

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Ação do etileno no acúmulo diferencial de proteínas
durante o amadurecimento de frutas de maçãs, cv.**

Gala, clone Baigent

Breno Xavier Gonçalves

Pelotas, 2016

Breno Xavier Gonçalves

Ação do etileno no acúmulo diferencial de proteínas durante o amadurecimento de frutas de maçãs, cv. Gala, clone Baigent

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do Conhecimento: Biotecnologia Vegetal).

Orientador: Cesar Valmor Rombaldi

Coorientador: César Luis Girardi

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G635a Gonçalves, Breno Xavier

Ação do etileno no acúmulo diferencial de proteínas durante o amadurecimento de frutas de maçãs, cv. gala, clone baigent / Breno Xavier Gonçalves ; Cesar Valmor Rombaldi, orientador ; César Luis Girardi, coorientador. — Pelotas, 2016.

54 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1 . Maçã. 2. Proteômica. 3. Etileno. 4. Amadurecimento de frutas. I. Rombaldi, Cesar Valmor, orient. II. Girardi, César Luis, coorient. III. Título.

CDD : 634.11

Elaborada por Maria Beatriz Vaghetti Vieira CRB: 10/1032

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. César Luis Girardi (Embrapa Uva e Vinho)

Prof. Dr^a. Camila Pegoraro (UFPel, FAEM)

Prof. Dr^a. Luciana Bicca Dode (UFPel, CDTec)

Prof. Dr. Luciano Pinto (UFPel, CDTec)

Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi (Orientador, UFPel, CDTec e DCTA)

Para minha família, com carinho e gratidão.

Dedico.

Agradecimentos

Ao Ser Supremo que permitiu-me seguir em frente;

À Universidade Federal de Pelotas e Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de realizar meus estudos de mestrado;

À Capes pela concessão da bolsa de estudos. E à Embrapa Uva e Vinho que possibilitou a realização deste trabalho;

Ao Professor Deschamps, pelo qual fui apresentado à biotecnologia nos primórdios de minha graduação;

À Professora Luciana Dode pela confiança e ensinamentos como orientadora durante meu curso de graduação em Agronomia;

Ao professor Luciano Pinto pelo apoio durante o mestrado;

Ao meu orientador Cesar Rombaldi por acreditar no meu potencial, contribuindo para meu crescimento pessoal e profissional, com seu conhecimento, nunca medindo esforços para auxiliar no que fosse necessário;

Ao co-orientador César Girardi pela oportunidade de desenvolver o projeto de dissertação nas dependências da Embrapa;

À Camila pelo apoio diário no laboratório, sempre pronta para tirar minhas dúvidas;

Aos colegas de laboratório de Pós-Colheita, Tati, Juliele, Isadora; Gabriel;

Aos colegas da pousada Gisele, Cleber, Tiago, Juliele, Giovana, Adriele, Marcelo;

Às estagiárias, Ana e Patrícia pela ajuda no laboratório;

À Yohanna pelo carinho, compreensão e palavras de entusiasmo;

Aos meus pais e minha irmã por todo o apoio, confiança durante todos esses anos e pelos princípios passados, os quais usei como escada para chegar até aqui.

“Se cheguei até aqui, foi porque me apoiei no ombro dos gigantes”

Isaac Newton

Resumo

Gonçalves, Breno. **Ação do etileno no acúmulo diferencial de proteínas durante o amadurecimento de frutas de maçãs, cv. Gala.** 2016. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Maçãs da cultivar Gala são caracterizadas por processo de maturação/amadurecimento climatérico, ou seja, para haver a transição do estágio pré-climatérico para o amadurecimento, a maioria dos atributos de qualidade sensorial (textura, síntese de aromas e pigmentos, redução da acidez) são dependentes ou parcialmente dependentes do etileno. Nesse contexto, buscou-se identificar proteínas diferentemente acumuladas durante a transição da maturação para o amadurecimento, em condições que inibem ou não a ação do etileno. Para isso, utilizaram-se maçãs, cv. Gala, clone Beigent, colhidas no estágio pré-climatérico, que foram mantidas em temperatura ambiente por 12 dias, após a aplicação ou não do 1-MCP. Como variáveis dependentes avaliou-se a firmeza de polpa, o teor de sólidos solúveis totais e acidez total titulável, o acúmulo de transcritos do gene *ACCO1*, a produção de etileno, e proteínas diferentemente acumuladas. Como esperado, a aplicação de 1-MCP contribuiu para preservar a firmeza de polpa e da acidez total, assim como para reduzir significativamente a produção de etileno, provavelmente pela redução da transcrição do gene *ACCO1* (redução de 3,5 vezes nos níveis de transcritos em relação às maçãs que não receberam 1-MCP), e consequente redução da síntese da *ACCO1* (16 vezes menos em relação às maçãs que não receberam 1-MCP). Pela análise de proteínas, foram visualizados 200 spots, dos quais, 15 diferentemente expressos. Além das proteínas relacionadas com a biossíntese de etileno e metabolismo primário, foram também identificadas proteínas envolvidas no processo de detoxificação e defesa, bem como proteínas reguladoras, a exemplo da 14-3-3 Family protein. Dessa forma, a técnica de proteômica, além de permitir a identificação de proteínas em rotas clássicas, permite identificar proteínas associadas em novos processos relacionados ao amadurecimento de maçãs.

Palavras-chave: Maçã, Etileno, amadurecimento de frutas, Proteômica.

Abstract

Gonçalves, Breno. **Ethylene Action in differential protein accumulation during apple fruits ripening, cv. Gala.** 2016. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Apple fruits (c.v. Gala), are characterized by climacteric ripening, thus, to bring about the transition from the pre-climacteric to the maturation stage and produce the most of sensory quality attributes (texture, synthetic flavor and pigments and reduction of acidity), this fruits are ethylene dependent. In this context, we investigated the differently accumulated proteins in the ripening process with ethylene inhibit and with ethylene action not inhibited. For this, we used Gala apples, Beigent, clone collected in pre-climacteric stage and kept at room temperature for 12 days after application or not of 1-MCP. As dependent variables we evaluated firmness, total soluble solids, titratable acidity, transcripts accumulation of *ACCO1* gene, ethylene production and the differently accumulated proteins. As expected, the application of 1-MCP contributed to maintain the firmness and the total acidity as well as significantly reduce of ethylene production, probably by reducing the transcription of *ACCO1* gene (3.5-fold compared to apples without MCP-1), and consequently decrease synthesis of *ACCO1* protein (16-fold compared to apple fruits without 1-MCP). We found 200 spots, which 15 differently expressed. We found proteins related to the ethylene biosynthesis and primary metabolism. Further, were also identified proteins involved in detoxification and defense process, as well as regulatory proteins such as 14-3-3 Family Protein. Overall, this proteomic investigation provides a contribution towards better understanding of the regulatory networks involved in fruit ripening process, which could help future studies of apple breeding.

Keywords: Apple, Ethylene, Fruit Ripening, Proteomics.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Produção de etileno de maçãs, tratadas e não tratadas com 1-MCP, amadurecidas à temperatura ambiente, durante 12 dias..31
- Figura 2.** Perfil transcricional do gene *ACCO1* (Uniprot: Q00985) em maçãs, com e sem aplicação de 1-MCP, armazenados em temperatura ambiente durante 12 dias32
- Figura 3.** 15 *spots* proteicos diferencialmente expressos (uso do equipamento Synapt-G2-LC-MSE), entre maçãs tratadas e não tratadas com 1-MCP, logo após a colheita e com amadurecimento em temperatura ambiente por 12 dias..34
- Figura 4.** Níveis de acúmulo relativo de proteínas em maçãs, tratadas e não tratadas com 1-MCP, e armazenadas em temperatura ambiente por 12 dias.38
- Figura 5.** Alinhamentos das sequências de aminoácidos das proteínas *ACCO1* (*spots* 6303, 9203, 6302 e 5303) e HSPs (*spots* 6902 e 6903).39

Lista de Tabelas

Tabela 1. Firmeza de polpa, sólidos solúveis totais (SST) e acidez titulável (AT) de maçãs tratadas e não tratadas com 1-MCP, e armazenadas à temperatura ambiente, durante 12 dias.....30

Tabela 2. Lista de proteínas diferencialmente expressas em frutas de maçã tratadas e não tratadas com 1-MCP armazenadas a temperatura ambiente por 12 dias. As proteínas foram identificadas por cromatografia e espectrofotometria de massas (Synapt-G2-LC-MSE).....40

Lista de Abreviaturas

- 1-MCP - 1-metilciclopropeno
- 2D - Eletroforese Bidimensional
- ABPM – Associação Brasileira de Produtores de Maçã
- ACCO1 - 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidase
- AT – Acidez Titulável
- CHAPS - 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
- DTT - Ditioneitol
- EDTA - Ácido etilendiamino tetra-acético
- FAO – Food and Agriculture Organization of United States (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)
- FP – Firmeza de Polpa
- GDR – Genome Database for Rosaceae
- HSP – Heat Shock Protein
- IEF – Focalização isoeletrica
- MDH – Malato desidrogenase
- NCBI - National Center for Biotechnology Information
- pI – Ponto isoeletrico
- PR-5 – Pathogenesis-Related Protein 5
- PVPP - Polivinilpirrolidona
- RuBisCo – Ribulose Bifosfato Carboxilase
- SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
- SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em SDS)
- SST – Sólidos Solúveis Totais
- TCA –Ácido tricloroacetico
- UniProt - Universal Protein Resource

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Maçã	20
2.2 1-MCP X Etileno.....	21
2.3 Proteômica em frutíferas e pós-colheita de frutos.....	21
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo Geral	23
3.2 Objetivos Específicos	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Material vegetal e tratamento.....	24
4.2 Análises Físico-Químicas.....	24
4.2.1 Firmeza de polpa, sólidos solúveis totais, acidez total titulável	24
4.3 Produção de Etileno.....	25
4.4 Expressão quantitativa (real time PCR) do gene ACCO1	25
4.5 Análise de Proteômica	25
4.6 Análises de Bioinformática	28
4.7 Desenho experimental e análise estatística.....	28
5 RESULTADOS	30
5.1 Firmeza de polpa, concentração de sólidos solúveis totais e da acidez total titulável de maçãs, com e sem aplicação de 1-MCP, durante o amadurecimento em temperatura ambiente	30
5.2 Produção de etileno de maçãs, com e sem aplicação de 1-MCP, durante o amadurecimento em temperatura ambiente	31
5.3 Perfil transcricional do gene codificador de <i>ACCO1</i>	32
5.4 Proteínas diferencialmente acumuladas em maçãs, com e sem aplicação de 1-MCP, durante o amadurecimento em temperatura ambiente	33

5.5 Alinhamentos das sequências de aminoácidos	38
6 DISCUSSÃO	41
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
8 REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO GERAL

A colheita de maçã (*Malus x domestica* Borkh.) ocorre na região sul do Brasil, entre os meses de janeiro e abril (GIRARDI et al., 2002). Sendo assim, para suprir a demanda do mercado ao longo do ano se faz necessário que a fruta seja armazenada de modo que seja preservada a qualidade, bem como as características organolépticas desejáveis para consumo. A maçã é classificada como fruta climatérica, ou seja, apresenta um pico na respiração e produção de etileno durante o processo de amadurecimento (pós-colheita), resultando em um desverdeamento, redução da acidez e formação de compostos voláteis.

A produção de maçãs, bem como a maioria das frutas, caracteriza-se pela sazonalidade, mas a demanda de consumo ocorre durante o ano todo. Para conciliar esse descompasso de realidade e necessidade, há duas alternativas principais: i) deslocamento do produto entre regiões de produção; e/ou, ii) desenvolvimento de princípios e métodos que estendam o período de conservação (MORALES et al., 2010). No primeiro caso, as demandas de tecnologias mais performantes de armazenamento são menos requisitadas, tendo em vista que, no caso específico de maçãs, que de modo geral têm bom potencial de conservação, facilmente se pode conservar essa fruta por períodos de até três a quatro meses com o uso de refrigeração (BRACKMANN et al., 2004). Nessas condições, em que não se estende excessivamente o período de estocagem, normalmente se têm maçãs de qualidade sensorial superior (STANICH et al., 2014). Porém, no contexto mercadológico nacional, e não diferente em outros países, há necessidade de se armazenarem maçãs por períodos de 8 a 12 meses, de modo a se fechar o ciclo de oferta durante todo o ano. Para isso, há necessidade de inserção de tecnologia de armazenamento mais performante, como é o caso de atmosfera controlada, atmosfera dinâmica e uso de AVG e/ou de 1-MCP (BRACKMANN, 2008 & CORRÊA et al. 2008).

No caso da maçã, os maiores avanços se deram numa estratégia de pesquisa *top-botton*, ou seja, a pesquisa tecnológica gerou resultados mais impactantes no setor do que a pesquisa científica (HERTOG et al., 2011). Por exemplo, a inibição do etileno (conhecimento científico), pelo uso de 1-MCP (tecnologia), foi validada e popularizada mesmo antes que os mecanismos bioquímico-moleculares da percepção e transdução do sinal etileno tivessem sido postos em evidência (LI et al. 2013). Da mesma forma, o uso e otimização das atmosferas controlada e controlada

dinâmica se materializaram antes do conhecimento científico acerca dos impactos das rotas metabólicas afetadas pelas alterações nas concentrações de gases que, a priori, estavam hipotetizadas como sendo aquelas ligadas ao metabolismo respiratório (CHIABRANDO et al., 2011).

É com o evento das ferramentas de genômica, transcriptômica e metabolômica de alta vazão que começaram a serem gerados os primeiros avanços científicos e tecnológicos, numa orientação *botton-top*, ou seja, da ciência para a tecnologia (PALMA et al. 2011; HERTOOG et al., 2011). Entre esses avanços está a proteômica, que consiste no estudo do conjunto de proteínas codificadas pelo genoma, objetivando entender em determinado momento e sob condições específicas, como proteínas mudam em termos de acúmulo, estrutura e função (KUSSMANN & AFFOLTER 2006; HERTOOG et al., 2011). Além disso, a proteômica é uma contribuição ao entendimento do sistema biológico, no seu todo, associando os avanços decorrentes do sequenciamento do genoma da macieira (VELASCO et al., 2010), do estabelecimento dos bancos de RNAs, bem como a construção de mapas genômicos e caracterização de QTLs (COSTA et al., 2010), gerando-se novos genótipos, via melhoramento assistido e/ou via transgênese. Recentemente, através de técnicas de engenharia genética, RNAi, foi realizado o silenciamento do gene codificador da enzima polifenoloxidase em maçãs, tendo havido diminuição no escurecimento oxidativo da polpa após o corte (WALTZ, 2015).

Com esses avanços, há tecnologia validada para o armazenamento de maçãs, de modo que se tenha a fruta disponível praticamente os 12 meses do ano (VARELA et al., 2008). Isso é possível com o cultivo de novos clones, com melhor produtividade, aparência e potencial de conservação, bem como pelo armazenamento em câmaras com atmosfera controlada e/ou dinâmica e/ou com controle da ação do etileno (BAI et al., 2005). Porém, embora se mencione que esses métodos permitam conservar as maçãs com boa qualidade, essa assertiva é discutível. Por exemplo, é amplamente sabido e demonstrado que, já no âmbito do melhoramento genético, ao se selecionar genótipos/acessos para aumento do potencial de conservação, há perdas significativas de propriedades sensoriais, especialmente coloração e aroma. Da mesma forma, ao se armazenarem frutas em condições de atmosferas controladas e/ou com uso de inibidores da produção e/ou ação de etileno, há prolongamento do período de conservação, mas há decréscimo em atributos de qualidade sensorial,

principalmente gosto e aroma, embora a firmeza de polpa seja preservada (ZHENG et al., 2013).

Assim, embora com os marcantes avanços, ainda há uma correlação inversa significativa entre promoção da conservabilidade de frutas e a qualidade sensorial. No caso de maçãs, essa afirmativa também é verdadeira (LEISSO et al., 2013). Por exemplo, maçãs transgênicas com baixa produção de etileno apresentaram menor metabolismo respiratório, e têm praticamente inibida a produção de ésteres (DEFILIPPI et al., 2005). Isso também ocorreu em melões (SOULEYRE et al., 2014; GONÇALVES et al., 2013). Por isso, há que se intensificarem estudos científicos de modo a melhor conhecerem-se os eventos fisiológicos e suas interações, em sistemas biológicos, como meio de proporem-se novas alternativas de melhoramento e/ou armazenamento que promovam vida de prateleira e, ao mesmo tempo, preservação ou potencialização de atributos de qualidade sensorial.

Para uma melhor compreensão do processo de maturação/amadurecimento de maçãs é necessário entender a fruta como um organismo vivo, que passa por um processo geneticamente programado, envolvendo mecanismos transcricionais, pós-transcricionais, traducionais e pós-traducionais, epigenéticos, químicos e enzimáticos, resultando em síntese e degradação de moléculas. Nesse trabalho a maturação é atuante como o estágio de desenvolvimento das maçãs que compreende três fases principais: 1) a maturação propriamente dita, caracterizada pelo momento em que a fruta está apta a ser colhida, no estágio pré-climatérico; 2) o amadurecimento, caracterizado pela evolução da maioria dos eventos fisiológicos responsáveis por tornar a fruta apta ao consumo, com as melhores propriedades sensoriais, e, 3) senescência, caracterizada pela morte celular, facilmente evidenciada, por ter a fruta sobre madura.

Embora a magnitude e complexidade desses eventos sejam marcantes, o senso comum é de que a célula se manterá viva enquanto houver homeostase, resultante de um bom equilíbrio no sistema químico e enzimático de oxi-redução e de preservação da compartimentação e comunicação celular. Porém, como esses mecanismos de regulação são coordenados, ainda é objeto de estudo¹³. É entre a colheita das frutas (maturação) e a morte celular (senescência) que se deve interferir, quando se trata de conservação/armazenamento (HUERTA-OCAMPO et al., 2012). Porém, essas intervenções deveriam buscar manter a vida da célula, com metabolismo positivado para aqueles atributos normalmente buscados pelos

consumidores, como textura, suculência, cor, gosto e aroma. Nesse caso, surge um novo desafio: quando se potencializam os metabolismos indutores de maior síntese de pigmentos e/ou de aromas, há ativação do metabolismo de solubilização de macromoléculas da parede celular, resultando em maior amolecimento da polpa, e vice-versa (MARONDEDZE & THOMAS, 2012).

Apesar de grandes avanços terem ocorrido desde a emergência de técnicas de biologia molecular, a estratégia de se estudar, isoladamente, cada gene ou cada proteína pode ser eventualmente inviável e demanda muito mais tempo para que se possa elucidar um determinado processo biológico. Sendo assim, uma análise mais abrangente é requerida (ORTUÑO-SAHAGÚN et al., 2014), de modo a complementar dados de genômica e transcriptômica gerados em trabalhos anteriores (NOUWENS & MAHLER, 2012). O proteoma não é estacionário, muda com o desenvolvimento do organismo, e com qualquer mudança no ambiente (KAZMI & KRULL, 2001), refletindo o estado atual do funcionamento do sistema, ou seja, a expressão funcional do genoma no patamar das proteínas (BANDIL, 2008).

Nesse estudo se adotou uma abordagem proteômica com intuito de identificar proteínas diferencialmente acumuladas durante o amadurecimento de maçãs, com e sem a inibição da ação do etileno.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Maçã

A maçã está entre as frutas mais consumidas do mundo, sendo a quarta cultura frutífera mais importante economicamente, atrás apenas de citrus, uva e banana (FAO, 2015). O Brasil encontra-se entre os vinte maiores produtores mundiais de maçã (FAO, 2015). Segundo a ABPM (2015), a produção na safra 2013/2014, foi de 1,16 milhões de toneladas, onde a região sul do país responde pela maior parte da produção nacional, sendo o estado do Rio Grande do Sul o maior produtor, responsável por 50% da produção, seguido de Santa Catarina com 46%, e Paraná com 4% (ABPM, 2015).

No Brasil, as maçãs (*Malus x domestica* Borkh.) mais cultivadas são as variedades Gala e Fuji, sendo que o interesse dos produtores tem recaído sobre as mutações somáticas dessas cultivares (FIORAVANÇO et al., 2010). Atualmente, clones do grupo 'Gala' perfazem mais que 50% da área cultivada na região Sul do Brasil (WEBER et al., 2013). Esses clones foram selecionados ao longo do tempo e propagados em larga escala em função de características de qualidade, como maior e mais intensa coloração vermelha na epiderme, excelente qualidade organoléptica e grande aceitação no mercado, o que proporciona maiores vantagens comerciais (SILVEIRA et al., 2013; GIRARDI et al., 2015).

O cultivar 'Gala' produz frutas muito atrativas, com a epiderme lisa, brilhante, vermelha rajada sobre fundo verde-amarelo e, geralmente, com pouco *russeting*. O tamanho das frutas é pequeno a médio e o formato redondo-cônico. A polpa é de coloração amarelo-creme, firme, crocante, suculenta, bem balanceada em ácidos e sólidos solúveis (CAMILO & DENARDI, 2006). Ela apresenta várias mutações somáticas, geralmente mais coloridas que a "tradicional", com destaque para Royal Gala, Imperial Gala, Mondial Gala, Galaxy, Baigent, Maxi-Gala e Lisgala (FIORAVANÇO, 2009).

Neste aspecto, utiliza-se maçã 'Gala', clone Baigent, que é uma mutação natural de Royal Gala, ocorrida no pomar do Sr. Paul Brookfield, na Baía de Hawes na Nova Zelândia.

2.2 1-MCP X Etileno

É amplamente conhecido que o etileno é o hormônio fortemente regulador da maturação/amadurecimento de frutos e frutas climatéricos e pode agir também em frutos não climatéricos, como é o caso do desverdeamento de citros, e o avermelhamento de morango (VIEIRA, 2002; ALMEIDA, 2005). No entanto, em cada espécie, as proteínas e certos mecanismos fisiológicos afetados pelo etileno podem variar (FLORES et al., 2002). Apesar das diferenças, de modo geral, há metabolismos etileno-dependentes (síntese de ésteres), parcialmente dependentes (firmeza de polpa) e independentes do etileno (acúmulo de açúcares). As variantes entre frutas/frutos são, por exemplo, a síntese de carotenóides e a degradação de clorofilas que são etileno-dependentes na casca de algumas variedades de melão e não em outros (LÉLIEVRE et al., 1997).

Um potente competidor pelo receptor de sítios de ligação do etileno, o 1-metilciclopropeno (1-MCP), vem sendo utilizado como prática de pós colheita. A aplicação de 1-MCP contribui para prolongar a comercialização de frutas, hortaliças e flores por retardar o amadurecimento e senescência (BLANKENSHIP & DOLE, 2003). A maçã é uma fruta climatérica e por ser afetada pelo etileno, o uso de 1-MCP retarda o amadurecimento (WATKINS, 2006). O 1-MCP atua inibindo a produção de etileno, através da inibição da expressão de genes envolvidos na biossíntese de etileno (TATSUKI & ENDO, 2006). O uso de 1-MCP é provado como suplemento ao melhoramento molecular e para identificação e entendimento do espectro de senescência e processo de maturação/ amadurecimento sob controle direto da percepção de etileno (HUBER, 2008, GIRARDI et al., 2015).

2.3 Proteômica em frutíferas e pós-colheita de frutos

Culturas Frutíferas são commodities de alta importância econômica, ao mesmo tempo que frutos também representam componentes vitais para a dieta humana. Por isso, estudos têm sido desenvolvidos para contribuir com o entendimento dos mecanismos moleculares envolvendo processos biológicos fundamentais na fisiologia de árvores frutíferas, bem como na biologia de frutos. Graças ao

desenvolvimento de tecnologias como as “ômicas”, como análises de proteômica, cientistas possuem ferramentas para dar suporte às tradicionais pesquisas da área.

O genoma completo de frutíferas como pêsego e maçã, foi recentemente sequenciado (JUNG et al., 2012), permitindo assim estudos moleculares mais aprofundados nessas espécies.

Técnicas de análise de proteoma, principalmente utilizando eletroforese 2-D e espectrofotometria de massas (MS), tem mudado dramaticamente as abordagens experimentais pelos quais os sistemas biológicos podem ser caracterizados (AGRAWAL et al., 2011). Técnicas de biologia molecular apresentam algumas restrições na estimacão de níveis de expressão gênica, degradação de mRNA ou traduçãoineficiente, splicing alternativo, sendo assim, a aplicacão da proteômica se faz uma ferramenta útil na área vegetal (RENAUT et al., 2008) principalmente em plantas não modelo como frutíferas (CARPENTIER et al., 2008). O desenvolvimento do fruto e amadurecimento são processos únicos para espécies de plantas, sendo assim, a proteômica representa uma oportunidade se se obter novas perspectivas sobre os mecanismos regulatórios (ZHANG et al., 2012).

Como resultados de análises de proteômica no amadurecimento de frutos, observa-se, na literatura, várias enzimas relacionadas ao metabolismo primário, biossíntese de etileno, bem como proteínas relacionadas ao metabolismo secundário e respostas à estresses bióticos e abióticos (PRINSI et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar a ação do etileno no acúmulo diferencial de proteínas durante o amadurecimento de maçãs, cv. Gala, clone Baigent

3.2 Objetivos Específicos

- Detectar proteínas diferentemente acumuladas;
- Sequenciar proteínas (*spots*);
- Analisar as sequências de aminoácidos das proteínas;
- Identificar as proteínas e estudar, *in silico*, a putativa relação com o amadurecimento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal e tratamento

Maçãs (*Malus x domestica* Borkh.), da cultivar Gala, clone Baigent, colhidas de plantas enxertadas em porta enxerto M9, em pomar comercial (Caxias do Sul/RS, sob coordenadas de 29° 10' 4" S; 51° 10' 46" O), com três anos de idade, na safra 2013-2014 foram utilizadas neste estudo. Na colheita, as maçãs apresentaram 84,95 N de firmeza de polpa, 12,53° Brix de sólidos solúveis totais e 5,5 meq 100 g⁻¹ de acidez total.

Com o intuito de avaliar proteínas diferentemente expressas durante o amadurecimento, com e sem a ação do etileno, as maçãs foram mantidas em duas condições: 1) armazenadas à temperatura de 23-25°C e umidade relativa de 75% (doravante denominada de temperatura ambiente - TA), por 12 dias; 2) tratadas com 1-MCP (1 µL L⁻¹) e mantidas em TA por 11 dias, após as 24 h de tratamento com o produto. Para o tratamento com o inibidor da ação do etileno, utilizou-se o produto comercial, contendo 0,14% de 1-MCP (*Agro Fresh*, Rohm and Haas, PA, USA). Para isso, o produto foi diluído em água e o tratamento se fez em mini câmara de armazenamento hermética, por 24 h em TA. Cada unidade experimental foi constituída de 1 kg de maçã. As amostras foram analisadas no dia da colheita, 6 dias e 12 dias após. As análises básicas de qualidade (firmeza de polpa, sólidos solúveis totais e acidez total titulável) e fisiológica (produção de etileno) de acompanhamento do amadurecimento foram realizadas imediatamente após a coleta (colheita, 6 e 12 dias após), parte da polpa foi congelada em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para o estudo de proteômica.

4.2 Análises Físico-Químicas

4.2.1 Firmeza de polpa, sólidos solúveis totais, acidez total titulável

A avaliação da firmeza de polpa foi realizada utilizando-se penetrômetro automático (Fruit Texture Analyser), com ponteira cilíndrica de 11 mm, após a retirada

da casca, expressando-se os resultados em Newton. Os sólidos solúveis totais foram avaliados com refratômetro digital (ATAGO, modelo PR 101), a partir do suco das maçãs, sendo expressos em °Brix. Para a acidez titulável, foram utilizados 10 mL de suco, com titulação com NaOH 0,1 N até pH 8,1, com resultados expressos em meq 100 mL⁻¹.

4.3 Produção de Etileno

A produção de etileno das frutas de maçã foi determinada por cromatografia gasosa utilizando-se o equipamento CG 3537-5. A solução de etileno (10ppm) foi utilizada como padrão. Frutas, totalizando o peso de 1 kg, foram colocadas em frascos hermeticamente fechados por 1h à temperatura de 25°C e o ar foi coletado utilizando agulhas hipodérmicas. A concentração de etileno foi determinada correlacionando a área dos picos de cada amostra e aquela dos picos da solução padrão de etileno. Os resultados foram expressos em nL etileno.kg.h.

4.4 Expressão quantitativa (real time PCR) do gene ACCO1

A síntese dos primers e a análise de expressão gênica do gene codificador de ACCO1 foi realizada de acordo com Pegoraro et al., 2015.

4.5 Análise de Proteômica

A análise proteômica foi conduzida a partir do perfil diferencial de proteínas detectadas em eletroforese 2-D. Para isso, foi necessária a otimização dos métodos de extração de proteínas, separação 2-D e a análise comparativa entre géis, sucedidas de sequenciamento dos peptídeos. O método de extração das proteínas de maçã foi baseado no protocolo de ZHENG et al. (2007) com modificações detalhadas a seguir. As amostras (1 g) de polpa de maçã trituradas, adicionadas a 4 mL do tampão de extração (0,7 M sacarose, 0,1 M KCl, 50 mM EDTA pH 8,5, 0,5 M Tris HCl pH 8,5, 1% (p/v) PVPP, 40 mM DTT, H₂O q.s.p), foram homogeneizadas em *vortex* por 1 min e deixadas em repouso por 10 minutos no gelo. Em seguida, adicionou-se 4 mL de fenol tamponado com pH 8,0 mantendo agitação por 10 minutos. Então, as

amostras foram centrifugadas a 6650 g por 15 min em temperatura de 4°C. A fase fenólica foi recuperada e a ela foram adicionados 3 mL do tampão de extração. O extrato foi homogeneizado por 5 min e centrifugado a 6650 g por 15 min em temperatura de 4°C. Ao sobrenadante recuperado foi adicionada solução de precipitação (0,5 mM DTT, 10% (p/v) TCA, Acetona q.s.p.) em um volume correspondente a 4 vezes o volume ao sobrenadante recuperado e deixado em repouso overnight à -20°C. O extrato então foi centrifugado a 6650 g por 10 minutos em temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e 5 mL da solução de lavagem (1,5 mM DTT, Acetona q.s.p.) foi adicionado ao precipitado, o qual ficou em repouso por 1 hora à -20°C. A amostra foi então centrifugada a 6650 g por 10 min em temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e a lavagem foi repetida. Em seguida, 1,5 mL de tampão de lavagem foram adicionados ao *pellet*, que foi mantido por 1 hora a -20°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 6650 g e o sobrenadante foi descartado. Os *pellets* foram então secos em Speed Vac. Por fim, os pellets foram ressuspensos em tampão de solubilização (7 M uréia, 2 M tiouréia, 4% (p/v) CHAPS, 20 mM DTT, Bio Lyte Ampholyte pH 3-10 e Ampholyte solution pH 4-6). Essas amostras foram estocadas a -80° C até o momento da eletroforese.

Com o objetivo de confirmar a qualidade das proteínas, foram feitos géis de 10 cm x 8,5 cm (Mini-PROTEAN II Cell, BioRad), com proteínas desnaturadas em tampão de 0,5 M Tris-HCl pH6,8, 10% (v/v) glicerol, 10% (p/v) SDS, 5% (v/v) β-mercaptoetanol, 1% (p/v) azul de Bromofenol.

Para a eletroforese 2-D, foram utilizadas tiras (ReadyStrip™ IPG STRIPS - BioRad) de 24 cm, com gradiente de pH 4-7. A reidratação foi realizada utilizando-se solução protéica de 400µge quantidade de tampão de reidratação (8 M uréia, 2 M tiuréia, 4% (p/v) chaps, 20 mM DTT) suficiente para completar 450 µL, durante 12 h. Em seguida, procedeu-se a focalização isoeétrica (IEF) à temperatura de 20°C e amperagem de 50uA por tira. A IEF ocorreu nas seguintes configurações: 100 V por 1 h, 200V por 1 h, 400V por 1 h, 700V por 1 h, 5000 V por 4 h e 8000 V até atingir 72.000 Vh. Logo após a IEF, realizou-se o equilíbrio das tiras em tampão de equilíbrio (6M uréia; 0,375M Tris HCl, pH 8,8; 20% (v/v) Glicerol) com 2% (p/v) DTT para redução das pontes dissulfito por 10 minutos e posteriormente, o mesmo tampão foi utilizado com 2,5% (p/v) iodoacetoamida por 10 minutos para alquilação de cisteína. Em seguida, procedeu-se à separação eletroforética em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE), em equipamento Protean Plus Dodeca Cell (Bio-

Rad). As tiras de IPG foram posicionadas horizontalmente no topo dos géis pela adição de 3 mL de gel de 0,3% (m/v) agarose em tampão Tris-glicina contendo azul de bromofenol. A migração se deu a 200V por 14 h.

Após a eletroforese (mono e bidimensional), os géis foram deixados por 1 hora sob agitação em recipiente contendo solução de fixação (40% (v/v) etanol e 10% (v/v) ácido acético). Em seguida, essa solução foi trocada por uma solução de sensibilização (0,04%(v/v) formaldeído, 0,05% (v/v) tiosulfato de sódio, 8% (p/v) acetato de potássio, 30% (v/v) etanol) durante 30 min. Após os géis foram lavados duas vezes por 5 minutos em água e mergulhados na solução de coloração (0,1% (p/v) AgNO₃, 0,025% (v/v) formaldeído) por 30 minutos. Em seguida os géis foram lavados em água duas vezes por trinta segundos e então mergulhados na solução de revelação (30 uM HSO₃Na, 2,5% (p/v) K₂CrO₂, 0,04% (v/v) formaldeído). Após os géis terem obtido a coloração desejada, foram colocados em uma solução stop 1,46% (p/v) EDTA. A coloração com nitrato de prata foi usada para a avaliação dos géis no software Series TM Discovery PDQuest Gel 2D (versão 8.0; Bio-Rad). Entretanto, a identificação de proteínas não é compatível com esse método de coloração. Sendo assim, para a análise proteômica propriamente dita, novos géis foram corados com CBB G-250 para a excisão dos *spots* e seu subsequente sequenciamento.

Para a aquisição das imagens dos géis e análise dos dados, os géis bidimensionais corados com nitrato de prata foram digitalizadas utilizando o densitômetro GS-800 (Bio-Rad) juntamente com o The Discovery Series TM Quantiry One Quantitation Software (Version 4.4; Bio-Rad). As imagens obtidas foram posteriormente analisadas no programa PDQuest. Os *spots* proteicos foram detectados automaticamente pelo programa e em seguida foram feitas correções manuais. Os *spots* foram quantificados em unidades de volume (área versus intensidade).

Para análise das proteínas em espectrometria de massa, a coloração dos géis foi realizada segundo o protocolo descrito por DYBALLA & METZGER S. (2009) com modificações, na qual os géis foram colocados em uma solução de coloração (5% (p/v) sulfato de alumínio, 10% (v/v) etanol, 0,12% (p/v) CBB G250,8%(v/v) ácido fosfórico) *overnight*. Posteriormente, os géis foram submetidos a uma solução de 2% (v/v) ácido fosfórico, 10% (v/v) etanol por 1 hora, e após foram colocados em H₂O milliQ e deixados *overnight*. A excisão dos *spots* foi feita com auxílio de ponteiros de micropipetas. Os fragmentos de gel contendo as proteínas recortadas foram

armazenadas em tubos criogênicos (Nunc® CryoTubes® cryogenicvial 1,8 mL) em 1% (v/v) ácido acético até a digestão das amostras, bem como o sequenciamento das proteínas por espectrometria de massas de alta definição (Synapt-G2-LC-MSE). Para o sequenciamento das proteínas, foram selecionados 15 *spots* diferencialmente expressos, os quais foram enviados para o Laboratório Multiusuários Centralizado – Genômica Funcional Aplicada à Agropecuária e Agroenergia (USP – Piracicaba/SP).

4.6 Análises de Bioinformática

A montagem das sequências de aminoácidos e anotação funcional de proteínas identificadas foi realizada com base nos seguintes bancos de dados de proteína: UniProt, GDR, NCBI, Clustal Omega, bem como na literatura. O peso molecular e pls teóricos das proteínas caracterizadas foram calculados pelo processamento das sequências de aminoácidos através da seguinte ferramenta: http://web.expasy.org/compute_pi/. As funções putativas foram pesquisadas através do Uniprot, bem como na literatura.

4.7 Desenho experimental e análise estatística

O experimento foi constituído de um tratamento (aplicação de 1-MCP), tendo-se, como controle, maçãs sem aplicação desse produto. O desenho experimental foi inteiramente casualizado, com 3 repetições biológicas constituídas de 1 kg de maçãs cada. Para as análises básicas (FP, SST e AT) e de produção de etileno realizaram-se três repetições técnicas e para proteômica, duas repetições técnicas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística com auxílio do programa Statistix 8.0. O efeito do tempo dentro de cada tratamento foi avaliado pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$) e o efeito do tratamento em cada tempo foi avaliado pelo teste t ($p \leq 0.05$).

Para a análise de dados de proteômica, os espectros de massas foram processados utilizando o *software Protein Lynx Global Server (PLGS)* versão 3.1, com o banco de dados reverso de *Malus UNIPROT* (data do download: 30 de março de 2015; 13 334 proteínas). Os parâmetros de processamento incluíram: tolerância automática para precursores e íons-produto; mínimo de três íons-fragmento

correspondentes por peptídeo; mínimo de 7 íons-fragmento correspondentes por proteína; mínimo de 2 peptídeos correspondentes por proteína; um possível erro de clivagem pela tripsina; carbamidometilação de cisteína como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável; taxa máxima de descoberta de falso positivo (FDR) a 4%.

5 RESULTADOS

5.1 Firmeza de polpa, concentração de sólidos solúveis totais e da acidez total titulável de maçãs, com e sem aplicação de 1-MCP, durante o amadurecimento em temperatura ambiente

Para relacionar mudanças do proteoma com respostas fisiológicas das frutas realizaram-se análises de firmeza de polpa (FP), sólidos solúveis totais (SST) e acidez total titulável (AT), durante 12 dias, após a colheita, tanto em maçãs que receberam como nas que não receberam aplicação de 1-MCP (Tabela 1). Observou-se diminuição na FP, aumento nos valores de SST e redução da AT, nas maçãs que não receberam aplicação de 1-MCP.

Tabela 1. Firmeza de polpa, sólidos solúveis totais (SST) e acidez titulável (AT) de maçãs tratadas e não tratadas com 1-MCP, e armazenadas à temperatura ambiente, durante 12 dias.

	Tempo de armazenamento (dias)			
	Tratamento	Colheita	6 dias	12 dias
Firmeza (N)	Controle	84,93 a	77,9 abA*	70,3 bB
	1-MCP	84,93a	81,4 aB	80,4 aA
SST (°Brix)	Controle	12,53 a	13,4 abA	14,1 bA
	1-MCP	12,53 a	13,3 bA	14,2 cA
AT (% ácido málico)	Controle	0,56 a	0,45 bA	0,41 bA
	1-MCP	0,56 a	0,5 aB	0,45 aA

*Os valores que diferiram estatisticamente, na linha, são representados por letras minúsculas distintas; da mesma forma, letras maiúsculas distintas, na coluna, representam médias estatisticamente distintas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Maçãs que receberam aplicação de 1-MCP tiveram redução de 5,33% na firmeza de polpa em 12 dias em temperatura ambiente, enquanto aquelas que não

receberam a aplicação desse inibidor da ação do etileno, a redução foi de 17,23%. Em relação aos valores de sólidos solúveis totais, observou-se aumento nas maçãs controle (12,53%), bem como em frutas que receberam aplicação de 1-MCP (13,32%), em 12 dias de armazenamento, sendo que esses valores não diferiram estatisticamente. Os valores de acidez titulável apresentaram redução ao longo do armazenamento, com diminuições de 26,79% e 19,64%, respectivamente para maçãs controle e para maçãs que receberam aplicação de 1-MCP.

5.2 Produção de etileno de maçãs, com e sem aplicação de 1-MCP, durante o amadurecimento em temperatura ambiente

A produção de etileno foi avaliada durante 12 dias após a colheita. No momento da colheita, observou-se uma baixa produção de etileno (1,23 nL etileno.kg.h), confirmando que as maçãs foram colhidas no estágio pré-climatérico. Ao se manterem as maçãs em temperatura ambiente para o amadurecimento, houve aumento da produção de etileno, atingindo-se valores de 18,53 aos 06 dias de avaliação e 235,7 nL etileno kg.h aos 12 dias (Figura 1).

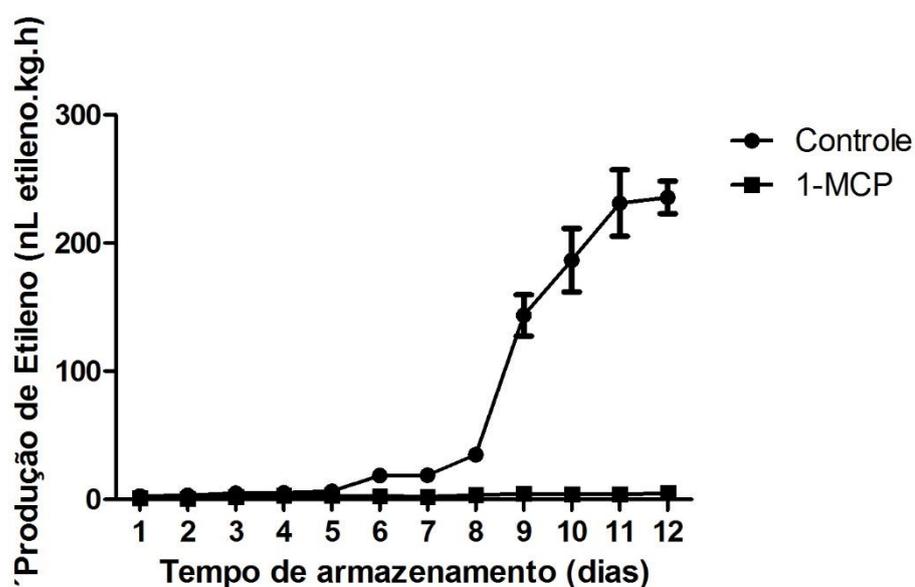


Figura 1. Produção de etileno de maçãs, tratadas e não tratadas com 1-MCP, amadurecidas à temperatura ambiente, durante 12 dias. As barras apresentadas correspondem à mínima diferença significativa ($P < 0,05$).

Porém, quando houve aplicação de 1-MCP por 24 h, logo após a colheita, antes que as maçãs fossem mantidas em temperatura ambiente, a produção de etileno manteve-se baixa, sempre inferior a 4,8 nL etileno.kg.h até 12 dias após a colheita, demonstrando a eficácia do 1-MCP na inibição auto catalítica da produção desse hormônio (Figura 1). Esse resultado (inibição significativa da produção de etileno pela aplicação do 1-MC) (Figura 1), associado àqueles da maior preservação da FP e da AT (Tabela 1), demonstram que o modelo é adequado para se prospectar proteínas diferencialmente presentes em maçãs, em condições de inibição da ação do etileno.

5.3 Perfil transcricional do gene codificador de *ACCO1*

Ao analisar o perfil de transcrição do gene *ACCO1* verificou-se aumento no acúmulo de transcritos ao longo do amadurecimento, atingindo máxima expressão aos 10 dias após a colheita. Por outro lado, esse comportamento não foi observado quando as plantas foram tratadas com 1-MCP.

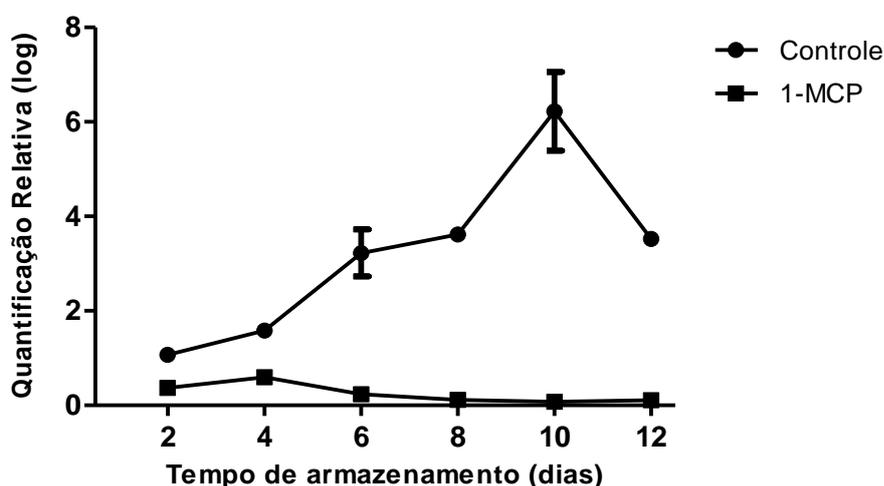


Figura 2. Perfil transcricional do gene *ACCO1* (Uniprot: Q00985) em maçãs, com e sem aplicação de 1-MCP, armazenados em temperatura ambiente durante 12 dias.

*Dados publicados em PEGORARO et al. (2015) e gentilmente cedidos pelos autores.

5.4 Proteínas diferencialmente acumuladas em maçãs, com e sem aplicação de 1-MCP, durante o amadurecimento em temperatura ambiente

Ao se terem maçãs em que a produção de etileno foi significativamente inibida pela aplicação de um inibidor da ação do etileno (Figura. 1), decidiu-se avaliar o proteoma diferencialmente acumulado, pela técnica IF-SDS-PAGE (2-D). Como resultado dessa técnica, 200 proteínas foram detectadas pelo software PDQuest. Além disso, cabe ressaltar que o procedimento técnico adotado foi bem otimizado, tendo havido reprodutibilidade e boa qualidade dos proteomas em géis 2-D (Figura. 3). Ao se buscarem *spots* diferencialmente expressos entre os tratamentos, 15 *spots* foram destacados (Figura. 3) como diferencialmente expressos (Tabela 2). Os níveis de expressão, com base no volume (OD.mm²), de cada proteína citada na tabela 2, pode ser observado na Figura 4. Entre os *spots* diferencialmente expressos, foram identificadas proteínas diretamente ligadas ao amadurecimento de frutas, mais precisamente ao metabolismo do etileno com a proteína ACCO1 (Q00985), como esperado. Entretanto, surpreendentemente, quatro desses *spots* foram identificados como ACCO1. Além disso, proteínas relacionadas a estresses como Heat Shock Protein- HSP (Q9M6R1), resistência a patógenos (Pathogenesis-related protein 5 (Q00MX5) e Thaumatin like protein (Q9FSG7), bem como metabolismo primário como malato desidrogenase (A3DSX0), enzima málica (A6XB67), isocitrato desidrogenase (B8FEV4) foram identificadas.

Com o intuito de caracterizar os níveis de acúmulo relativo das proteínas, fez-se uma avaliação utilizando o software PDQuest. Dessa análise, se verificou que proteínas putativamente identificadas como ACCO1 foram diferencialmente acumuladas como resultado do amadurecimento. Mais especificamente, baixos níveis foram detectados nas maçãs recém colhidas, e aumentaram significativamente quando as maçãs foram amadurecidas em temperatura ambiente por 12 dias. Entretanto, quando se aplicou 1-MCP logo após a colheita, os níveis de ACCO1 mantiveram-se baixos ou não detectados (Figura 4 a, b, c, d). Destaca-se, ainda, que 4 *spots* correspondendo a essa proteína foram detectados, um deles (Figura 4, d) somente nas maçãs que não receberam 1-MCP e aos 12 dias de armazenamento em temperatura ambiente.

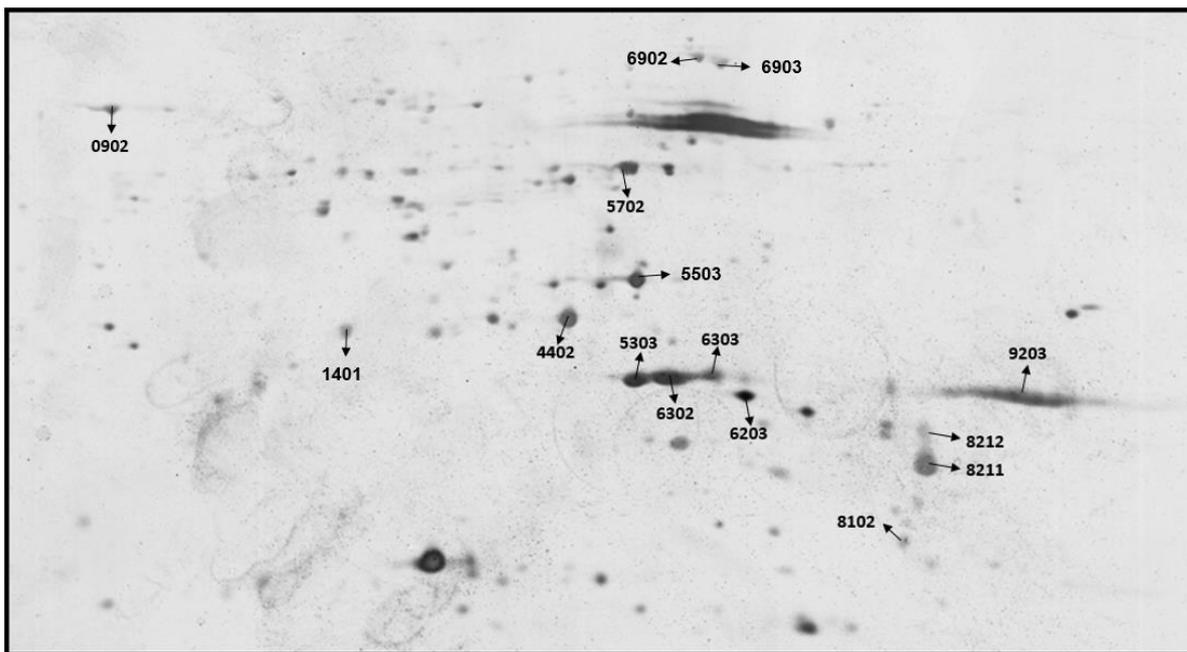
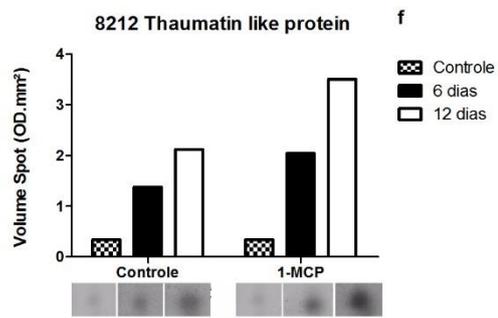
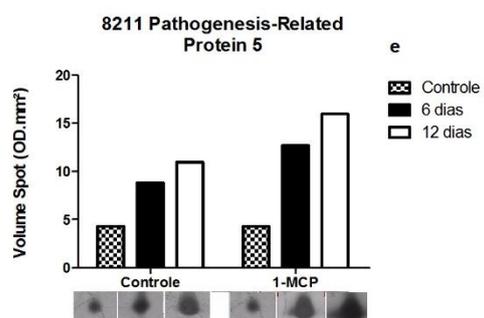
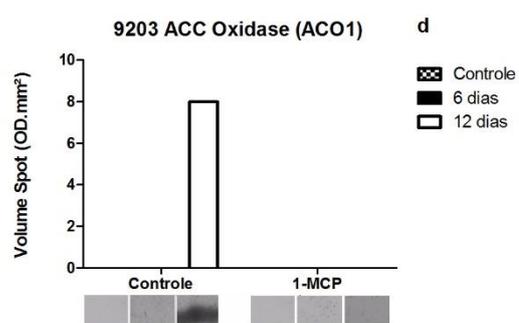
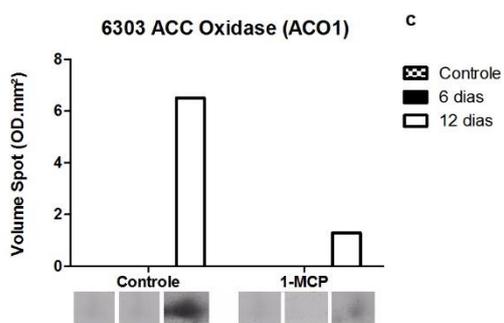
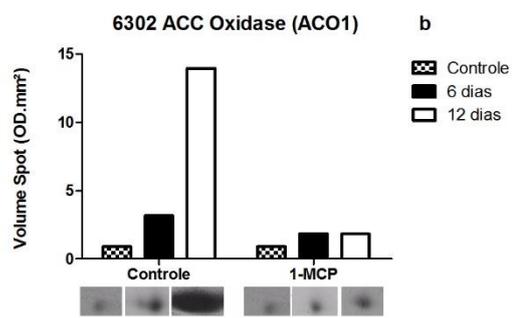
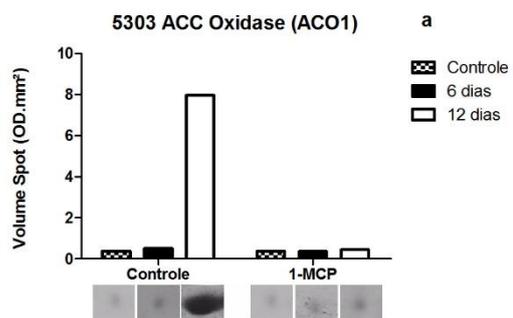
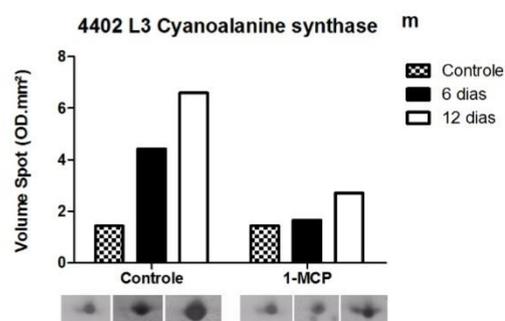
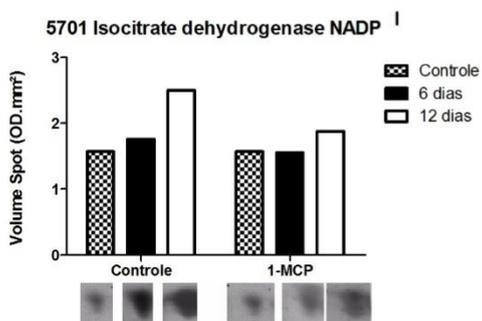
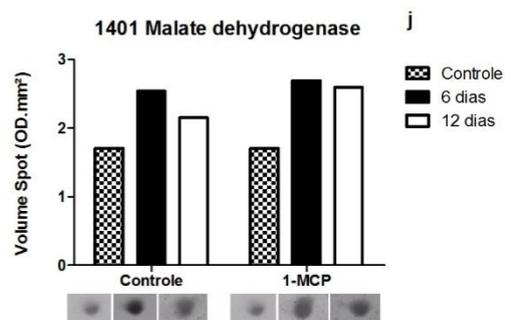
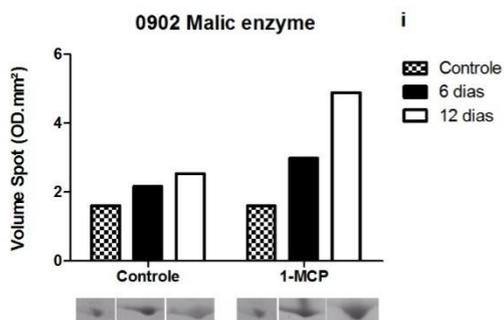
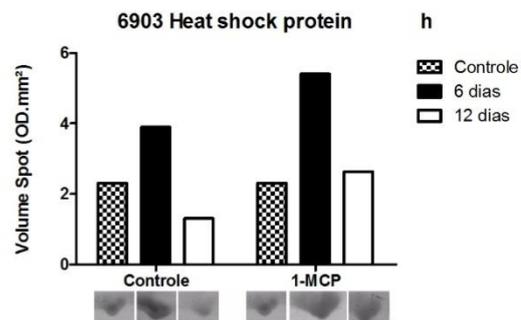
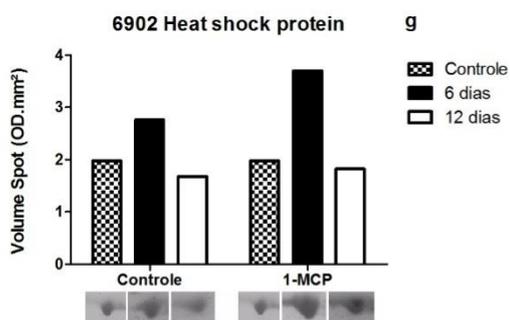


Figura 3. 15 *spots* proteicos diferencialmente expressos (uso do equipamento Synapt-G2-LC-MSE), entre maçãs tratadas e não tratadas com 1-MCP, logo após a colheita e com amadurecimento em temperatura ambiente por 12 dias. Os níveis diferenciais de expressão frente ao tratamento e o tempo de amadurecimento estão demonstrados nos gráficos da Figura 4.

Em diferentes níveis de acúmulo, a proteína actina (C7F8P2), bem como a proteína 14-3-3 Family protein (Q5UFR1), apresentaram um comportamento oposto entre o grupo que recebeu aplicação de 1-MCP e o grupo controle. Enquanto o acúmulo de ambas diminuiu no grupo controle aos 12 dias de armazenamento em relação à colheita, as mesmas aumentaram no grupo que recebeu aplicação de 1-MCP. As proteínas Thaumatin like protein (Q9FSG7), Pathogenesis-related protein 5 – PR-5(Q00MX5) e enzima málica (A6XB67), demonstraram comportamento similar, em diferentes proporções, do momento da colheita até o último dia de análise, ou seja, apresentaram um maior acúmulo na presença de 1-MCP. As proteínas isocitrato desidrogenase (B8FEV4) e cianoalanina sintase (Q1KLZ2) também aumentaram seu acúmulo com o decorrer do amadurecimento, entretanto os maiores valores foram observados no grupo controle. Nesse estudo também foram detectados dois *spots* identificados como Heat shock protein (Q9M6R1). Ambos comportaram-se similarmente, havendo aumento na expressão aos 6 dias e, decrescendo ao serem analisados aos 12 dias de armazenamento tanto no grupo onde houve aplicação de 1-MCP quanto no grupo controle. A proteína ribulose bifosfato carboxilase – RuBisCo

– subunidade grande (P31194), demonstrou ser fortemente inibida na presença de 1-MCP, apresentando valores aproximadamente 4 vezes menor nesse tratamento em relação ao grupo controle, indicando ser etileno-dependente.





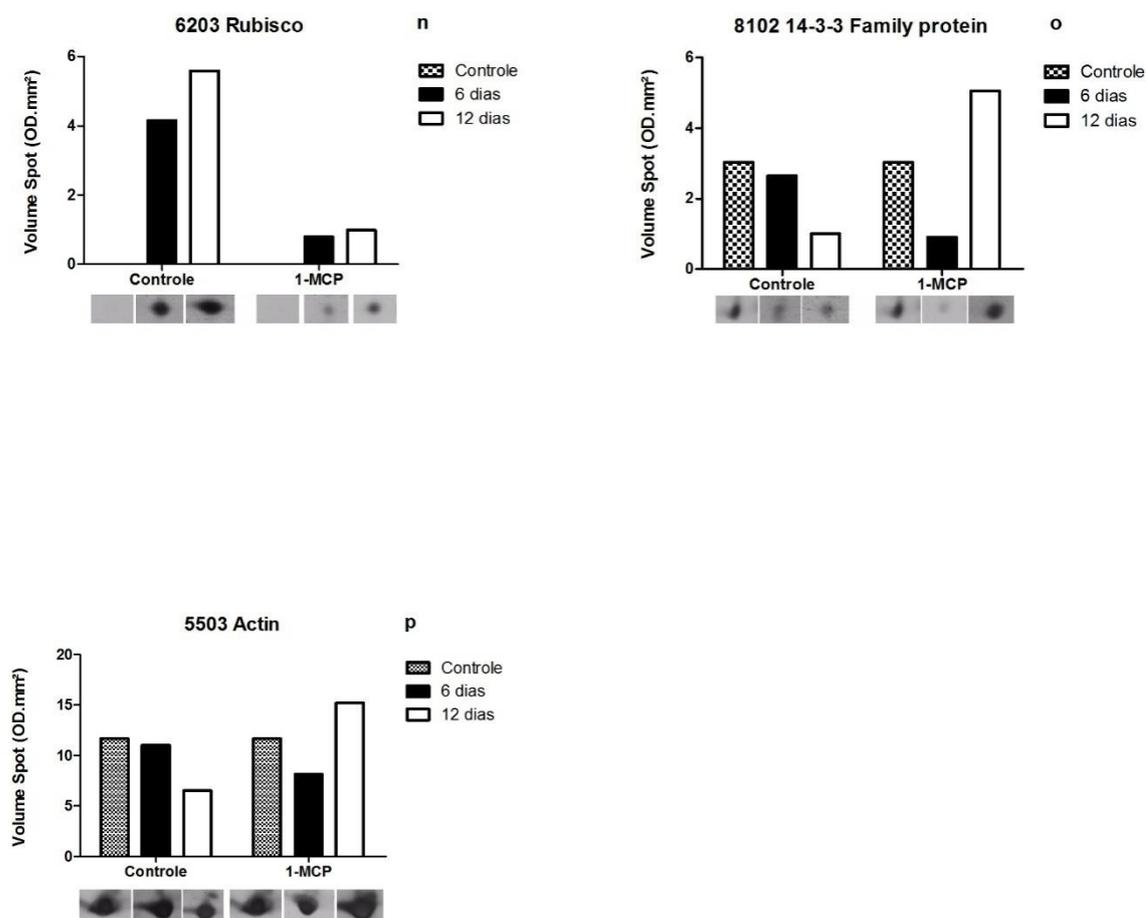


Figura 4. Níveis de acúmulo relativo de proteínas em maçãs, tratadas e não tratadas com 1-MCP, e armazenadas em temperatura ambiente por 12 dias. Análise pelo software PDQuest com base no volume do spot – densidade ótica em relação a área (OD.mm²).

5.5 Alinhamentos das seqüências de aminoácidos

Entre as proteínas diferencialmente expressas, duas foram identificadas em mais de um *spot*: ACCO1 (4 *spots*) e HSP (2 *spots*). Para maior compreensão desses resultados, alinhamentos das seqüências peptídicas foram realizados através do software ClustalOmega, com o intuito de verificar a porcentagem de identidade entre as seqüências reconhecidas como sendo a mesma proteína pelo banco de dados Uniprot. Dessa avaliação, constatou-se que as proteínas identificadas como ACCO1 possuem 97,3%, enquanto as HSPs apresentaram 100% de identidade, indicando que, provavelmente, tratam-se das mesmas proteínas ou de isoformas (Figura 5).

Em relação ao alinhamento entre as sequências das proteínas desse estudo com as sequências do banco de dados *Malus* Uniprot, as identidades variaram entre 33 e 100% (Tabela 2).

1. ACC Oxidase 1 (ACO1)
 CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

6303      INDACENWGFELVNHGMSTELLDTVEKGLDDVQSEIHDLDWESTFFLRHLPSSNISEIP 60
9203      -----GLDDVQSEIHDLDWESTFFLRHLPSSNISEIP 32
6302      INDACENWGFELVNHGMSTELLDTVEKGLDDVQSEIHDLDWESTFFLRHLPSSNISEIP 60
5303      INDACENWGFELVNHGMSTELLDTVEKGLDDVQSEIHDLDWESTFFLRHLPSSNISEIP 60
          *****

6303      DLEEEYRKLLDLLCENLGLEKAHSDAGGIILLFQDDKFQDDKMSIASFYNPGNDSFISPA 120
9203      DLEEEYRKLLDLLCENLGLEKAHSDAGGIILLFQDD-----KMSIASFYNPGNDSFISPA 87
6302      DLEEEYRKLLDLLCENLGLEKAHSDAGGIILLFQDD-----KMSIASFYNPGNDSFISPA 115
5303      DLEEDYRKLLDLLCENLGLEKAHSDAGGIILLFQDD-----KMSIASFYNPGNDSFISPA 115
          *****

6303      PAVLEKVFDDYMK 134
9203      PAVLEKVFDDYMK 101
6302      PAVLEKVFDDYMK 129
5303      PAVLEKVFDDYMK 129
          *****

```

2. Heat shock protein
 CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

6902      -----VEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERNQVAMNPVNTVF 36
6903      GEGPAIGIOLGTTYSCVGVWQHDRVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERNQVAMNPVNTVF 60
          *****

6902      DAKYSDPSVQGMKVIPGGDKPMIVVIYKGEKQFAAEEISSMVLVKEIAEAYLGSSIK 96
6903      DAK-----EIAEAYLGSSIK 75
          ***

6902      NAVVTVPAYFNDSQRDAGVIAGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKNEPTAAAIAYGLDKKA 156
6903      NAVVTVPAYFNDSQRDAGVIAGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKK-----AYGLDK-A 126
          *****

6902      TAGDTHLGGEDFDNRMVNHFVQEFKFEELNMDLFRSTVHDVVLVGGSTRVQQLLQDF FNG 216
6903      TAGDTHLGGEDFDNRMVNHFVQEFKFEELNMDLFRSTVHDVVLVGGSTRVQQLLQDF FNG 186
          *****

6902      KSINPDEAVAYGAAVQAAIILSGEGNEKEQVFSTYSNQPGVLIQVYEGERNALENYAYNM 276
6903      KSINPDEAVAYGAAVQAAIILSGEGNEKEQVFSTYSNQPGVLIQVYEGERNALENYAYNM 246
          *****

6902      RMKELESICNPIIAK 291
6903      RMKELESICNPIIAK 261
          *****

```

Figura 5. Alinhamentos das sequências de aminoácidos das proteínas ACCO1 (*spots* 6303, 9203, 6302 e 5303) e HSPs (*spots* 6902 e 6903).

Tabela 2. Lista de proteínas diferencialmente expressas em frutas de maçã tratadas e não tratadas com 1-MCP armazenadas a temperatura ambiente por 12 dias. As proteínas foram identificadas por cromatografia e espectrofotometria de massas (Synapt-G2-LC-MSE).

Spot	Nº acesso (Uniprot)	Organismo	Proteína	Peso molecular (kDa) experimental	Peso molecular (kDa) teórico	pl experimental	pl teórico	Identidade (%)	Função
5303	Q00985	<i>Malus x domestica</i>	ACC oxidase (ACCO1)	14,66	35,41	4.14	5,24	48,7	Biossíntese etileno, amadurecimento de frutas
6302	Q00985	<i>Malus x domestica</i>	ACC oxidase (ACCO1)	14,67	35,41	4.15	5,24	49,0	Biossíntese etileno, amadurecimento de frutas
6303	Q00985	<i>Malus x domestica</i>	ACC oxidase (ACCO1)	15,31	35,41	4.14	5,24	49,8	Biossíntese etileno, amadurecimento de frutas
9203	Q00985	<i>Malus x domestica</i>	ACC oxidase (ACCO1)	11,48	35,41	4.19	5,24	47,2	Biossíntese etileno, amadurecimento de frutas
5503	C7F8P2	<i>Malus x domestica</i>	Actin	17,56	28,05	5.04	5.23	63,7	Citoesqueleto, divisão celular
8212	Q9FSG7	<i>Malus x domestica</i>	Thaumatococcus protein	36,28	25,70	5.76	4,98	33,3	Alergênciã, resposta a patógeno
8211	Q00MX5	<i>Malus x domestica</i>	Pathogenesis-Related 5	68,84	25,68	4.25	4,62	78.3	Alergênciã, resposta à patógeno
6902	Q9M6R1	<i>Malus x domestica</i>	Heat shock protein (HSP)	31,78	71,21	5.69	4,62	57,9	Conformação proteica, resposta a estresse biótico e abiótico
6903	Q9M6R1	<i>Malus x domestica</i>	Heat shock protein (HSP)	26,06	71,21	5.69	4,57	57,9	Conformação proteica, resposta a estresse biótico e abiótico
8102	Q5UFR1	<i>Malus x domestica</i>	14-3-3 family protein	14,37	29,69	4.46	4,75	52,4	Regulador chave de transdução de sinal de proteínas como receptores e proteínas quinases, amadurecimento de frutos, regulação de hormônios
6203	P31194	<i>Malus x domestica</i>	Ribulosebisphosphate carboxylase large chain	23,96	58,5	4,23	4,77	100	Fixação de carbono, resposta à estímulo por ácido abscísico
0902	A6XB67	<i>Malus x domestica</i>	Malic enzyme	10,15	70,40	5.87	6,21	33,4	Ciclo de Krebs
1401	A3DSX0	<i>Malus x domestica</i>	Malate dehydrogenase	18,06	35,59	5.14	6,01	61,5	Ciclo de Krebs, Processo metabólico celular de carboidrato
5701	B8FEV4	<i>D. alkenivora</i>	Isocitrate dehydrogenase NADP	21,36	44,42	6,07	4,95	92,9	Ciclo de Krebs
4402	Q1KLZ2	<i>Malus x domestica</i>	L-3 Cyanoalanine synthase 1 mitochondrial	15,51	40,88	4.71	7,61	57,0	Amadurecimento de fruta climatérica

6 DISCUSSÃO

É amplamente conhecido que o etileno atua fortemente na maturação de frutas climatéricas e que o controle da produção e/ou da ação desse hormônio retarda a transição da maturação para o amadurecimento e senescência (BENETT et al., 2008). Com o uso de inibidor da ação do etileno, o 1-MCP, se pode estudar eventos etileno-dependentes, parcialmente-dependentes ou independentes (ALEXANDER et. al 2002; LEE et al., 2012). Por isso, se aplicou esse inibidor em maçãs, logo após a colheita, como forma de se prospectarem proteínas diferentemente acumuladas frente à ação do etileno e ao amadurecimento. No modelo estudado, primeiramente se validou o conhecimento existente (YANG et al., 2013), ou seja, a aplicação de 1-MCP contribuiu para a preservação da FP e da AT (Tabela 1), além de ter inibido fortemente a produção do próprio hormônio (Figura 1). A partir disso, se pode usar esse material como base para os estudos de proteômica diferencial (Figura 4 e 5). Em média, foram detectadas 200 proteínas por gel. Os *spots* representando proteínas diferentemente acumuladas (Figura 3) foram retidos para análise das sequências peptídicas, que foram obtidas utilizando o equipamento Synapt-G2-LC-MSE, e identificadas por comparação com o banco de dados *Malus UNIPROT*. Dessa etapa, 15 *spots* foram destacados como proteínas diferentemente acumuladas (Figura 3, Tabela 2).

Como esperado, houve o acúmulo de uma proteína, putativamente correspondente a uma das enzimas mais abundantes em maçãs, a ACC oxidase1 (ACCO1) (ROMBALDI et al., 1994; LI et al., 2013). Ao longo do amadurecimento, após a colheita, as maçãs que não receberam 1-MCP incrementaram o acúmulo de ACCO1 (Figura 2) e o correspondente aumento da produção de etileno (Figura 1). Nas maçãs tratadas com 1-MCP isso não ocorreu, ou seja, nem se detectou significativo aumento do acúmulo dessas proteínas (Figura 4 a, b, c, d), tampouco da produção de etileno (Figura. 1). Corroborando com esses resultados referentes à ACCO1, PEGORARO et. al (2015) observaram, em seu estudo de acúmulo relativo de transcritos desse gene, pela técnica de real-time PCR, aumento na expressão desse gene ao longo do amadurecimento de maçãs. Em frutas sem aplicação de 1-MCP (controle) esse gene apresentou uma expressão de aproximadamente 3,5 vezes maior do que em maçãs armazenadas por 12 dias à temperatura ambiente sem inibição da ação do etileno. Como pode ser observado na figura 2, frutas que receberam aplicação de 1-MCP não

houve diferença significativa ao longo do período de 12 dias de amadurecimento (PEGORARO et. al, 2015). Se por um lado, o estudo de PEGORARO et al. (2015) demonstra aumento no acúmulo de expressão do gene codificador de *ACCO1* de 3,5 vezes entre maçãs tratadas e não tratadas com 1-MCP aos 12 dias de amadurecimento em temperatura ambiente, no patamar da proteômica da *ACCO1*, essa diferença foi de 16 vezes (Figura 4). E produção de etileno, foi de 60 vezes maior (Figura 1). Em frutas que receberam aplicação de 1-MCP não houve diferença significativa ao longo do período de 12 dias de amadurecimento (Figura 2).

Em nosso estudo, nas maçãs não tratadas com o inibidor da ação do etileno, quatro *spots* identificados como *ACCO1* (*spots* 5303, 6302, 6303 e 9203) foram identificados aos 12 dias de armazenamento (Figura 4. a, b, c, d), justamente quando houve a máxima produção de etileno (Figura 1). Pelo alinhamento das sequências dessas proteínas, a identidade foi de 97,3%, e correspondem ao peptídeo registrado no Uniprot como Q00985 (Tabela 2). Assim, têm-se proteínas com alta identidade, mas que se separam nitidamente em géis 2-D. Resultado similar já havia sido verificado por SHI et al. (2014), mas nenhuma explicação biológica foi dada. Nesse trabalho também não se tem uma explicação conclusiva acerca do achado, mas duas hipóteses mais prováveis são enunciadas: 1) artefato da técnica, resultado de uma separação, em *spots*, da mesma proteína, decorrente da elevada quantidade da *ACCO1*; e, 2) haver síntese de *ACCO1* que, apesar da elevada identidade, possa passar por transformações pós-traducionais (não postas em evidência), que alteram o pI e que, resultem em proteínas com atividade enzimática diferenciada, o que explicaria a coerência entre o máximo acúmulo proteico e a máxima produção de etileno.

Outra proteína diferentemente acumulada foi a actina (C7F8P2), que é amplamente conhecida por participar na estrutura do citoesqueleto celular (LANZA et al., 2012). Além disso, tanto os mRNAs como a própria proteína, têm sido utilizados (MA et al., 2013) como normalizadores em estudos de expressão relativa. Desse modo, esse achado é relevante, pois põe em evidência que a actina (C7F8P2) não se constitui numa boa proteína normalizadora em maçãs, durante o amadurecimento.

Quatro principais classes de proteínas alergênicas têm sido encontradas em maçãs, denominadas Mal d1, Mal d2, Mal d3 e Mal d4. Em nosso estudo, duas dessas

proteínas, a Thaumatin like protein (Q9FSG7), da classe Mal d1 e Pathogenesis-related protein 5 (Q00MX5), classe Mal d2, foram identificadas. Essas proteínas são citadas como pertencente a um grupo de proteínas potencialmente alergênicas para humanos (YANG et al., 2012). A presença dessas proteínas em níveis variados durante o amadurecimento já havia sido observada em estudos anteriores, entretanto nenhuma função com o amadurecimento foi encontrada (MATTHES et. al, 2009; BOTTON et. al, 2008). Aqui, neste estudo, essas proteínas tiveram seus níveis de acúmulo aumentados em maçã durante o armazenamento, tanto nas que não receberam quanto naquelas que receberam aplicação de 1-MCP. Isso contradiz o observado por SHI et al. (2014), segundo os quais, as proteínas Thaumatin like protein tiveram suas respectivas expressões diminuídas com a aplicação do 1-MCP. Essas proteínas identificadas como Thamatim like têm sido frequentemente detectadas em estudos de proteômica em frutas, ocorrendo o mesmo nos estudos de transcriptômica (PRINSI et al., 2011; SHI et al., 2013). No entanto, todos os estudos foram conduzidos, à semelhança deste, numa estratégia de efeito-resposta. Assim, tem-se, com resultado que as proteínas e/ou os mRNAs incrementaram ou reduziram o acúmulo frente ao amadurecimento, ao armazenamento, a estresses, dentre outros, mas não se tem a clareza de qual a função no processo de maturação/amadurecimento.

Além da função de chaperonas, respostas a estresse biótico e abiótico, FABI et al., (2010) relataram que as proteínas HSPs estão relacionadas ao amadurecimento e são afetadas pelo etileno. Essas proteínas desempenham um papel na maturação e dobramentos de complexos de proteínas, degradação de peptídeos danificados e regulação de várias rotas metabólicas (MOLASSIOTIS et al., 2013). Em maçãs, a expressão de Proteínas HSPs têm sido associada a respostas de pós-colheita (WOOLF & FERGUSON 2000; WANG et al., 2010). Neste trabalho se observou aumento dessa proteína aos 6 dias de amadurecimento no grupo controle e uma diminuição ao se passar 12 dias de armazenamento. No grupo que recebeu aplicação de 1-MCP a expressão dessa proteína foi aumentada comparando-se ao controle (Figura 4. g, h). Assim, à semelhança das Thaumatin like e PR-5, não se tem uma explicação sobre a função dessas proteínas no amadurecimento.

O *spot* identificado como cianoalanina sintase aumentou seu acúmulo durante o amadurecimento, sendo máximo aos 12 dias; por outro lado, ao aplicar 1-MCP, esse acúmulo foi reduzido. Segundo HAN et al. (2007), essa proteína está, provavelmente,

envolvida na detoxificação de cianeto que aumenta devido ao processo de biossíntese de etileno durante o processo de amadurecimento de frutas.

A enzima malato desidrogenase (MDH), que catalisa a conversão reversiva de oxaloacetato em malato podendo atuar na síntese ou degradação de malato (TOLEDO et al., 2010), apresentou maior expressão aos 6 dias de amadurecimento, diminuindo aos 12 dias, concordando com o estudo de MARONDEDZE et al. (2012). Essa variação de acúmulo na proteína MDH sugere uma forma de resposta contra estresse oxidativo. Recentemente, tem sido mostrado que há aumento em níveis de malato em resposta à redução do acúmulo de amido e aumento do amolecimento em tomate (CENTENO et al., 2011). Esse resultado sugere que a MDH possa ter papel no amolecimento de maçã que é uma fruta que converte amido em açúcares simples e ácidos orgânico (SHANGGUAN et al., 2015). Esses sólidos solúveis e ácidos orgânicos são componentes de frutas importantes no que diz respeito ao sabor, impactando nas características organolépticas gerais da fruta. Ácidos orgânicos, como o ácido málico, geralmente apresentam aumento nos estádios iniciais do desenvolvimento do fruto, sendo utilizados como substratos da respiração durante o amadurecimento (DIAKOU et al., 2000). Esses ácidos orgânicos são intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs), exercendo função na respiração celular aeróbica. Entre as enzimas que participam dessa rota metabólica, estão a enzima málica, malato desidrogenase e isocitrato desidrogenase – NADP, as quais foram identificadas no presente estudo, representadas pelos *spots* 0902, 1401 e 5701 respectivamente. Segundo RUFFNER al. (1984); HIRAI & UENO, (1997), o rápido decréscimo nas concentrações de ácido málico durante o amadurecimento é, geralmente, atribuído à degradação desse ácido pela enzima málica dependente de NADP. Esses dados estão em consenso com o presente estudo o qual demonstrou uma diminuição da acidez ao longo do processo de amadurecimento (Tabela 1), bem como o aumento do acúmulo da proteína identificada como enzima málica (Figura 4. i).

Em frutas climatéricas, tem sido mostrado que o etileno induz genes, sendo considerado o hormônio do amadurecimento. Entretanto, é sabido que existem rotas metabólicas dependentes e independentes de etileno em frutas climatéricas (LELIE`VRE et al., 1999). Novos eventos transcricionais e traducionais vêm sendo recentemente evidenciados. É o caso das Proteínas 14-3-3 que atuam no processo

de sinalização de fitormônios (ácido abscísico, giberelina, brassinosteróide e etileno) (GAMPALA et al. 2007; RYU et al. 2007; DENISON et al. 2012). Estudos desenvolvidos por SHI & ZHANG (2014) demonstraram que algumas dessas proteínas podem ser induzidas por tratamento de etileno exógeno e o padrão de expressão de outras dessas proteínas indica que podem estar envolvidas na regulação da biossíntese do etileno durante o amadurecimento de frutas (LI et al., 2013). Além disso, o gene 14-3-3 foi induzido pelo precursor de etileno (ACC) SHI et al., 2014.

Estudos desenvolvidos por ANDRADE et al. (2012), demonstraram que a proteína 14-3-3 foi acumulada durante o amadurecimento de manga e pode contribuir para a alteração da integridade da membrana e amolecimento de polpa, já que são capazes de se ligar a domínios fosforilados na ATPase alterando a atividade dessa enzima. Esse processo é influenciado por etileno e pode resultar na desestabilização do gradiente eletrólito da membrana, bem como o colapso e morte de alguns grupos celulares. Esses resultados indicam uma nova perspectiva, além da visão convencional de amadurecimento, sugerindo que por meio de técnicas de biologia molecular seja possível um melhor entendimento dos processos regulatórios envolvidos no amolecimento.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Frente aos resultados obtidos, constata-se que esse é um bom modelo para se estudar eventos relacionados à ação do etileno durante o amadurecimento de maçãs. Além disso, dentre os 15 *spots* diferencialmente expressos, algumas proteínas foram destacadas: ACCO1, actina e 14-3-3 family protein. A ACCO1 recebeu atenção especial, por ter sido identificada em 4 *spots* em maçãs maduras, embora haja alta identidade entre os peptídeos sequenciados. Em maçãs que receberam aplicação de 1-MCP, somente dois *spots* foram identificados. A segunda, a actina, por apresentar acúmulos diferenciais entre as maçãs, traz a informação de que não deve ser usada como normalizadora em estudos de proteômica. A proteína 14-3-3 por demonstrar uma possível função reguladora do etileno, sugere que além das rotas metabólicas clássicas, por meio da moderna biotecnologia, pode-se estudar novos processos, possivelmente, responsáveis pelo amadurecimento de frutos. Nos demais casos, as proteínas visualizadas como diferencialmente acumuladas, têm funções putativas gerais no metabolismo vegetal, sem demonstrações experimentais de serem reguladoras importantes no processo de amadurecimento de maçãs. Assim, para se ter maior amplitude de apreciação, duas ações são sugeridas, como sequência desse trabalho: 1) proteômica holística, por técnica de alta vazão, de modo a se ter o proteoma diferencial integral, o que permitiria identificar proteínas presentes em baixas quantidades e, portanto, não identificáveis pela técnica 2-D; e, 2) estudo de genes identificados como potenciais reguladores do processo de maturação/amadurecimento, a partir dos estudos de transcritômica e de proteômica.

8 REFERÊNCIAS

- ABPM. Associação Brasileira dos Produtores de Maça (2015). Disponível em: <http://www.abpm.org.br/>. Acesso em: dezembro/2015.
- AGRAWAL, G. K., JOB, D., ZIVY, M., AGRAWAL, V. P. (2011), Time to articulate a vision for the future of plant proteomics—a global perspective: an initiative for establishing the international plant proteomics organization (INPPO). *Proteomics*. 11, 1559–1568.
- ALEXANDER, L & GRIERSON, D. (2002). Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany* 53. p. 2039-2055.
- ALMEIDA, D.P.F. (2005). *Etileno em Pós-Colheita*. Departamento de Fisiologia e Tecnologia Pós-Colheita - Pós-Graduação em Fruticultura - Instituto Superior de Agronomia.
- ANDRADE, JDE M, TOLEDO T.T., NOGUEIRA, S.B., CORDENUNSI, B.R., LAJOLO, F.M. & DO NASCIMENTO J.R., (2012). 2D-DIGE analysis of mango (*Mangifera indica* L .) fruit reveals major proteomic changes associated with ripening. *Journal of Proteomics*. 75(11). p.3331–3341.
- BAI, J.H. BALDWIN, E. A., GOODNER, L.D., MATTHEIS. J.P. & BRECHT, J.K. (2005) Response of four apple cultivars to 1-methylcyclopropene treatment and controlled atmosphere storage. *HortScience*, Alexandria, n.40. p.1534-1538.
- BANDIL, G.B. (2008). *Análise proteômica comparativa do fruto de café (coffea arábica) em dois estágios iniciais de desenvolvimento*. Dissertação – Agronomia. Universidade Estadual de Ponta Grossa.
- BENNETT, A. B. & LABAVITCH, J. M (2008). Ethylene and ripening-regulated expression and function of fruit cell wall modifying proteins. *Plant Science*. 175. p. 130-136.
- BRACKMANN, A., SESTARI, I., STEFFENS, C. A. & GIEHL, R. F. H. QUALIDADE DA MAÇÃ CV. (2004). Gala tratada com 1-metilciclopropeno. *Ciencia rural*. 34. 5. P. 1415-1420. Issn 1678-4596.
- BLANKENSHIP, S.M.& DOLE, J.M. (2003). 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biology and Technology*. 28. p.1–25.

- CAMILO, A. P. & DENARDI, F. (2006). Cultivares: descrição e comportamento no sul do Brasil. Empresa De Pesquisa Agropecuária E Extensão Rural De Santa Catarina - Epagri. *A Cultura Da Macieira*. Florianópolis: Epagri, 113-168p., Cap. 5.
- CARPENTIER, S. C., PANIS, B., VERTOMMEN, A., SWENNEN, R., SERGEANT, K., RENAUT, J., LAUKENS, K., WITTERS, E., SAMYN, B., DEVREESE, B. (2008). Proteome analysis of nonmodel plants: a challenging but powerful approach. *Mass Spectrometry Reviews*, 27. p.354–377.
- CENTENO, D.C., OSORIO, S., NUNES-NESI A., BERTOLO A.L.F., CARNEIRO, R.T., ARAÚJO, W.L., STEINHAUSER M-C., MICHALSKA, J., ROHRMANN, J. & GEIGENBERGER, P., (2011). malate plays a crucial role in starch metabolism, ripening, and soluble solid content of tomato fruit and affects postharvest softening. *Plant cell* 23. P. 162–184.
- CHIABRANDO, V. & GIACALONE, G. (2011). Shelf-life extension of highbush blueberry using 1-methylcyclopropene stored under air and controlled atmosphere. *Food chemistry* 126. P.1812-1816
- CORREA, T.R., STEFFENS, C.A., DO AMARANTE, C.V.T., BRACKMANN, A.; SILVEIRA, J.P.G., TANAKA, H. & BOTH, V. (2010). Qualidade de maçãs 'fuji' armazenadas em atmosfera controlada e influência do clima na degenerescência da polpa. *Pesquisa agropecuaria brasileira*. 45, n.6. P. 531-538.
- COSTA, F., PEACE, C. P., STELLA, S., SERRA, S., MUSACCHI, S., BAZZANI, M. & VAN DE WEG, W. E. (2010). QTL dynamics for fruit firmness and softening around an ethylene-dependent polygalacturonase gene in apple (*Malus domestica* borkh.). *Journal of experimental botany*, 61(11), 3029–3039.
- DEFILIPPI, B.G., KADER, A.A., & DANDEKAR, A.M. (2005). Apple aroma: alcohol acyltransferase, a rate limiting step for ester biosynthesis, is regulated by ethylene. *Plant science*. 168. P.1199–1210.
- DENISON, F.C., PAUL A. L., ZUPANSKA A. K. & FERL R. J. (2012). 14-3-3 proteins in plant physiology. *Seminars in cell & developmental biology*. 22. P. 720–727.
- DIAKOU, P., SVANELLA, L., RAYMOND, P., GAUDILLERE, J.P. & MOING. (2000). Phosphoenol-pyruvate carboxylase during grape berry development: protein level, enzyme activity and regulation. *Australian journal of plant physiology*. 27 p.221– 229.

- DYBALLA, N. & METZGER, S. (2009). Fast and sensitive colloidal comassie g250 staining for proteins in polyacrylmide gels. *Journal of visualized experiments*. 30. E1431.
- FAO. (2015). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org/home/en/>. Acesso em: dezembro/2015.
- FIORAVANÇO, J. C. (2009). Maçã Brasileira: da importação à auto-suficiência e exportação - a tecnologia como fator determinante. *Informações Econômicas*, SP, v.39, n.3.
- FIORAVANÇO, J. C., GIRARDI, C. L., CZERMAINSKI, A. B. C., SILVA, G. A. da, NACHTIGALL, G. R., OLIVEIRA, P.R.D. de (2010). Cultura da macieira no Rio Grande do Sul: análise situacional e descrição varietal. *Documentos 71*, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves.
- FLORES, F., YAHYAUI, F., DE, BILLERBECK, G. , ROMOJARO, F., LATCHÉ, A., BOUZAYEN, M., PECH, JC, AMBID, C. (2002). Role of ethylene in the biosynthetic pathway of aliphatic ester aroma volatiles in Charentais Cantaloupe melons. *Journal of Experimental Botany*. 53(367). p.201-206.
- GAMPALA S.S., KIM T.W., HE J.X., TANG W., DENG Z. & BAI M.Y. (2007) An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*. 13. p.177–189.
- GIRARDI, C. L.; SANHUEZA R.M., BENDER RJ. (2002). Manejo Pós-Colheita e Rastreabilidade na Produção Integrada de maçãs. *Circular técnica 34 – Embrapa*. 31. p.23.
- GIRARDI, C.L., PEGORARO, C., CRIZEL, G.R.; STORCH, T.T.; ZANUS, M.C. (2015). Conservação da qualidade pós-colheita de maçãs. *Circular técnica Embrapa 31 – Embrapa*.
- GONÇALVES, C. (2013). *Alterações Moleculares , Físico-Químicas e Fisiológicas em Melões e Tomates : Relações com Etileno e Citocininas*. Centro de Biotecnologia. Tese - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.
- HAN, S.E., SEO, Y.S., KIM D., SUNG, S.K., KIM, W.T. (2007). Expression of MdCAS1 and MdCAS2, encoding apple β -cyanoalanine synthase homologs, is concomitantly induced during ripening and implicates MdCASs in the possible

role of the cyanide detoxification in Fuji apple (*Malus domestica* Borkh.) fruits. *Plant Cell Reports*. 26. p.1321–31.

- HERTOG, M.L.A.T.M., RUDELL, D.R., PEDRESCHI, R., SCHAFFER, R.J., GEERAERDA, A.H., NICOLAÏ, B.M., FERGUSON, I. (2011). Postharvest Biology and Technology Where systems biology meets postharvest. *Postharvest Biology and Technology*, 62(3). p.223–237.
- HIRAI, M., UENO, I. (1997). Development of citrus fruits: fruit development and enzymatic changes in juice vesicle tissue. *Plant Cell Physiology*. 18 (4). 791–799.
- HUBER, D.J. (2008). Suppression of ethylene responses through application of 1-methylcyclopropene: a powerful tool for elucidating ripening and senescence mechanisms in climacteric and nonclimacteric fruits and vegetables. *HortScience*. 43. p.106-111.
- HUERTA-OCAMPO, J.Á., OSUNA-CASTRO, J.A, LINO-LÓPEZ, G.J., BARRERA-PACHECO, A., MENDOZA-HERNÁNDEZ, G., DE LEÓN-RODRÍGUEZ, A. & DE LA ROSA, A.P.B. (2012). Proteomic analysis of differentially accumulated proteins during ripening and in response to 1-MCP in papaya fruit. *Journal of Proteomics*, 75(7). p.2160–2169.
- JUNG, S., CESTARO, A., TROGGIO, M., MAIN, D. et al. (2012). Whole genome comparisons of *Fragaria*, *Prunus* and *Malus* reveal different modes of evolution between Rosaceous subfamilies. *BMC Genomics*. 13. p.129.
- KAZMI, S., KRULL, I.S. (2001). Proteomics and the current state of protein separations science, Part one. *Pharma Genomics*, p.14-29.
- KUSSMANN, M. & AFFOLTER, M. (2006). OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health. *Journal of Biotechnology*. 124. p.758–787.
- LANZA, M., GARCIA-PONCE, B., CASTRILLO, G., CATARECHA, P., SAUER, M., RODRIGUEZ-SERRANO, M., PÁEZ-GARCÍA, A., SÁNCHEZ-BERMEJO, E., MOHAN T.C., DEL PUERTO, Y.L., SANDALIO, L.M., PAZ-ARES, J. & ANTONIO LEYVA, A. (2012). Article Role of Actin Cytoskeleton in Brassinosteroid Signaling and in Its Integration with the Auxin Response in Plants. *Developmental Cell*. p.1275–1285.
- LEE, J., RUDELL, D.R., DAVIES, P.J., CHRISTOPHER B. WATKINS, C.B. (2012). Metabolic changes in 1-methylcyclopropene (1-MCP) -treated “ Empire ” apple fruit during storage. *Metabolomics*. p.742–753.

- LELIÈVRE, J., LATCHÈ, A., JONES, B., BOUZAYEN, M., PECH, J. (1997). Ethylene and fruit ripening. *Physiologia Plantarum*, 101. p.727-739.
- LI, X., ZHU, X., MAO, J., ZOU, Y., FU, D., CHEN, W., LU, W. (2013). Isolation and characterization of ethylene response factor family genes during development, ethylene regulation and stress treatments in papaya fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*, Amsterdam. 70. p.81-92.
- LEISSO, R, BUCHANAN, D., LEE, J., MATTHEIS, J., & RUDEL, D. (2013). Cell Wall, Cell Membrane, and Volatile Metabolism Are Altered by Antioxidant Treatment, Temperature Shifts, and Peel Necrosis during Apple Fruit Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61 (6). p.1373–1387.
- MARONDEDZE, C. & THOMAS, L.A. (2012). Insights into fruit function from the proteome of the hypanthium. *Journal of Plant Physiology*, 169(1). p.12–19.
- MOLASSIOTIS, A. TANOU, G., FILIPPOU, P., FOTOPOULOS, V., (2013). Proteomics in the fruit tree science arena: New insights into fruit defense , development , and ripening. *Proteomics*. p.1871–1884.
- MORALES, H., MARÍN, S., RAMOS, A.J. & SANCHIS, V. (2010). Influence of post-harvest technologies applied during cold storage of apples in *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation: A review. *Food Control*. 21(7). p.953–962.
- NOUWENS, A. & MAHLER, S. (2012). Evolution of proteomic methods for analysis of complex biological samples - implications for personalized medicine. In Hon-Chiu Eastwood Leung, Tsz-Kwong Man and Ricardo J. Flores (Ed.), *Integrative Proteomics* (pp. 29-43) Croatia: InTech.
- ORTUÑO-SAHAGÚN, D., PALLÀS, M. & ROJAS-MAYORQUÍN, A.E. (2014). Oxidative Stress in Aging: Advances in Proteomic Approaches. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 573208.
- PALMA, J.M., CORPAS, F.J. & RÍO, L.A. (2011). Proteomics as an approach to the understanding of the molecular physiology of fruit development and ripening. *Journal of Proteomics*, 74(8). p.1230–1243.
- PEGORARO, C.; STORCH, T.T; CRIZEL, G.R.; ROMBALDI, C.V.; GIRARDI, CL. (2015) Identification of biomarkers associated to ripening and postharvest quality in 'Gala' apples. *Comunicata Scientiae* In Editing.

- PRINSI, B., NEGRI, A.S., FEDELI, C., MORGUTTI, S., NEGRINI, N., COCUCCI, M., ESPEN, L., (2011). Phytochemistry Peach fruit ripening: A proteomic comparative analysis of the mesocarp of two cultivars with different flesh firmness at two ripening stages. *Phytochemistry*. 72(10). p.1251–1262.
- RENAUT, J., HAUSMAN, J.-F., BASSETT, C., ARTLIP, T. et al. (2008). Quantitative proteomic analysis of short photoperiod and lowtemperature responses in bark tissues of peach (*Prunus persica* L. Batsch). *Tree Genetics & Genomes*. 4. p. 589–600.
- ROMBALDI, C., LELIEVRE, J.-M., LATCHE, A., PETITPREZ, M., BOUZAYEN, M., PECH, J.-C. (1994). Immunocytolocalization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase in tomato and apple fruit. *Planta*. 192. p.453–460.
- RUFFNER, H., POSSNER, D., BREM, S., RAST, D. (1984). The physiological role of malic enzyme in grape ripening. *Planta*. 160 (5). p.444–448.
- RYU, H., KIM, K., CHO, H., PARK, J., CHOE, S. & HWANG, I. (2007) Nucleocytoplasmic shuttling of BZR1 mediated by phosphorylation is essential in *Arabidopsis* brassinosteroid signaling. *Plant Cell*. 19. p.2749–2762.
- SHANGGUAN, L., SUN X., ZHANG, C., MU, Q., LENG, X., JINGGUI FANG, J. (2015). Genome identification and analysis of genes encoding the key enzymes involved in organic acid biosynthesis pathway in apple, grape, and sweet orange. *Scientia Horticulturae*. 185. p.22–28.
- SHI, H. & ZHANG, Y., (2014). Pear 14-3-3a gene (Pp14-3-3a) is regulated during fruit ripening and senescence, and involved in response to salicylic acid and ethylene signalling. *Journal of Genetics*. 93(3). p.747–753.
- SOULEYRE, E.J.F., CHAGNÉ, D., CHEN, X., TOMES, S., TURNER, R.M., WANG, M.Y., MADDUMAGE, R., HUNT, M.B., WINZ, R.A., WIEDOW, C., HAMIAUX, C., GARDINER, S.E., ROWAN, D.D., & ATKINSON, R.G. (2014). The AAT1 locus is critical for the biosynthesis of esters contributing to “ripe apple” flavour in “Royal Gala” and “Granny Smith” apples. *The Plant Journal*. 78. p.903-915.
- STANICH, K. CLIFF, M.A., HAMPSON, C.R., & TOIVONEN, P.M.A. (2014). Shelf-life and sensory assessments reveal the effects of storage treatments with 1-methylcyclopropene on new and established apples. *Canadian Journal of Plant Science*, 94(8). p.1427–1439.

- TAKSUKI, M., ENDO, A; OHKAWA, H. (2007). Influence of time from harvest to 1-MCP treatment on apple fruit quality and expression of genes for ethylene biosynthesis enzymes and ethylene receptors. *Postharvest Biology and Technology*. 43. p.28-35.
- TAKSUKI, M. & ENDO, A. (2006). Analyses of expression patterns of ethylene receptor genes in apple (*Malus domestica* Borkh.) fruits treated with or without 1-methylcyclopropene. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 75. p. 481-487.
- TOLEDO, T.T; (2010) *Análise proteômica do amadurecimento da banana empregando eletroforese bidimensional acoplada à espectrofotometria de massas*. Dissertação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.
- VARELA, P., SALVADOR, A. & FISZMAN, S. (2008). Shelf-life estimation of “Fuji” apples II. The behavior of recently harvested fruit during storage at ambient conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 50, pp.64–69.
- VELASCO, R., ZHARKIKH, A.,AFFOURTIT, J., DHINGRA, A.,CESTARO, A.,KALYANARAMAN, A., FONTANA, P., BHATNAGAR, SATISH K, et al. (2010). The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh .). *Nature Publishing Group*. 42(10). p.833–839.
- VIEIRA, S.M., THEODORO, K.H., & GLÓRIA, M.B.A., (2007). Profile and levels of bioactive amines in orange juice and orange soft drink. *Food Chemistry*.100(3). p. 895-903.
- WALTZ, E. (2015) USDA approves next-generation GM potato. *Nature Biotechnology* 33. p. 12–13.
- WATKINS, C.B. (2006). The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnology Advances*. 24. p.389-409.
- WEBER, A.; BRACKMANN, A.; ANESE, R. O.; BOTH, V.; PAVANELLO, E. P.(2013). Atmosfera controlada para armazenamento de maçã Maxi Gala. *Revista Ciência Agronômica*. 44(2), p. 294-301.
- YANG, X. SONG, J., CAMPBELL-PALMER, L., WALKER, B.A. & ZHANG, Z. (2012). Allergen related gene expression in apple fruit is differentially controlled by ethylene during ripening. *Postharvest Biology and Technology*. 63(1), p.40–49.

- YANG, X.; SONG, J., CAMPBELL-PALMER, L., FILLMORE, S. & ZHANG, Z. (2013). 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*. 78. p. 55-66.
- ZHANG, C., DING, Z., XU, X., WANG, Q. et al. (2010). Crucial roles of membrane stability and its related proteins in the tolerance of peach fruit to chilling injury. *Amino Acids*. 39. p.181–194.
- ZHENG, Q., SONG, J., DONCASTER, K., ROWLAND, E. & BYERS, D. M. (2007). Qualitative and quantitative evaluation of protein extraction protocols for apple and strawberry fruit suitable for two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55. p.1663-1673.
- ZHENG, Q., SONG, J., CAMPBELL-PALMER, L., THOMPSON, K., LI, L., WALKER, B., CUI, Y., LI, X., (2013). A proteomic investigation of apple fruit during ripening and in response to ethylene treatment. *Journal of Proteomics*. 93. p.276-94.