; BRUNEAU, M.; PELLETIER, S.; AUBOURG, S.; MARTIN-MAGNIETTE, M.L.; NAVARRO, L.; LAURENS, F.; RENOU, J-P.

Widespread anti-sense transcription in apple is correlated with siRNA production and indicates a large potential for transcriptional and/or post-transcriptional control. **New Phytologist**. v. 203, n.1, p.287-299, 2014.

doi.org/10.1111/nph.12787

CHANG, C. Q&A: How do plants respond to ethylene and what is its importance? **BMC Biology**. v.14, n.7, p.1-7, 2016. doi.org/10.1186/s12915-016-0230-0

CHEN, C.; LUO, J.; QIN, W.; TONG, Z. Elemental analysis, chemical composition, cellulose crystallinity, and FT-IR spectra of *Toona sinensis* wood. **Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly**. v.145, n.1, p.175-185, 2014. doi.org/10.1007/s00706-013-1077-5

CHIRIBOGA, M.; RECASENS, I.; SCHOTSMANS, WC.; DUPILLE, E.; LARRIGAUDIÈRE, C. Cold-induced changes in ACC metabolism determine softening recovery in 1-MCP treated 'conference' pears. **Postharvest Biology and Technology**. v.68, p.78-85, 2012. doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.02.006

CORRENT, AR.; PARUSSOLO, A.; GIRARDI, CL.; ROMBALDI, CV. Effects of 1-methylcyclopropene on 'royal gala' apples stored in refrigerated air and controlled atmosphere. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.26, n.2, p.217-221, 2004. doi.org/10.1590/S0100-29452004000200009

COSTA, F.; WEG, W.; STELLA, S.; DONDINI, L.; PRATESI, D.; MUSACCHI, S.; SANSAVINI, S. Map position and functional allelic diversity of *Md-Exp7*, a new putative expansin gene associated with fruit softening in apple (*Malus x domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus communis*). **Tree Genetics & Genomes**. v.4, n.3, p.575-586, 2008. doi.org/10.1007/s11295-008-0133-5

COSTA, F.; ALBA, R.; SCHOUTEN, H.; SOGLIO, V.; GIANFRANCESCHI, L.; SERRA, S.; MUSACCHI, S.; SANSAVINI, S.; COSTA, G.; FEI, Z.; GIOVANNONI, J. Use of homologous and heterologous gene expression profiling tools to characterize transcription dynamics during apple fruit maturation and ripening. **BMC Plant Biology**. v.10, n.1, p.229-246, 2010. doi.org/10.1186/1471-2229-10-229.

DeELL, JR.; LUM, GB.; EHSANI-MOGHADDAM, B. Effects of multiple 1-methylcyclopropene treatments on apple fruit quality and disorders in controlled atmosphere storage. **Postharvest Biology and Technology**. v.111, p.93-98, 2016. doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.08.002

DU, Z.; ZHOU, X.; LING, Y.; ZHANG, Z.; SU, Z. agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. **Nucleic Acids Res.** v.38, p.W64-W70, 2010. <http://doi.org/10.1093/nar/gkq310>

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org/>> Acesso em: 16 de abril 2017.

FIDLER, J. C. The Metabolism of Acetaldehyde by Plant Tissues. **Journal of Experimental Botany**. v.19, n.1, p.41-51, 1968. doi.org/10.1093/jxb/19.1.41

GHIANI, A.; ONELLI, E.; AINA, R.; COCUCCI, M.; CITTERIO, S. A comparative study of melting and non-melting flesh peach cultivars reveals that during fruit ripening endopolygalacturonase (endo-PG) is mainly involved in pericarp textural changes, not in firmness reduction. **Journal of Experimental Botany**. v.62, n.11, p.4043-4054, 2011. doi.org/10.1093/jxb/err109

GIRARDI, C.L.; NACHTIGALL, G.R., PARUSSOLO, A. **Fatores pré-colheita que interferem na qualidade da fruta**. C.L. Girardi (Ed.), Frutas do Brasil maçã pós-colheita, Embrapa Informação Tecnológica, Brasília (2004), pp. 24-34.

GIOVANNONI, J.J. Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. **Current Opinion in Plant Biology**. v.10, n.3, 283-289, 2001. doi:10.1016/j.pbi.2007.04.008

GODOY, F.; BERMÚDEZ, L.; LIRA, B.S.; DE SOUZA, A.P; ELBL, P.; DEMARCO, D.; ALSEEKH, S.; INSANI, M.; BUCKERIDGE, M.; ALMEIDA, J.; GRIGIONI, G.; FERNIE, A.R.; CARRARI, F.; ROSSI, M.
Galacturonosyltransferase 4 silencing alters pectin composition and carbon partitioning in tomato. **Journal of Experimental Botany**. v. 64, n.8, pp.2449-2466, 2013. doi.org/10.1093/jxb/ert106.

GOULAO, LF.; SANTOS, J.; DE SOUSA, I.; OLIVEIRA, C. Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples. **Postharvest Biology and Technology**. v.43, n.3, p.307-318, 2007. doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.10.002

GOULAO, LF. & OLIVEIRA, CM. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. **Trends in Food Science & Technology**. v.19, n.1, p.4-25, 2008. doi:10.1016/j.tifs.2007.07.002

GUNES, G.; WATKINS, CB.; HOTCHKISS, JH. Effects of irradiation on respiration and ethylene production of apple slices. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.80, n.8, p.1169-1175, 2000.
doi.org/10.1002/1097-0010(200006)80:8<1169::AID-JSFA614>3.0.CO;2-P

GWANPUA, SG.; VERLINDEN, BE.; HERTOOG, MLATM.; BULENS, I.; VAN DE POEL, B.; VAN IMPE, J.; NICOLAÏ, BM.; GEERAERD, AH. Kinetic modeling of firmness breakdown in 'Braeburn' apples stored under different controlled atmosphere conditions. **Postharvest Biology and Technology**. v.67, p.68-74, 2012. doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.12.010

GWANPUA, SG.; VAN BS.; VERLINDEN, BE.; CHRISTIAENS, S.; SHPIGELMAN, A.; VICENT, V.; KERMANI, ZJ.; NICOLAI, BM.; HENDRICKX, M.; GEERAERD, A. Pectin modifications and the role of pectin-degrading enzymes during postharvest softening of Jonagold apples. **Food Chemistry**. v.158, n.1, p.283-291, 2014. doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.138.

GWANPUA, SG.; MELLIDOU, I.; BOECKX, J.; KYOMUGASHO, C.; BESSEMANS, N.; VERLINDEN, BE.; HERTOOG, MAARTEN LATM.; HENDRICKX, M.; NICOLAI, BM.; GEERAERD, AH. Expression analysis of candidate cell wall-related genes associated with changes in pectin biochemistry during postharvest apple softening. **Postharvest Biology and Technology**. v.112, p.176-185, 2016. doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.09.034

HO, QT.; VERBOVEN, P.; VERLINDEN, BE.; SCHENK, A.; NICOLAÏ, BM. Controlled atmosphere storage may lead to local ATP deficiency in apple. **Postharvest Biology and Technology**. v.78, p. 103-112, 2013. doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.12.014

HU, W.; SUN, D.-W.; PU, H.; PAN, T. Recent developments in methods and techniques for rapid monitoring of sugar metabolism in fruits. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v.15, n.6, p.1067-1079, 2016. doi.org/10.1111/1541-4337.12225

HUERTA-OCAMPO, J.Á.; OSUNA-CASTRO, J.A.; LINO-LÓPEZ, G.J.; BARRERA-PACHECO, A., MENDOZA-HERNÁNDEZ, G.; DE LEÓN-RODRÍGUEZ, A.; ROSA, A.P.B. Proteomic analysis of differentially accumulated proteins during ripening and in response to 1-MCP in papaya fruit. **Journal of Proteomics**. v.75, n.7, p.2160-2169, 2012. doi.org/10.1016/j.jprot.2012.01.015

JOHNSTON, JW.; HEWETT, EW.; HERTOOG, ML. Postharvest softening of apple (*Malus x domestica*) fruit: a review. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**. v.30. n.3, p.145-160, 2002. doi.org/10.1080/01140671.2002.9514210

JU, C. & CHANG, C. Mechanistic insights in ethylene perception and signal transduction. **Plant Physiology**. V.169, n.1, p.85-96, 2015. Doi.org/10.1104/pp.15.00845

JUNIOR, CJFO.; BRAGA, MR.; BUCKERIDGE, MS. Isolamento de oligossacarídeos de xilogucano de dicotiledôneas através de hidrólise enzimática e cromatografia de exclusão molecular. **Revista brasileira de botânica**. V.29, n.3, p.391-397, 2006.

KASIRAJAN L, HOANG NV, FURTADO A, BOTH A FC, HENRY RJ. Transcriptome analysis highlights key differentially expressed genes involved in cellulose and lignin biosynthesis of sugarcane genotypes varying in fiber content. **Scientific Reports**. v.8, n.1, p.11612-11628, 2018. doi.org/10.1038/s41598-018-30033-4.

KITTEMANN, D.; MCCORMICK, R.; NEUWALD D.A. Effect of high temperature and 1-MCP application or dynamic controlled atmosphere on energy savings during apple storage. **European Journal of Horticultural Science**. v.80, n.1, p.33-38, 2015. doi.org/10.17660/eJHS.2015/80.1.5

KOUBAA, M.; MGHAIETH, S.; THOMASSET, B.; ROSCHER, A. Gas chromatography–mass spectrometry analysis of ¹³C labeling in sugars for metabolic flux analysis. **Analytical Biochemistry**. v.425, n.2, p.183-188, 2012. doi.org/10.1016/j.ab.2012.03.020.

LI, L.; ZHU, B.; FU, D.; LUO, Y. RIN transcription factor plays an important role in ethylene biosynthesis of tomato fruit ripening. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.91, n.13, p.2308-2314, 2011. doi.org/10.1002/jsfa.4475

LI, M.; FENG, F.; CHENG, L. Expression patterns of genes involved in sugar metabolism and accumulation during apple fruit development. **PLoS ONE**. v.7, n.3, p.e33055, 2012. doi.org/10.1371/journal.pone.0033055

LI, P.; LIU, Y.; TAN, W.; CHEN, J.; ZHU, M.; LV, Y.; LIU, Y.; YU, S.; ZHANG, W.; Cai, H. Brittle Culm 1 encodes a COBRA-like protein involved in secondary cell wall cellulose biosynthesis in sorghum. **Plant Cell Physiology**. v.60, n.4, p.788-801, 2018. doi.org/10.1093/pcp/pcy246

LIAOTRAKOON, W.; BUGGENHOUT, SV.; CHRISTIAENS, S.; HOUBEN, K.; CLERCQ, ND.; DEWETTINCK, K.; HENDRICKX, ME. An explorative study on the cell wall polysaccharides in the pulp and peel of dragon fruits (*Hylocereus* spp.). **European Food Research and Technology**. v.237, n.3, p.341-351, 2013. doi.org/10.1007/s00217-013-1997-7

LIN, Q.; WANG, C.; DONG, W.; JIANG, Q.; WANG, D.; LI, S.; CHEN, M.; LIU, C.; SUN, C.; CHEN, K. Transcriptome and metabolome analyses of sugar and organic acid metabolism in Ponkan (*Citrus reticulata*) fruit during fruit maturation. **Gene**. v.554, n.1, p.64-74, 2015. doi.org/10.1016/j.gene.2014.10.025

LISEC, J.; SCHAUER, N.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A.R. Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants.

Nature Protocols. v.1, n.1, p.387-396, 2006. doi.org/10.1038/nprot.2006.59

LIU, C.-Q.; HU, K.-D.; LI, T.-T.; YANG, Y.; YANG, F.; LI, Y.-H.; ZHANG, H.

Polygalacturonase gene pgxB in *Aspergillus niger* is a virulence factor in apple fruit. **PLOS ONE.** v.12, n.3, p.e0173277- e0173290F, 2017.

doi.org/1371/journal.pone.0173277

LONGHI, S.; HAMBLIN, M.T.; TRAINOTTI, L.; PEACE, C.P.; VELASCO, R.;

COSTA, F. A candidate gene-based approach validates Md-PG1 as the main responsible for a QTL impacting fruit texture in apple (*Malus x domestica*

Borkh). **BMC plant biology.** v.13, n.4, p.37-50, 2013. doi.org/10.1186/1471-2229-13-37

MACMILLAN, CP.; MANSFIELD, SD.; STACHURSKI, ZH.; EVANS, R.;

SOUTHERTON, SG. Fasciclin-like arabinogalactan proteins: specialization for stem biomechanics and cell wall architecture in *Arabidopsis* and

Eucalyptus. **Plant Journal.** v.62, n.4, p.689-703, 2010.

doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04181.x

MAXWELL, EG.; BELSHAW, NJ.; WALDRON, KW.; MORRIS, VJ. Pectin –

An emerging new bioactive food polysaccharide. **Trends in Food Science & Technology.** v.24, n.2, p.64-73, 2012. doi.org/10.1016/j.tifs.2011.11.002

MAZZURANA, ER.; ARGENTA, LC.; DO AMARANTE, CVT.; STEFFENS,

CA. Potential benefits of temperature increase during storage under controlled atmosphere of 'gala' apples treated with 1-MCP/Potenciais

benefícios do aumento da temperatura de armazenagem em atmosfera

controlada de macas 'gala' tratadas com 1-MCP1. **Revista Brasileira de**

Fruticultura. v.38, n.1, p.43-53, 2016. doi.org/10.1590/0100-2945-237/14

MOURA, Renata Silva. **Perfil de expressão diferencial de proteínas associadas às alterações pós-colheita em maçãs cv. Gala, clone Baigent**. 2011. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Pelotas. Pelotas. 2011.

NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª. Ed. Artmed, Porto Alegre – RS, 2011. p. 533.

NG, JKT.; SCHRÖDER, R.; SUTHERLAND, PW.; HALLETT, IAN C.; HALL, MI.; PRAKASH, R.; SMITH, BG.; MELTON, LD.; JOHNSTON, JW. Cell wall structures leading to cultivar differences in softening rates develop early during apple (*Malus x domestica*) fruit growth. **BMC Plant Biology**. v.13, p.183-183, 2013. doi.org/10.1186/1471-2229-13-183

NG, JKT.; SCHRÖDER, R.; BRUMMELL, DA.; SUTHERLAND, PW.; HALLETT, IC.; SMITH, BG.; MELTON, LD.; JOHNSTON, JW. Lower cell wall pectin solubilisation and galactose loss during early fruit development in apple (*Malus x domestica*) cultivar ‘Scifresh’ are associated with slower softening rate. **Journal of Plant Physiology**. v.176, p.129-137, 2015. doi.org/10.1016/j.jplph.2014.12.012

NIU E, SHANG X, CHENG C, BAO J, ZENG Y, CAI C, DU X, GUO W. Comprehensive Analysis of the COBRA-Like (COBL) gene family in *Gossypium* identifies two COBLs potentially associated with fiber quality. **PLoS One**. v.10, n.12, p.e0145725- e0145756, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0145725

NOBILE, PM.; WATTEBLED, F.; QUECINI, V.; GIRARDI, CL.; LORMEAU, M.; LAURENS, F. Identification of a novel α -L-arabinofuranosidase gene associated with mealiness in apple. **Journal of Experimental Botany**. v.62, n.12, p.4309-4321, 2011. doi.org/10.1093/jxb/err146

NOCK, JF. & WATKINS, CB. Repeated treatment of apple fruit with 1-methylcyclopropene (1-MCP) prior to controlled atmosphere storage.

Postharvest Biology and Technology. v.79, p.73-80, 2013.

doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.01.002

PANG, X.-M.; NADA, K.; LIU, J.-H.; KITASHIBA, H.; HONDA, C.; YAMASHITA, H.; MORIGUCHI, T. Interrelationship between polyamine and ethylene in 1-methylcyclopropene treated apple fruits after harvest.

Physiologia Plantarum. v.128, n.2, p.351-359, 2006. doi:10.1111/j.1399-3054.2006.00748.x

PAULL, RE.; GROSS, K.; QIU, Y. Changes in papaya cell walls during fruit ripening. **Postharvest Biology and Technology.** v.16, n.1, p.79-89, 1999.

doi.org/10.1016/S0925-5214(98)00100-8

PEGORARO, C.; STORCH, TT.; CRIZEL, GR.; ROMBALDI, CV.; GIRARDI, CL. Identification of biomarkers associated to 'Gala' apples ripening and postharvest quality. **Comunicata Scientiae.** v.7, n.4, pp:494-503, 2016.

REBOUL, R., GESERICK, C., PABST, M., FREY, B., WITTMANN, D., LUTZ-MEINDL, U., LÉONARD, R., TENHAKEN, R. Down-regulation of UDP-glucuronic acid biosynthesis leads to swollen plant cell walls and severe developmental defects associated with changes in pectic polysaccharides.

The Journal of Biological Chemistry. v.286, n.46, p.39982-39992, 2011.

doi.org/10.1074/jbc.M111.255695

ROSE, JOCELYN K. C.; LEE, HOWARD H.; BENNETT, ALAN B. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v.94, n.11, pp.5955-5960, 1997.

ROUDIER, F.; SCHINDELMAN, G.; DESALLE, R.; BENFEY, P.N. The COBRA family of putative GPI-anchored proteins in Arabidopsis. A new fellowship in expansion. **Plant Physiology**. v.130, n.2, p.538-549, 2002. doi.org/10.1104/pp.007468

SALAS, N. A.; MOLINA-CORRAL, F. J.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; OTERO, A.; SEPULVEDA, D. R.; OLIVAS, G. I. Volatile production by "Golden Delicious" apples is affected by preharvest application of aminoethoxyvinylglycine. **Scientia Horticulturae**. v.130, n.2, p.436-444, 2011. doi.org/10.1016/j.scienta.2011.07.017

SAQUET, AA.; BRACKMANN, A.; STORCK, L. Armazenamento de maçã 'Gala' sob diferentes temperaturas e concentrações de oxigênio e gás carbônico Storage of 'Gala' apple under different temperatures and carbon dioxide and oxygen concentrations. **Ciência Rural**. v.27, n.3, p.399-405, 1997. doi.org/10.1590/S0103-84781997000300006.

SCOLARO, AMT.; ARGENTA, LC.; AMARANTE, CVT.; PETRI, LJ.; HAWERROTH, FJ. Preharvest control of 'Royal Gala' apple fruit maturation by the inhibition of ethylene action or synthesis. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.37, n.1, p.38-47, 2015. doi.org/10.1590/0100-2945-010/14

SEIFERT, GJ. & ROBERTS, K. The biology of arabinogalactan proteins. **Annual Review Plant Biology**. v.58, p.137-161, 2007. doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103801

SHAFIQ, M.; SINGH, Z.; KHAN, A.; SHAFIQ, M. Delayed harvest and cold storage period influence ethylene production, fruit firmness and quality of 'Cripps Pink' apple. International. **Journal of Food Science and Technology**. v.46, n.12, p.2520-2529, 2011. doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02776.x

SMITH, C.J.; WATSON, C.F.; MORRIS, P.C.; BIRD, C.R.; SEYMOUR, G.B.; GRAY, J.E.; ARNOLD, C.; TUCKER, G.A.; SCHUCH, W.; HARDING, S. Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. **Plant Molecular Biology**. v.14, n.3, p. 369-379, 1990. doi.org/

STERLING, JD.; ATMODOJO, MA.; INWOOD, SE.; KOLLI, VSK.; QUIGLEY, HF.; HAHN, MG.; Mohnen, D. Functional identification of an Arabidopsis pectin biosynthetic homogalacturonan galacturonosyltransferase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**. v.103, n.13, p.5236-5242, 2006. doi.org/10.1073/pnas.0600120103

STORCH, TT.; FINATTO, T.; PEGORARO, C.; DAL CERRO, J.; LAURENS, F.; ROMBALDI, CV.; QUECINI, V.; GIRARDI, CL. Ethylene-dependent regulation of an α -L-arabinofuranosidase is associated to firmness loss in 'Gala' apples under long term cold storage. **Food Chemistry**. v.182, n.1, p.111-119, 2015. doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.123

STORCH, TT.; FINATTO, T.; BRUNEAU, M.; ORSEL-BALDWIN, M.; RENO, J-P.; ROMBALDI, C.V.; QUECINI, V.; LAURENS, F.; GIRARDI, C.L. Contrasting transcriptional programs control postharvest development of apples (*Malus x domestica* Borkh.) submitted to cold storage and ethylene blockage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.65, n.35, p.7813-7826, 2017. doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01425

TATEISHI A. β -Galactosidase and α -L-arabinofuranosidase in cell wall modification related with fruit development and softening. **Journal of the**

Japanese Society for Horticultural Science. v.77, n.4, p.329-340, 2008.
doi.org/10.2503/jjshs1.77.329

TEMPLE, H.; SAEZ - AGUAYO, S.; REYES, FC; ORELLANA, A. The inside and outside: topological issues in plant cell wall biosynthesis and the roles of nucleotide sugar transporters. **Glycobiology.** v.26, n.9, p.913-925, 2016.
doi.org/10.1093/glycob/cww054

THEWES, FR.; BOTH, V.; BRACKMANN, A.; WEBER, A.; DE OLIVEIRA ANESE, R. Dynamic controlled atmosphere and ultralow oxygen storage on 'Gala' mutants quality maintenance. **Food Chemistry.** v.188, n.1, p.62-70, 2015.a doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.128

THEWES, FR.; BOTH, V.; BRACKMANN, A.; FERREIRA, DF.; WAGNER, R. 1-methylcyclopropene effects on volatile profile and quality of 'Royal Gala' apples produced in Southern Brazil and stored in controlled atmosphere. **Ciencia Rural.** v.45, n.12, p.2259-2267, 2015.b doi.org/10.1590/0103-8478cr20141613

TRUJILLO, DI.; MANN, SH.; TONG, CBS. Examination of expansin genes as related to apple fruit crispness. **Tree Genetics & Genomes.** v.8, n.1, p.27-38, 2012. doi.org/10.1007/s11295-011-0417-z

UEHARA, Y.; TAMURA, S.; MAKI, Y.; YAGYU, K.; MIZOGUCHI, T.; TAMIAMI, H.; IMAI, T.; ISHII, T.; OHASHI, T.; FUJIYAMA, K.; ISHIMIZU, T. Biochemical characterization of rhamnosyltransferase involved in biosynthesis of pectic rhamnogalacturonan I in plant cell wall. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v.486, n.1, p.130-136, 2017.
doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.012

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, JAM. Primer3Plus an enhanced web interface to Primer3.

Nucleic Acids Research. v.35, p.W1–W4, 2007.

doi.org/10.1093/nar/gkm306

VELASCO, R.; ANDREY ZHARKIKH, A.; AFFOURTIT, J.; DHINGRA, A.; CESTARO, A.; KALYANARAMAN, A.; FONTANA, P.; BHATNAGAR, SK.; TROGGIO, M.; PRUSS, D.; SALVI, S.; PINDO, M.; BALDI, P.; CASTELLETTI, S.; CAVAIUOLO, M.; COPPOLA, G.; COSTA, F.; COVA, V.; DAL RI, A.; GOREMYKIN, V.; KOMJANC, M.; LONGHI, S.; MAGNAGO, P.; MALACARNE, G.; MALNOY, M.; MICHELETTI, D.; MORETTO, M.; ERAZZOLLI, M.; SI-AMMOUR, A.; VEZZULLI, S.; ZINI, E.; ELDREDGE, G.; LISA M FITZGERALD, LM.; GUTIN, N.; GARDINER, SE.; SKOLNICK, M.; MICHAEL EGHOLM, M.; PEER, YV; SALAMINI, F.; VIOLA, R. The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). **Nature Genetics.** v.42, p.833-839, 2010. doi.org/10.1038/ng.654.

VICENTE, AR.; SALADIÉ, M.; ROSE, J.; LABAVITCH, J. The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: looking to the future. **Journal of the Science of Food and Agriculture.** v.87, p.1435-1448, 2007. doi.org/10.1002/jsfa.2837

VILLALOBOS-ACUÑA, MG.; BIASI, WV.; FLORES, S.; JIANG, C.; REID, MS.; WILLITS, NH.; MITCHAM, EJ. Effect of maturity and cold storage on ethylene biosynthesis and ripening in 'Bartlett' pears treated after harvest with 1-MCP. **Postharvest Biology and Technology.** v.59, n.1, p.1-9, 2011. doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.08.001

VILLARREAL, NM.; ROSLI, HG.; MARTÍNEZ, GA.; CIVELLO, PM. Polygalacturonase activity and expression of related genes during ripening of strawberry cultivars with contrasting fruit firmness. **Postharvest Biology and Technology.** v.47, n.2, pp.141-150, 2008. doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.06.011

WEI, J.; MA, F.; SHI, S.; QI, X.; ZHU, X.; YUAN, J. 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, n.2, p.147-154, 2010. doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.12.003

YANG, X.; SONG, J.; CAMPBELL-PALMER, L.; FILLMORE, S.; ZHANG, Z. Effect of ethylene and 1-MCP on expression of genes involved in ethylene biosynthesis and perception during ripening of apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**. v.78, p.55-66, 2013. doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.11.012

YAPO, BM. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins - A new hypothetical model. **Carbohydrate Polymers**. v.86, n.2, p.373-385, 2011. doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.05.065

ZAMBIAZI, R. C. **Análise físico química de alimentos**. Pelotas: Ed. Universitária/UFPEL, pp.202, 2010.

ZENG, Y. & YANG, T. RNA Isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**. v.20, n.4, p.417a-417e, 2002. doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.025

ZHANG, W.; ZHANG, X.; WANG, Y.; ZHANG, N.; GUO, Y.; REN, X.; ZHAO, Z. Potassium fertilization arrests malate accumulation and alters soluble sugar metabolism in apple fruit. **Biology Open**. v.7, n.12, p.1-21 ,2018. doi.org/10.1242/bio.024745

ZHU, Z.; LIU, R.; LI, B.; TIAN, S. Characterisation of genes encoding key enzymes involved in sugar metabolism of apple fruit in controlled atmosphere

storage. **Food Chemistry**. v.141, n.4, p.3323-3328, 2013.
doi.org/10.1007/BF02772130