

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



Tese

**Respostas bioquímico-fisiológicas, transcricionais e mapeamento de QTLs
de frutos na pós-colheita**

Aline Tiecher

Pelotas, 2013

ALINE TIECHER

**Respostas bioquímico-fisiológicas, transcricionais e mapeamento de QTLs
de frutos na pós-colheita**

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

Comitê de orientação:

César Luis Girardi, PhD – Embrapa Uva e Vinho

Cesar Valmor Rombaldi, PhD – PPGCTA, UFPel

Fábio Clasen Chaves, PhD – PPGCTA, UFPel

François Laurens, PhD – IRHS, INRA

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

T559r Tiecher, Aline

Respostas bioquímico-fisiológicas, transcricionais e mapeamento de QTLs de frutos na pós-colheita / Aline Tiecher. – 119f. : il. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Pelotas, 2013. – Orientador Cesar Valmor Rombaldi ; co-orientador César Luis Girardi, Fábio Clasen Chaves, François Laurens.

1.Radiação UV-C. 2.Etileno. 3.Textura. 4.Marcadores moleculares. 5.Locos de características quantitativas.

Banca examinadora:

Antônio de Oliveira, PhD – PPGA, UFPel

Caroline Marques Castro, Dra – Embrapa Clima Temperado

Cesar Valmor Rombaldi, PhD – PPGCTA, UFPel

Fábio Clasen Chaves, PhD – PPGCTA, UFPel

Roberta Manica-Berto, Dra – PPGFs, UFPel

*Aos meus pais Neri e Silvia e ao meu irmão Alisson,
pelos exemplos que são em minha vida e pelo amor incondicional*

Dedico.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que de alguma maneira contribuíram para a construção desse trabalho:

À Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) pela oportunidade na realização do curso.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudo e ao CNPq e à FAPERGS pelo suporte financeiro. Ao programa CAPES-COFECUB, através do qual pude desenvolver parte da minha pesquisa de doutorado em uma instituição estrangeira de reconhecida excelência.

Aos professores do PPGCTA pelos ensinamentos. Em especial ao professor Cesar Valmor Rombaldi, pela inestimável orientação e confiança, e ao professor Fábio Clasen Chaves pelas inúmeras contribuições.

Ao pesquisador César Luis Girardi pela participação no comitê de orientação.

Ao Institut de Recherche en Horticulture et Semences (IRHS) e ao Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), centro Angers-Nantes, e toda a equipe "FruitQual" pela disponibilidade e auxílio na realização do estágio doutoral no exterior. Obrigada a François Laurens, Cindy Verdu, Pauline Lasserre-Zuber, Catherine Bernard e Sophie Le Gall pelo apoio ao longo do período do doutorado sanduíche e por todos os conhecimentos passados a partir do ponto de vista genético.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e contribuições.

Ao Laboratório de Genômica e Fitomelhoramento da UFPel pela colaboração na execução dos trabalhos de expressão transcricional. Em especial à amiga Camila Pegoraro pela sua disponibilidade em me ajudar e pela amizade que se estabeleceu.

À amiga Roberta Manica-Berto pelo apoio constante desde o início, seja no campo, na estufa, no laboratório e na análise estatística.

Aos bolsistas de Iniciação Científica Gustavo Zimmer, Cristiane Stöcker, Letícia Dias e Ícaro Tavares pelo apoio na realização dos experimentos, disposição, empenho e divertida companhia.

Aos funcionários André e Elda pelo convívio, amizade e auxílio.

Aos colegas e amigos do PPGCTA, com os quais pude interagir durante todos esses anos. Muito obrigada pelas contribuições, apoio e convivência. Com certeza a amizade construída será sempre lembrada! Em especial à Joseana Severo, que além de grande amiga, foi parceira em várias publicações.

Un très grand merci aos amigos “Angevins” com quem dividi muitos sonhos e angústias, mas principalmente bons momentos: Marisa, Natália, Giovanna, Aline, Alessandro e Estevão.

Aos meus queridos pais, Neri e Silvia, pelo apoio na minha formação acadêmica e por terem me mostrando o valor da integridade e do esforço. Ao meu irmão Alisson e aos demais familiares pela torcida, carinho e compreensão pelos momentos de ausência. Não existem palavras que possam expressar o meu agradecimento!

Ao meu namorado Rafael, por seu exemplo de vida e, sobretudo, pela paciência e carinho.

À Graci, com quem tive a satisfação de morar nos últimos meses desse curso: simplesmente muito obrigada por tudo.

A todos os meus queridos amigos que sempre estiveram torcendo pelo meu sucesso. Muito obrigada pelo apoio e pelos momentos de alegria, os quais tornaram esse curso mais agradável!

A Deus, pelo dom da vida e bênçãos!

“Uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida”

Sócrates

Resumo

TIECHER, Aline. **Respostas bioquímico-fisiológicas, transcricionais e mapeamento de QTLs de frutos na pós-colheita.** 2013. 119f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Durante o amadurecimento as principais alterações que ocorrem nos frutos, além de resultarem na alteração da coloração, contribuem para a melhoria do *flavor*, da textura e dos atributos de qualidade nutricional e funcional. Em frutos climatéricos, como o tomate e a maçã, a evolução dos atributos de qualidade é influenciada pelo hormônio vegetal etileno, que é aumentado drasticamente durante a maturação. A fim de reduzir perdas nos atributos de qualidade dos frutos, novas estratégias tecnológicas vêm sendo desenvolvidas. O tratamento com o uso da radiação UV-C, além de seu conhecido efeito germicida, é uma dessas estratégias capaz de retardar o processo de amadurecimento. Além disso, a radiação UV-C atua como um agente estressor, capaz de induzir mecanismos de defesa, que é qualificado pelo metabolismo especializado. Assim, no primeiro estudo dessa tese (artigo I), foram avaliadas as alterações moleculares e metabólicas decorrentes da ação do UV-C no armazenamento de tomates cv. Flavortop, e suas relações com eventos influenciados pelo etileno. Para isso, realizaram-se os tratamentos: UV-C a 3,7 KJ/m², 1-MCP (1-metilciclopropeno) a 2µL/L e 1-MCP+UV-C. Observou-se que, embora a radiação UV-C estimule a produção de etileno ocorreu retardo no desenvolvimento da coloração dos frutos. Houve também redução da firmeza de polpa independente dos tratamentos, porém em menor intensidade nos frutos submetidos à aplicação de 1-MCP. Em geral, houve aumento no acúmulo de transcritos de todos os genes estudados um dia após o tratamento com UV-C, enquanto que o tratamento com 1-MCP impediu esse incremento imediato. O teor de poliaminas em frutos tratados com UV-C foi mais elevado quando comparado aos demais tratamentos, sugerindo uma possível relação entre essas moléculas e o retardo do amadurecimento. No segundo estudo da tese (artigo II), foram mapeados locos de características quantitativas (QTLs) dos principais parâmetros da textura da maçã, que é um dos atributos de qualidade que mais influencia o consumo desse fruto. Nessa abordagem, frutos foram colhidos em dois estágios de maturação,

precoce e ótimo, e avaliados na colheita e após dois meses de armazenamento refrigerado a $1,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 80\%$ de umidade relativa nas safras de 2007 e 2011. A população analisada (F1) é oriunda de um cruzamento entre os genótipos X3259 e X3263. A fenotipagem foi feita através de análise sensorial, por medições instrumentais (penetrometria e compressão) e por análise histológica. Um mapa genético com 17 grupos de ligação já estava disponível para esse cruzamento. Foram mapeados 19 QTLs em seis grupos de ligação (LG01, LG02, LG07, LG10, LG11 e LG16) do mapa genético integrado. A percentagem da variação fenotípica (R^2) oscilou entre 8,7% e 67,6% para as variáveis analisadas. Algumas das regiões onde os QTLs foram encontrados estão co-localizadas com genes candidatos já mapeados e disponíveis na literatura. A partir dos resultados obtidos nos dois estudos, verificou-se que: 1) a radiação UV-C atua em nível molecular, desencadeando diferentes respostas bioquímico-fisiológicas nos frutos, especialmente na produção de etileno, o retardo do desenvolvimento da coloração e na biossíntese de poliaminas; 2) o mapeamento de QTLs fornece bases para a localização de genes candidatos que controlam determinantes estruturais da textura da maçã e oferece novas perspectivas para programas de melhoramento.

Palavras-chave: Radiação UV-C. Etileno. Textura. Marcadores moleculares. Locos de características quantitativas.

Abstract

TIECHER, Aline. **Biochemical, physiological and transcriptional responses and QTL mapping in postharvest fruit.** 2013. 119f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

During fruit ripening, besides the changes in color, there are changes that contribute to improving the flavor, texture and nutritional and functional quality attributes. In climacteric fruits, such as tomatoes and apples, the evolution of quality attributes is influenced by the plant hormone ethylene, which is drastically increased during maturation. In order to reduce losses in fruit quality attributes, new technological strategies have been developed. Treatment with UV-C radiation, in addition to its known germicidal effect, is one of these strategies that can slow down the ripening process. In addition, UV-C acts as a stressor agent, capable of inducing defense mechanisms, that it is qualified by specialized metabolism. Thus, in the first study of this thesis (article I), we evaluated the molecular and metabolic changes resulting from the action of UV-C in stored tomatoes cv. Flavortop, and its relationship with events influenced by ethylene. For such, the following treatments were performed: UV-C 3.7 KJ/m², 1-MCP (1-methylcyclopropene) at 2µL/L, and 1-MCP+UV-C. From these treatments it was observed that although the UV-C radiation stimulated ethylene production but delayed red color development of fruits. There was reduction of firmness independently of the treatments, but at lower intensity in fruit treated with 1-MCP. In general, there was an increase in the transcript accumulation of all studied genes one day after UV-C treatment, while 1-MCP treatment limited this accumulation. Polyamine content in fruit treated with UV-C was higher when compared to the other treatments, suggesting a possible relationship between these molecules and ripening delay. In the second study (article II) quantitative trait loci (QTLs) were identified for the main parameters of apple texture, which is a major component of consumer preference for apple quality. For this study, fruits were harvested in 2007 and 2011 at two stages of maturity, early and optimum, and evaluated at harvest and after two months of storage at 1.5 °C ± 80% relative humidity. The study samples were derived from a cross between X3259 and X3263 genotypes. The phenotyping was performed for sensory and instrumental

measurements (penetrometer and compression) and histological analysis. A genetic map with 17 linkage groups was already available for this cross. A total of 19 QTLs were identified in six linkage groups (LG01, LG02, LG07, LG10, LG11 and LG16) of integrated genetic map. The percentage of phenotypic variation (R^2) ranged between 8.7% and 67.6%. Some of the regions where QTLs were found are co-located with candidate genes already mapped and available in the literature. From the results obtained in both studies, it was found that: 1) the UV-C radiation acts on a molecular level, triggering different biochemical and physiological responses in fruits, especially in the production of ethylene, the retardation of color development and biosynthesis polyamines; 2) QTL mapping provides bases for finding candidate genes that control the structural determinants of texture of apple and open new perspectives for breeding programs.

Keywords: UV-C radiation. Ethylene. Texture. Molecular marker. Quantitative trait loci.

Lista de figuras

Introdução geral

Figura 1 - Esquema simplificado da via de biossíntese do etileno e poliaminas.	19
Figura 2 - Interação do etileno e do 1-MCP com receptores de etileno.....	20
Figura 3 - Modelo hipotético representando a possível indução de alguns metabólitos especializados e enzimas antioxidantes após a aplicação de radiação UV-C.....	22
Figura 4 - Esquema representativo da biossíntese de carotenoides em plantas.....	23
Figura 5 - Modelo representativo da organização dos polissacarídeos nas paredes celulares de plantas.....	25
Figura 6 - Diferentes abordagens para o estudo do genoma de vegetais e suas inter-relações.....	28

Artigo I

Figura 1 - Produção de etileno (A) e aparência geral (B) de tomates cv. Flavortop armazenados a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ após os tratamentos. Barras verticais indicam o desvio padrão.....	41
Figura 2 - Firmeza de polpa (A) e valores de Hue $^{\circ}$ (B) em tomates cv. Flavortop armazenados a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ após os tratamentos. Barras verticais indicam o desvio padrão.....	42
Figura 3 - Teor de licopeno, β -caroteno, fitoeno e luteína+zeaxantina ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$) no exocarpo (A, C, E e G) e mesocarpo (B, D, F e H) de tomates Flavortop armazenados a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ depois dos tratamentos. Barras verticais indicam o desvio padrão.....	46
Figura 4 - Teor de ácido clorogênico, ácido cumárico, ácido caféico, quercetina e naringerina ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$) no exocarpo (A, C, E, G e I) e mesocarpo (B, D, F, H e J) de tomates Flavortop armazenados a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ após os tratamentos. Barras verticais indicam o desvio padrão.....	47

Figura 5 - Teores de putrescina e espirmidina (mg/100g) no exocarpo e mesocarpo de tomates cv. Flavortop armazenados a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ após os tratamentos. Barras verticais indicam o desvio padrão.....	48
Figura 6 - Acúmulo relativo de transcritos de genes que codificam para enzimas relacionadas com a síntese de etileno, modificação da parede celular, carotenoides, compostos fenólicos e enzimas antioxidantes no exocarpo e mesocarpo de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de um (1), sete (7) dias e quando apresentavam-se completamente vermelhos (FR) em temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ após os tratamentos. O nível de transcritos é apresentado numa escala de 0 a 10. A cor verde à esquerda da escala indica o nível de expressão mínimo (0), a cor preta no centro representa 5 vezes o nível de expressão mínima e a cor vermelha representa 10 vez mais do que o mínimo, usando o software Multi Experiment Viewer (TIGR MeV).....	50

Artigo II

Figura 1 - Curva de penetrometria (A) e curva do teste duplo de compressão (B) com os parâmetros estudados.....	67
Figura 2 - Locos de características quantitativas (QTLs) detectados no mapa integrado para os atributos de textura, com base na progênie F1 derivada do cruzamento X3259 x X3263 de híbridos de maçã.....	77

Lista de tabelas

Artigo I

Tabela 1 -	<i>Primers</i> usados para qPCR.....	40
Tabela 2 -	Teor de clorofilas totais, carotenoides totais e compostos fenólicos totais (mg 100g ⁻¹) no exocarpo e mesocarpo de tomates Flavortop armazenados a 23±2°C após os tratamentos.....	43

Artigo II

Tabela 1 -	Resultados médios obtidos da mensuração das variáveis de penetrometria, compressão, análise sensorial e histológica na população HIVW colhida nos anos de 2007 e 2011, em estágio de maturação precoce e ótimo, avaliado na colheita e após dois meses de armazenamento refrigerado (1,5 °C±80% UR).....	71
Tabela 2 -	Número de indivíduos fenotipados da população HIVW.....	72
Tabela 3 -	Estimativa da herdabilidade (h ²) das variáveis fenotípicas para a população HIVW nos anos de 2007 e 2011.....	73
Tabela 4 -	QTLs detectados para os parâmetros instrumentais (penetrometria e compressão), sensoriais e histológicos, detectados pelo método de mapeamento múltiplo.....	78

Sumário

1 Introdução Geral	17
2 Radiação UV-C na expressão gênica e nas respostas bioquímico-fisiológicas em tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> Mill.)	30
2.1 Contexto da pesquisa com UV-C em tomates.....	30
2.2 Artigo I: “Efeito da radiação UV-C na produção de etileno, síntese de poliaminas e regulação do amadurecimento em frutos de tomate”.....	32
Resumo.....	32
1 Introdução.....	33
2 Material e Métodos.....	35
2.1 Material vegetal, tratamentos e condições de armazenamento.....	35
2.2 Produção de etileno.....	36
2.3 Firmeza.....	36
2.4 Coloração.....	36
2.5 Teores de clorofilas totais.....	36
2.6 Teores de carotenoides totais e individuais.....	36
2.7 Teores de compostos fenólicos totais e individuais.....	37
2.8 Teores de poliaminas.....	38
2.9 Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR quantitativa (qPCR).....	38
2.10 Desenho experimental e análise estatística.....	39
3 Resultados.....	41
3.1 Etileno.....	41
3.2 Firmeza de polpa e coloração dos frutos.....	41
3.3 Teores de clorofilas totais.....	42
3.4 Carotenoides.....	44
3.5 Compostos fenólicos.....	44
3.6 Poliaminas.....	45
3.7 Acúmulo de transcritos.....	48
4 Discussão.....	51
5 Referências.....	55

3 Cartografia das determinantes estruturais e genéticas associadas com a variabilidade fenotípica da textura da maçã: mapeamento de QTLs.....	61
3.1 Contexto da pesquisa do experimento de mapeamento de QTLs em maçã...	61
3.2 Artigo II: “Mapeamento de QTLs para características de textura em maçã” ...	63
Resumo.....	63
1 Introdução.....	64
2 Material e Métodos.....	65
2.1 Material vegetal.....	65
2.2 Período de colheita e coleta de dados fenotípicos.....	66
2.3 Avaliações fenotípicas.....	66
2.3.1 Análise instrumental, sensorial e histológica.....	66
2.3.2 Análise estatística.....	67
2.4 Extração de DNA e genotipagem com marcadores moleculares.....	68
2.5 Construção do mapa genético.....	68
2.6 Análise de QTLs.....	69
3 Resultados e discussão.....	70
3.1 Construção do mapa genético.....	70
3.2 Avaliações das características fenotípicas.....	70
3.2.1 Herdabilidade.....	72
3.3 Análise de QTLs.....	73
3.3.1 QTLs para as variáveis instrumentais.....	74
3.3.2 QTLs para as variáveis sensoriais.....	75
3.3.3 QTLs para as variáveis histológicas.....	75
4 Conclusão.....	79
5 Referências.....	80
4 Considerações finais e perspectivas.....	84
5 Referências.....	86
Apêndices.....	99
Anexos.....	109

Introdução Geral

As características sensoriais, incluindo o sabor (gosto e aroma), a textura e a aparência visual, assim como os valores nutricional e funcional são os principais determinantes da qualidade de frutos e hortaliças (WALDRON et al., 2003). O entendimento dos mecanismos de como ocorrem as alterações desses atributos durante o amadurecimento é o foco de vários estudos (ALEXANDER; GRIERSON, 2002; NISHIYAMA et al., 2007; GOULAO; OLIVEIRA, 2008; PECH et al., 2008; POMBO et al., 2009; BAPAT et al., 2010; GONZALEZ-AGUILAR et al., 2010), os quais buscam correlacionar eventos moleculares com as respostas bioquímico-fisiológicas e tecnológicas.

A maturação dos frutos pode ser genericamente definida como o resultado do somatório de todas as alterações no metabolismo que tornam o fruto atrativo para o consumo (ADAMS-PHILLIPS et al., 2004). Esse processo é um evento altamente coordenado e geneticamente programado que promove mudanças bioquímicas, fisiológicas e estruturais, que culminam em alterações na coloração, textura, sabor e valores nutricional e funcional. Essas modificações são resultado da biossíntese e acúmulo de pigmentos, da conversão de amido em açúcares, de mudanças na estrutura da parede celular, da biossíntese de compostos aromáticos voláteis, dentre outros (ALEXANDER; GRIERSON, 2002; GOULAO; OLIVEIRA, 2008).

No contexto da fisiologia pós-colheita, os frutos têm sido classificados em dois grupos, climatéricos e não-climatéricos, de acordo com o mecanismo de amadurecimento, em especial pela diferenciação na produção de etileno e na ação auto-catalítica desse hormônio. Mais especificamente, frutos climatéricos são caracterizados por apresentarem um pico de respiração durante o amadurecimento e significativo incremento na produção do hormônio vegetal etileno, além da capacidade de continuar o amadurecimento mesmo após a colheita, respondendo à ação do etileno. Já os frutos não climatéricos não apresentam mudanças marcantes na respiração e na produção de etileno, que se mantêm em níveis baixos durante o amadurecimento. Esses frutos, para amadurecerem, devem completar essa fase ainda na planta (ALEXANDER; GRIERSON, 2002; GIOVANNONI, 2004).

O tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) é considerado um bom modelo para o estudo do crescimento e desenvolvimento de frutos climatéricos por possuir um genoma relativamente pequeno, um curto tempo de geração, a existência de numerosos mutantes espontâneos e induzidos, e por ser facilmente transformado geneticamente (ALEXANDER; GRIERSON, 2002; BAPAT et al., 2010). Além disso, o tomate é o fruto em que as funções do etileno durante o amadurecimento foram mais estudadas, tanto no nível de produção, quanto da ação e da transdução do sinal (CARA; GIOVANNONI, 2008).

O etileno é o único hormônio produzido por todas as plantas e está diretamente relacionado ao processo de amadurecimento e senescência de frutos, sobretudo em frutos climatéricos (BLEECKER; KENDE, 2000). De maneira simplificada, a biossíntese do etileno, ocorre a partir do aminoácido metionina que é convertido em S-adenosilmetionina (SAM) por ação enzima SAM sintetase. Na sequência, a SAM é convertida em ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) pela ACC sintase e, por último, o ACC é convertido a etileno por oxidação catalisada pela ACC oxidase (Fig. 1) (BAPAT et al., 2010). A S-adenosilmetionina também é substrato para a via de biossíntese de poliaminas (MARTIN-TANGUY, 2001).

Além do etileno, as poliaminas também têm participação importante durante o amadurecimento de frutos, especialmente porque são consideradas controladoras desse processo, retardando a senescência (TASSONI et al., 2006). Poliaminas são moléculas catiônicas essenciais para o crescimento e desenvolvimento de plantas, estando envolvidas em diversos eventos fisiológicos, incluindo a indução da floração, desenvolvimento reprodutivo, frutificação e amadurecimento (NEILY et al., 2011). Putrescina (Ptc), espermidina (Spd) e espermina (Spm) são as principais poliaminas presentes em células vegetais e sua concentração é variável de acordo com o estágio de desenvolvimento, tecido e grau de maturação (MEHTA et al., 2002; SHAMA; ANDERSON, 2005). Além disso, tem sido proposto que as poliaminas também estão envolvidas como resposta às condições de estresse (MATHOOKO et al., 1995; ZAPATA et al., 2004).

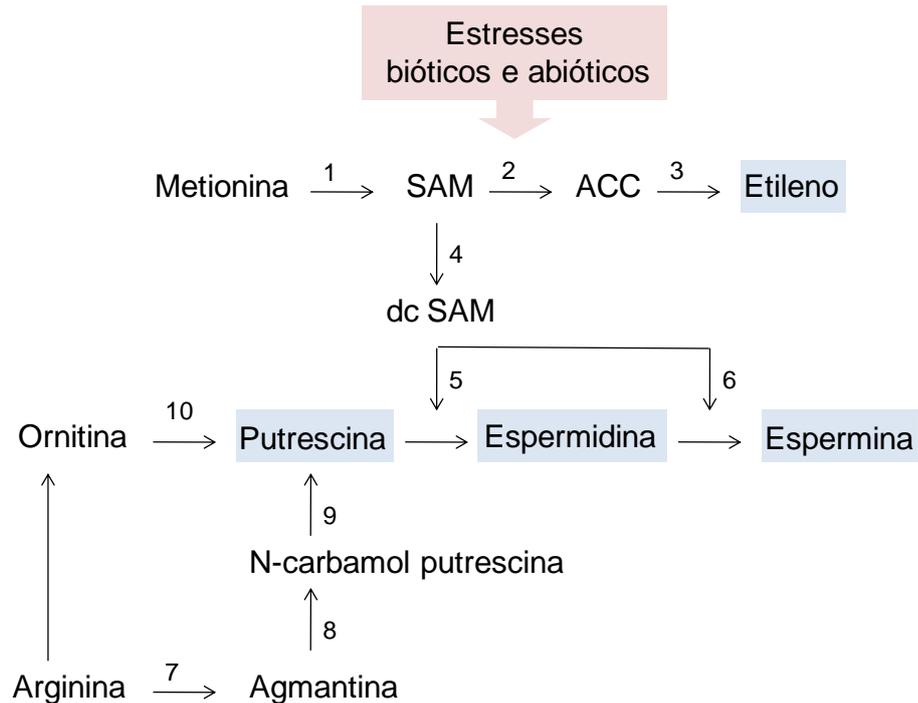


Figura 1. Esquema simplificado da via de biossíntese do etileno e poliaminas. As enzimas envolvidas são: (1) SAM sintetase, (2) ACC sintase, (3) ACC oxidase, (4) SAM descarboxilase, (5) espermidina sintase, (6) espermina sintase, (7) arginina descarboxilase, (8) agmatina iminohidrolase, (9) N-carbamol putrescina aminohidrolase e (10) ornitina descarboxilase (adaptado de MARTIN-TANGUY, 2001).

A biossíntese de poliaminas é regulada pela atividade de três enzimas chave, SAM descarboxilase, ornitina descarboxilase (ODC) e arginina descarboxilase (ADC) (Fig. 1). A putrescina é sintetizada diretamente a partir da ornitina pela ODC e indiretamente pela arginina através da ADC. A espermidina é formada a partir da adição de um grupo aminopropil derivado da S-adenosilmetionina descarboxilada (dcSAM) pela espermidina sintase. A adição de outro grupo aminopropil leva a formação da espermina via espermina sintase (MARTIN-TANGUY, 2001; TASSONI et al., 2006). Como citado anteriormente, as poliaminas compartilham com o etileno um intermediário comum, a SAM, que é utilizada como substrato tanto pela ACC sintase para a biossíntese de etileno, como pela SAM descarboxilase para a biossíntese de poliaminas (TASSONI et al., 2006). Embora a relação entre o etileno e poliaminas ainda não seja totalmente esclarecida,

devido ao fato das duas vias metabólicas apresentarem um intermediário comum, estudos evidenciam que a biossíntese de poliaminas e de etileno ocorrem simultaneamente e que o substrato SAM não é o fator limitante (STEVENS et al., 1998; MATHOOKO et al., 1995; MEHTA et al., 2002).

Devido à ação do etileno sobre o amadurecimento e senescência de frutos e hortaliças, estratégias tecnológicas vêm sendo desenvolvidas para prolongar a vida de prateleira. Assim, a adoção de procedimentos que reduzam a ação deste fitohormônio, como o emprego de atmosfera refrigerada (NUÑES et al., 1995), atmosfera modificada e controlada (HERTOG et al., 2001; ODRIUZOLA-SERRANO et al., 2008), irradiação gama (D'AMOUR, et al., 1993) e tratamento com compostos químicos, como por exemplo, 1-metilciclopropeno (1-MCP) (CLIFF et al., 2009), vêm sendo empregados com sucesso. O uso de 1-MCP, um potente inibidor da ação do etileno, tem sido utilizado por estender a vida de prateleira de uma variada gama de frutos e produtos hortícolas, pois promove atraso na maturação e, conseqüentemente, da senescência (CHOI et al., 2009). O 1-MCP compete pelos mesmos sítios receptores do etileno, impedindo-o de agir nos tecidos vegetais, conforme esquematizado na Fig. 2.

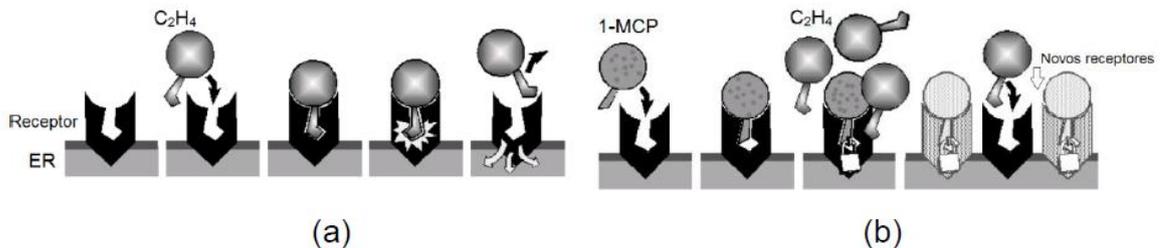


Figura 2. Interação do etileno e do 1-MCP com receptores de etileno. (a) Ligação da molécula de etileno com o receptor promove o desencadeamento de inúmeras reações bioquímicas no tecido vegetal. (b) Quando o 1-MCP se liga ao receptor de etileno, as moléculas de etileno são impedidas de se ligarem aos receptores, no entanto, novos receptores são sintetizados posteriormente (adaptado de BLANKENSHIP, 2001).

Além das funções fisiológicas no desenvolvimento e amadurecimento de frutos, o etileno pode ser considerado como um hormônio de resposta a estresses bióticos e abióticos, porque a sua síntese é induzida por sinais como infecções,

ferimentos, alterações de temperatura, salinidade, radiação, déficit hídrico, alterações de composição atmosférica, dentre outros (DUGARDEYN; VAN DER STRAETEN, 2008). Os estresses bióticos ou abióticos, além de induzirem a produção de etileno, promovem a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), tais como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os quais podem causar danos celulares por induzir a peroxidação lipídica e/ou alterar o metabolismo genético (MITLLER, 2002). As superóxido dismutases (SOD) são consideradas as principais enzimas de defesa antioxidante, pois regulam a concentração celular de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 ($O_2^{\cdot-} \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$). A forma H_2O_2 é eliminada por catalases (CAT) e ascorbato peroxidases (APX). As catalases removem a maior parte do H_2O_2 , enquanto as ascorbato peroxidases podem reduzir os níveis de H_2O_2 , que é inacessível para a CAT, pois estão presentes em diferentes localizações sub celulares (BREUSEGEM et al., 2001). Embora tradicionalmente as ROS sejam consideradas como produto tóxico, essas moléculas são produzidas como moléculas de sinalização, modulando a expressão de genes e proteínas relacionadas com a defesa celular contra estresses bióticos e abióticos (MITTLER, 2002; TAYLOR et al., 2009).

Diferentes condições ambientais podem induzir condições de estresse, que alteram significativamente o metabolismo dos vegetais. Esses estresses, abióticos ou bióticos, incluem a falta de água, a salinidade, ocorrência de temperaturas extremas (altas e baixas), metais pesados, ataque por patógenos, ferimentos e radiação ultravioleta (UV) (CISNEROS-ZEVALLOS, 2003; CHARLES et al., 2008a, CHARLES et al., 2008b; GONZALEZ-AGUILAR et al., 2010; COGO et al., 2011). Estudos vêm comprovando que diante à estas condições adversas, como a exposição à radiação UV-C, há indução da síntese de enzimas antioxidantes e metabólitos com propriedades antioxidantes, que atuam na defesa à oxidação celular (Fig. 3) (BARKA, 2001; GONZALEZ-AGUILAR et al., 2007; CHARLES et al., 2008a, CHARLES et al., 2008b; ERKAN et al., 2008; LIU et al., 2009; BRAVO et al., 2012).

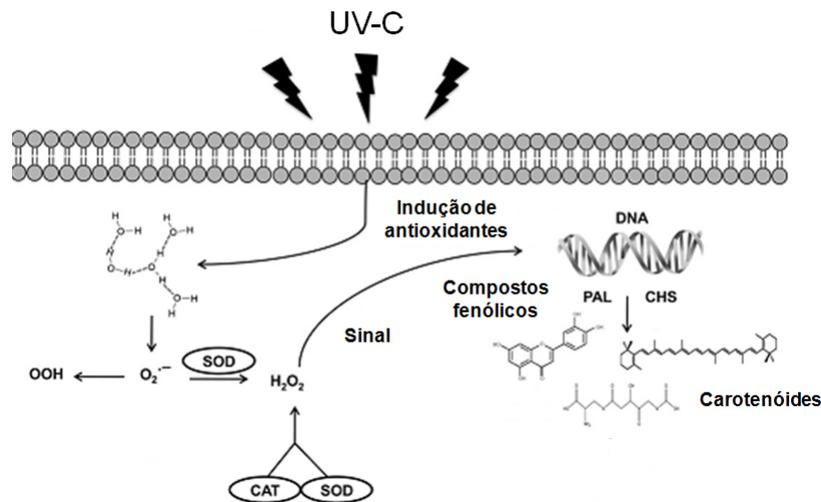


Figura 3. Modelo hipotético representando a possível indução de alguns metabólitos especializados e enzimas antioxidantes após a aplicação de radiação UV-C (adaptado de GONZÁLEZ-AGUILAR et al., 2010).

A radiação UV-C (100 - 280 nm) constitui-se num método físico utilizado na pós-colheita de frutos e hortaliças, devido à ação germicida e/ou pela indução da resistência a patógenos e por ser capaz de retardar o amadurecimento (MAHARAJ et al., 1999; MARQUENIE et al., 2002; VICENTE et al., 2005). No entanto, estudos têm verificado a importância da radiação UV-C na indução de metabólitos com propriedades antioxidantes, relacionados com respostas de defesa. Em morangos, por exemplo, a radiação UV-C promoveu incremento nos teores de antocianinas (BAKA et al., 1999), compostos fenólicos e na atividade antioxidante (ERKAN et al., 2008). González-Aguilar et al. (2007) verificaram que a radiação UV-C também foi capaz de estimular a síntese de compostos fenólicos em mangas. Charles et al. (2008 a,b) demonstraram que a radiação UV-C promoveu a indução de resistência às podridões causadas por *Botrytis cinerea*, devido ao incremento da síntese de compostos fenólicos em células do exocarpo e mesocarpo, além do aumento da lignificação e suberização do exocarpo de frutos de tomate, e Barka (2001) observou aumento da atividade de enzimas do sistema antioxidante em tomates expostos à radiação UV-C. Liu et al. (2009) verificaram que a radiação UV-C também promoveu um aumento no teor de licopeno em tomates. Desse modo, a radiação UV-C tem sido apresentada como um método capaz de retardar o processo de amadurecimento e não afetar negativamente a qualidade de frutos durante o armazenamento, prolongando a vida de prateleira.

A qualidade de frutos inclui atributos sensoriais (suculência, aroma, acidez, doçura, coloração, textura) e o valor nutricional e funcional, os quais são influenciados pelo processo de maturação (ABBOTT, 1999; HARKER et al., 2003). Em tomate, uma das alterações mais facilmente perceptíveis que ocorre na maturação corresponde à degradação da clorofila e síntese de pigmentos denominados carotenoides, que são responsáveis pela coloração característica de frutos maduros, os quais são sintetizados e armazenados nos cromoplastos (BARSAN et al., 2010). O principal carotenoide encontrado nos frutos de tomate é o licopeno, que tem sua biossíntese a partir do geranilgeranilpirofosfato (GGPP), precursor dos carotenoides, que é transformado em fitoeno pela ação da enzima fitoeno sintase (PSY), e que, na sequência, é convertido em licopeno através da fitoeno desaturase (PDS) e da ζ -caroteno desaturase (ZDS). A ciclização do licopeno pode gerar as formas α - ou β -caroteno. Esta via de biossíntese plastidial também é importante por ser precursor do grupo da vitamina E, incluindo os tocoferóis (Fig. 4) (BRAMLEY, 2002; TANAKA et al., 2008; FRASER et al., 2009).

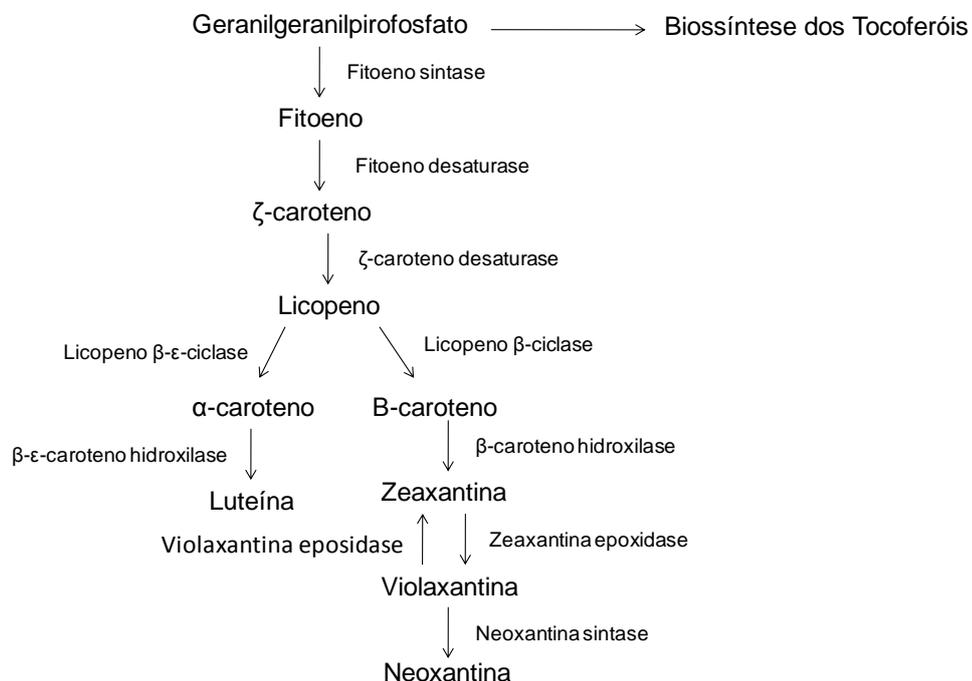


Figura 4. Esquema representativo da biossíntese de carotenoides em plantas (adaptado de TANAKA et al., 2008).

A perda da firmeza durante o amadurecimento e as demais mudanças na textura, também são problemas fisiológicos durante a pós-colheita de frutos e

hortaliças que vem sendo bastante estudados. Com a evolução da maturação, a “desestabilização/desmontagem” da parede celular e a redução da adesão celular são os principais fatores que levam à aceleração dessa alteração (ALEXANDER; GRIERSON, 2002; GOULAO; OLIVEIRA, 2008). Assim, as modificações da textura são atribuídas, em parte, à ação de enzimas e proteínas envolvidas na despolimerização e solubilização da parede celular e da lamela média, como é o caso das poligalacturonases, pectato liases, pectina metilesterases, β -galactosidases, α -arabinofuranosidases, β -glucanases, β -xilosidases, expansinas e outras (BRUMMELL, 2006; NISHIYAMA et al., 2007; GOULAO; OLIVEIRA, 2008).

Um dos principais componentes estruturais da parede celular é a celulose (Cel). As fibras de celulose são interconectadas através de pontes de hidrogênio, com hemiceluloses de alto peso molecular, tipicamente xiloglicanas (XG) ou araninoxilanas, as quais estão emaranhadas numa matriz de pectina. A pectina é um termo coletivo para frações de ácido galacturônico, sendo que a pectina mais abundante é a ramnogalacturonana I (RGI), que consiste numa cadeia estrutural alternada de ramnose e ácido galacturônico com vários grupos laterais, principalmente galactanas (Gal) e arabinanas (Ara). Outros componentes majoritários constituídos por cadeias de ácido galacturônico são a homogalacturonana (HG), a xilogalacturonana (XGA) e ramnogalacturonana II (RGII) (RIDLEY et al., 2001; VORWERK et al., 2004). A Fig. 5 apresenta um modelo da organização desses polissacarídeos na parede celular de vegetais.

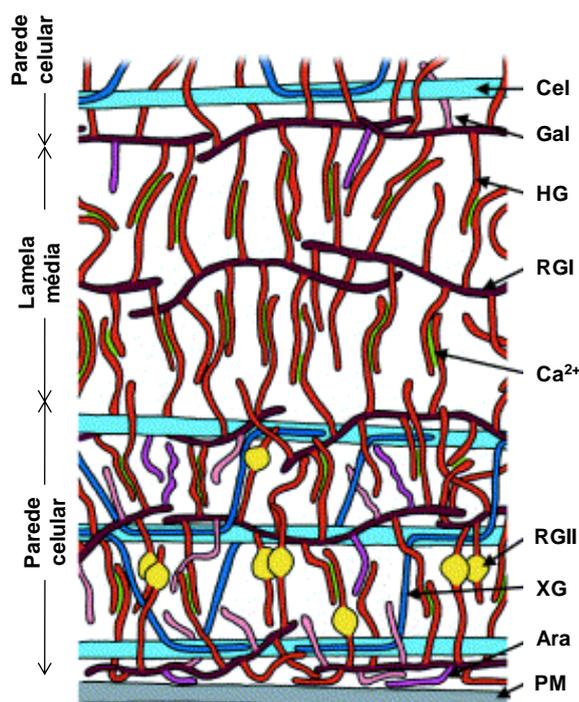


Figura 5. Modelo representativo da organização dos polissacarídeos nas paredes celulares de plantas. Os componentes essenciais do modelo são a celulose (Cel), que são reticulados por microfibrilas hemicelulose, principalmente xiloglicanas (XG). Ramnogalacturonano I (RGI) também está alinhada com as microfibrilas de celulose. Homogalaturonana (HG), arabinanas (Ara), galactanas (Gal) e ramnogalacturonano II (RGII) estão previstos como sendo ramos laterais ligados a RGI, formando um aglomerado de alto peso molecular. Além disso, moléculas de cálcio (Ca^{2+}) formam extensas ligações cruzadas entre as porções de HG. PM indica a membrana plasmática (VORWERK et al., 2004).

A maçã (*Malus x domestica* Borkh.) é um dos produtos frutícolas mais importantes no mundo e é um dos principais modelos de estudo para o entendimento do mecanismo de controle da textura em frutos. Maçãs de boa qualidade devem responder a critérios de tamanho, forma e aparência visual (coloração), de percepção organoléptica (equilíbrio de açúcares/ácidos), de aromas e de textura (HARKER et al., 2003). A textura tem sido definida como uma característica multifatorial, sendo composta por um conjunto de fatores como firmeza, rigidez, elasticidade, crocância, suculência, entre outros (SZCZESNIAK, 2002). Desse modo, a maior parte das características relacionadas com a textura, depende da composição dos polissacarídeos da parede celular e da lamela média

(GÁLVEZ-LÓPEZ et al., 2011), da organização celular (WALDRON et al., 2003), bem como sobre as características de distribuição da célula dentro dos tecidos (JARVIS et al., 2003; GALVEZ-LOPEZ et al., 2012).

A demanda por variedades de maçãs com alta qualidade, que atendam às exigências dos produtores, especialmente relacionados com a resistência a estresses bióticos e abióticos, e dos consumidores, que buscam qualidade sensorial, especialmente quanto às características de textura, continua sendo um desafio. Como resultado dessa procura, tem-se cada vez mais interesse na utilização de marcadores moleculares em programas de melhoramento, especialmente no desenvolvimento da seleção assistida por marcadores (COLLARD et al., 2005; KENIS et al., 2008).

Um marcador molecular pode ser considerado como uma “marca” do genoma, localizado em um local específico do DNA e transmitido para a descendência de acordo com as regras clássicas de herdabilidade, não sendo influenciados pelo ambiente e por outros genes (SEMAGN et al., 2006). Existem diversos marcadores moleculares descritos na literatura, os quais são geralmente classificados de acordo com as técnicas de análises empregadas para seu estudo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Entre os marcadores moleculares baseados na técnica de PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) se destacam:

1. SSR (do inglês, *simple sequence repeat*) ou marcadores microssatélites, que são constituídos de sequências curtas de DNA repetidas em *tandem* (exemplo: ATATATAT) e;

2. SNPs (do inglês, *single nucleotide polymorphism*) que se baseiam na detecção de polimorfismos resultantes da alteração de um único nucleotídeo, relacionado com a inserção, deleção ou mutação de uma base (COLLARD et al., 2005; SEMAGN et al., 2006).

Os mapas genéticos de ligação são representações que permitem definir uma lista ordenada de marcadores moleculares nos cromossomos, cujas distâncias são determinadas pela taxa de recombinação medida em centiMorgan (cM) (COLLARD et al., 2005). Morgan, em 1910, foi o primeiro a sugerir que os genes e marcadores são herdados em conjunto e o primeiro mapa genético de ligação foi elaborado por seu estudante Sturtevant em 1913 para a mosca-de-fruta *Drosophila* (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Sturtevant utilizou marcadores fenotípicos (como o tamanho das asas, a cor dos olhos e a cor do corpo), e assim, pode cartografar os

genes que controlam as características estudadas. Atualmente, os marcadores moleculares são amplamente empregados na construção de mapas genéticos de ligação, e graças ao sequenciamento de genomas, um grande número de novos marcadores moleculares pode ser localizado ao longo dos genomas, possibilitando avanços nos estudos de genética quantitativa, como no caso da maçã, que teve seu genoma publicado em 2010 (VELASCO et al., 2010).

O controle genético dos principais atributos de qualidade de um fruto envolve uma rede gênica de vários locos distribuídos em diferentes regiões do genoma, que quando ativados, regulam o metabolismo bioquímico e fisiológico. Essas características são denominadas poligênicas, quantitativas ou de herança complexa, e os locos que as controlam são chamados de QTLs (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; COLLARD et al., 2005). A identificação de QTLs e de marcadores moleculares associados a estes QTLs tem sido utilizada para melhorar a velocidade e eficiência de seleção de genótipos (KENIS et al., 2008).

No caso da maçã, a localização de QTLs relacionados a atributos de qualidade do fruto, especialmente a textura são correlacionados a avaliações mecânicas através da penetrometria e da compressão (KING et al., 2001; KENIS et al., 2008; LONGHI et al., 2011). Outros parâmetros de qualidade sensorial, como a acidez e açúcares, também têm sido alvo da busca de QTLs (LIEBHARD et al., 2003; KENIS et al., 2008). Assim, identificar QTLs de atributos de importância da qualidade dos frutos tornou-se um meio para ajudar a desvendar os mecanismos de controle genético de características importantes na maçã, e essa estratégia pode ser usada para outros frutos.

Diante do exposto, e buscando compreender e relacionar eventos moleculares com as diferentes respostas bioquímicas e fisiológicas, a biologia molecular e as estratégias ômicas se apresentam como bases conceituais de significativa importância na investigação do mecanismo de regulação de respostas de interesse tecnológico na pós-colheita, conforme esquematizado na Fig. 6. Embora a tese trate de duas temáticas distintas, ambas buscam esclarecer e compreender as alterações moleculares, bioquímicas e fisiológicas que afetam a qualidade de frutos.

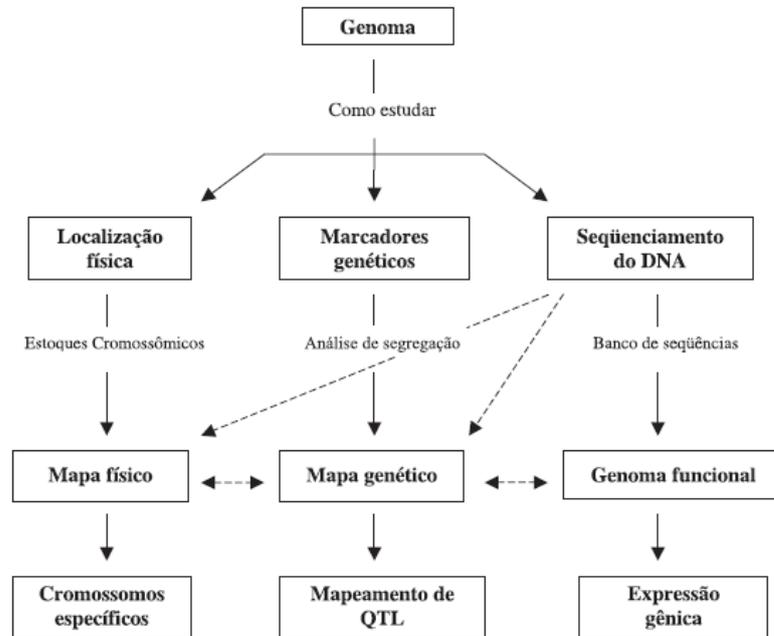


Figura 6. Diferentes abordagens para o estudo do genoma de vegetais e suas inter-relações (CARNEIRO; VIEIRA, 2002).

Neste contexto, o trabalho desenvolvido ao longo dessa tese é articulado em dois temas de pesquisa, estruturados, a partir da Introdução Geral, em duas seções:

- i) pesquisa exploratória e observações que resultaram na publicação do artigo I: “UV-C effect on ethylene and polyamines and regulation of tomato fruit ripening”, e;
- ii) pesquisa exploratória e observações que resultaram no artigo II: “Mapeamento de QTLs para características de textura em maçã”.

No primeiro experimento, a aplicação do agente estressor UV-C, teve como objetivo estudar a expressão gênica e as respostas bioquímico-fisiológicas decorrentes do estresse abiótico causado pela radiação UV-C em tomates cv. Flavortop. Para tal, foram avaliados os efeitos do tratamento sobre a produção de etileno, firmeza, desenvolvimento de coloração, teor de carotenoides e de compostos fenólicos, além de avaliar a expressão transcricional de genes relacionados com essas vias metabólicas e com enzimas antioxidantes.

Em relação à radiação UV-C, considerando a evolução do conhecimento nessa temática, foi emitida a hipótese que o estresse abiótico causado pela radiação UV-C promove a indução da síntese de etileno, ativando genes de vias metabólicas reguladas por esse hormônio.

No segundo experimento, com maçãs, foi realizado o mapeamento de QTLs responsáveis por características relacionados com a textura da maçã, associados com as análises instrumentais (penetrometria e compressão), análise sensoriais e avaliação histológica nos 17 grupos de ligação, que compõem o mapa genético de ligação da maçã.

No caso das maçãs, trata-se de uma pesquisa de carácter mais descritivo, o que leva à emissão de uma hipótese mais genérica, ou seja, os locos de QTLs detectados e mapeados permitem evidenciar regiões genômicas associadas com as características da textura em maçã.

Estruturalmente, a tese será apresentada em dois artigos, cada um abordando e tratando uma das hipóteses citadas.

2 Radiação UV-C na expressão gênica e nas respostas bioquímico-fisiológicas em tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.)

2.1 Contexto da pesquisa com UV-C em tomates

O artigo I aborda os principais resultados do projeto de pesquisa visando o estudo do efeito do tratamento com aplicação de radiação UV-C. Para isso, tomates cv. Flavortop foram colhidos em estágio de maturação *breaker*, a expressão gênica e as respostas bioquímico-fisiológicas foram avaliadas, com o objetivo de melhor compreender como é regulada a percepção desse estresse abiótico. Esse experimento partiu da hipótese que o estresse abiótico causado pela radiação UV-C promove a indução da síntese de etileno, ativa genes de vias metabólicas reguladas por esse hormônio e afeta o comportamento bioquímico-fisiológico dos frutos.

Trabalhos preliminares, realizados pelo grupo de pesquisa, de 2008 a 2011, com tomates cv. Flavortop e MicroTom, embasados em uma ampla pesquisa bibliográfica, permitiram verificar que:

- A aplicação de radiação UV-C afeta o metabolismo de maturação de tomates colhidos no estágio de maturação *breaker*, retardando o amadurecimento dos frutos, conforme pode ser visualizado no Apêndice A;

- A radiação UV-C na dosagem de 3,7 KJ/m² proporciona aumento da qualidade na pós-colheita dos frutos. Doses menores apresentam efeitos menos significativos e doses maiores resultam em injúrias aos frutos, sendo necessário girar os frutos 180° a cada 4 minutos para adquirirem uma radiação uniforme;

- Além das alterações fenotípicas (principalmente na coloração, com retardo de aproximadamente três dias na maturação), há alterações no acúmulo de transcritos de genes envolvidos com as principais vias metabólicas estudadas no mesocarpo dos frutos e aumento da produção de etileno nos frutos submetidos ao tratamento com UV-C.

Esses resultados deram origem à conclusão da dissertação intitulada “Efeito da radiação UV-C na expressão gênica e nas respostas bioquímico-fisiológicas em frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.)” (TIECHER, 2010), que incluiu as seguintes etapas:

- Desenho de *primers* gene-específicos, a partir das sequências de nucleotídeos para tomate obtidas no Sol Genomics Network e National Center for Biotechnology Information, usando *Vector*TM (Invitrogen);

- Verificação da eficiência de amplificação dos *primers* utilizados para a quantificação relativa, através da técnica de PCR em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR). Para isso, prepararam-se diluições seriadas com os cDNAs das amostras de concentrações conhecidas, a fim de se construir curvas padrões, que serviram para quantificar as amostras de interesse. A eficiência de amplificação da reação de qPCR foi calculada a partir da inclinação da reta (*slope*) da equação de regressão linear obtidos pelo *software* de análise, de acordo com a seguinte equação:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})}$$

O apêndice B apresenta os resultados da validação dos *primers* utilizados nesse estudo.

Frente ao exposto, o experimento foi conduzido com tomates cv. Flavortop, junto ao Laboratório de Biotecnologia de Alimentos (DCTA-UFPE) em 2011. Visto que a radiação UV-C induz a síntese de etileno, um tratamento foi destinado a avaliar o efeito do UV-C sem a ação do etileno, utilizando como inibidor do etileno o 1-MCP. Os tratamentos aplicados foram: UV-C a 3,7 KJ/m², 1-MCP a 2 µL/L e 1-MCP seguido de radiação UV-C.

O Anexo A apresenta o artigo resultante desse experimento publicado na revista *Postharvest Biology and Technology* intitulado “UV-C effect on ethylene and polyamines and regulation of tomato fruit ripening”.

2.2 Artigo I: “Efeito da radiação UV-C na produção de etileno, síntese de poliaminas e regulação do amadurecimento em frutos de tomate”

Aline Tiecher, Luciane Arantes de Paula, Fábio Clasen Chaves, Cesar Valmor Rombaldi
UFPel/FAEM, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, C. P. 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.

Resumo

Respostas bioquímico-fisiológicas e moleculares de frutos de tomate colhidos em estágio de maturação *breaker* tratados com UV-C (3,7 kJ/m²) e 1-metilciclopropeno (1-MCP; 2µL/L), separadamente ou em combinação, foram avaliados pós-colheita até alcançarem o estágio completamente maduro (FR). Os teores de metabólitos e acúmulo de transcritos de genes selecionados foram avaliados no exocarpo e mesocarpo. Observou-se que a radiação UV-C induziu a produção de etileno e mesmo assim retardou a maturação, especialmente pela menor evolução da coloração dos frutos. O teor de poliaminas em frutos tratados com UV-C foi maior do que em tomates não tratados. Conforme esperado, frutos tratados com 1-MCP apresentaram retardo na produção de etileno, no desenvolvimento da coloração e na perda da firmeza de polpa. A combinação entre 1-MCP e UV-C promoveu incremento no acúmulo de carotenoides totais, indicando que esse evento é parcialmente dependente de etileno, pois quando os frutos foram submetidos somente ao tratamento com 1-MCP, houve menor acúmulo de carotenoides. Similarmente a degradação de clorofilas também foi parcialmente etileno dependente. De maneira geral, ao se analisar o perfil transcricional dos genes envolvidos com as vias metabólicas estudadas, verificou-se que a radiação UV-C induz rapidamente (no primeiro dia) a expressão da maioria dos genes estudados e que o 1-MCP inibe fortemente a expressão dos genes um dia após os tratamentos. Os resultados sugerem que a radiação UV-C retarda o amadurecimento, apesar de estimular a produção de etileno, promovendo alterações moleculares mais pronunciadas no mesocarpo do que a exocarpo e alterações limitadas no conteúdo fitoquímico, que podem ser influenciadas pelo aumento do teor de poliaminas.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum*. Estresse abiótico. Etileno. 1-metilciclopropeno. Poliaminas.

1 Introdução

Em frutos climatéricos, como é o caso do tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.), o amadurecimento continua após a colheita, sendo caracterizado pelo aumento da taxa respiratória e da produção de etileno (CARA; GIOVANNONI, 2008). As alterações moleculares e bioquímico-fisiológicas que ocorrem durante a maturação, além de resultarem na alteração das características sensoriais, contribuem para a melhoria da qualidade nutricional e funcional. Em tomates, a redução dos teores de clorofilas e a síntese de carotenoides, resultando no desverdeamento e avermelhamento dos frutos, constituem-se nas alterações visuais mais facilmente perceptíveis e normalmente utilizadas para monitorar a maturação (BARSAN et al., 2010). Dentre os pigmentos mais sintetizados durante a maturação, destaca-se o licopeno, mas outros carotenoides como fitoeno, β -caroteno, luteína e zeaxantina, também são sintetizados. Além dos carotenoides, o tomate é considerado como uma importante fonte de antioxidantes devido à presença de compostos fenólicos como, por exemplo, o ácido caféico, o ácido *p*-cumárico, o ácido clorogênico, a naringerina, a quercetina e o kampferol (LONG, et al., 2006). De modo geral, os teores de compostos com propriedades antioxidantes são fortemente dependentes de fatores como genótipo (GEORGE et al., 2004), condições de cultivo (COGO et al., 2011), estágio de maturação (SEVERO et al., 2011) e condições de armazenamento (BRAVO et al., 2012).

Além disso, sabe-se que estresses abióticos moderados podem contribuir para aumentar a síntese de moléculas do metabolismo especializado (CHARLES et al., 2008a,b; LIU et al., 2009; JAGADEESH et al., 2009). É nesse contexto que o uso da radiação UV-C, um tipo de radiação não-ionizante com comprimento de onda entre 100 e 280 nm, constitui-se num método físico que pode promover a síntese de compostos de interesse, além de reduzir a incidência de patógenos (MAHARAJ et al., 1999; MARQUENIE et al., 2002; CHARLES et al., 2008 a,b). Por exemplo, o tratamento com radiação UV-C promoveu incremento nos teores de compostos fenólicos em morangos (ERKAN et al., 2008) e em tomate (JAGADEESH et al., 2009; BRAVO et al., 2012). Pombo et al. (2011) demonstraram que a prevenção às podridões em morangos tratados com UV-C se deve, ao menos em parte, à ativação de genes de defesa, como β -1,3-glucanases, chitinases, peroxidases e fenilalanina amônia liase. Charles et al. (2008 a,b) demonstraram que a radiação UV-C promove a indução de resistência às podridões causadas por *Botrytis cinerea* e Barka (2001)

observou aumento da atividade de enzimas do sistema antioxidante em tomates expostos à radiação UV-C. Além disso, Liu et al. (2009) e Bravo et al. (2012) observaram aumento no teor de licopeno em tomates, ambos submetidos à radiação UV-C e Stevens et al. (1998) verificaram maiores teores de poliaminas em tomates tratados com UV-C. O aumento no teor de poliaminas (putrescina e espermina) após o tratamento com UV-C também foi encontrado em mangas e maçãs (GONZÁLEZ-AGUILAR et al., 2001; KONDO et al., 2011). Em geral, a radiação UV-C pode contribuir no incremento da vida de prateleira e na qualidade de frutas e hortaliças através de três formas principais: redução da incidência de patógenos (MARQUENIE et al., 2002), indução de proteínas PR (thaumatin-like, glucanases, quitinases, outras) e/ou metabólitos específicos envolvidos na defesa sistêmica da planta (CHARLES et al., 2008a,b; POMBO et al., 2011), e/ou mudando a sinalização hormonal, alterando o processo de amadurecimento e acúmulo de metabólitos (STEVENS et al., 1998; MAHARAJ et al., 1999). Desse modo, o tratamento pós-colheita de frutas e hortaliças com UV-C, tem potencial para se tornar uma alternativa tecnológica para melhorar a sua conservação. A aplicação de doses herméticas de radiação UV-C pode não só melhorar o potencial de armazenamento, mas também aumentar as propriedades nutricionais e funcionais de frutas e hortaliças.

Baseado nisto, o objetivo deste trabalho está centrado na geração de conhecimento científico relacionado com a compreensão de como se dá regulação gênica e as respostas bioquímico-fisiológicas decorrentes do estresse abiótico causado pela radiação UV-C em frutos de tomate cv. Flavortop. Neste contexto, serão avaliados os efeitos dessa radiação sobre a produção de etileno, firmeza, desenvolvimento de coloração, teores de clorofilas, de carotenoides, de compostos fenólicos, de poliaminas, além de avaliar a expressão transcricional relativa de genes relacionados com essas vias metabólicas e com as enzimas antioxidantes. Para tal, partiu-se da hipótese que o estresse abiótico causado pela radiação UV-C, apesar de poder induzir a síntese de etileno, poderia ativar genes de vias metabólicas protetoras da homeostase celular e estimular a síntese de moléculas retardadoras da senescência.

2 Material e Métodos

2.1 Material vegetal, tratamentos e condições de armazenamento

O cultivo de tomates (*Solanum lycopersicum* cv. Flavortop), foi realizado em casa de vegetação da Universidade Federal de Pelotas. Os frutos foram colhidos no estágio de maturação *breaker* em janeiro de 2011. Apenas frutos livres de defeitos, com tamanho aproximado de 2 cm de comprimento, 2,5 cm de diâmetro e massa aproximada de 5,5 g foram utilizados. Após a colheita (aproximadamente 15 minutos), os frutos foram submetidos ao tratamento com radiação UV-C. A fonte de radiação foi composta de quatro lâmpadas germicidas (Phillips® 30W), com comprimento de onda de 254 nm. A intensidade da radiação emitida foi determinada com medidor de luz ultravioleta digital (RS-232 Modelo MRUR-203, Instrutherm®). Os frutos foram expostos à radiação a uma distância de 60 cm da extremidade distal, com dose pré-estabelecida de 3,7 kJ/m² durante 16 minutos (MAHARAJ et al., 1999; CHARLES et al., 2008 a,b), sendo que a cada 4 minutos, os frutos foram girados 180°, a fim de permitir que recebessem radiação em toda a superfície. Como a radiação UV-C induz a síntese de etileno, um tratamento foi destinado a avaliar o efeito do UV-C sem a ação do etileno, utilizando o 1-metilciclopropeno (1-MCP). Deste modo, aplicaram-se os seguintes tratamentos: UV-C a 3,7 kJ/m²; 1-MCP a 2 µL/L; e, 1-MCP+UV-C. Para aplicação do 1-MCP, foi utilizado o produto comercial Smartfresh® contendo 0,34% de ingrediente ativo. No tratamento 1-MCP+UV-C, a radiação foi aplicada 24 horas após o tratamento com 1-MCP. Depois de tratados, os frutos foram acondicionados em bandejas plásticas e mantidos no escuro em temperatura de 23±2 °C, com umidade relativa de 80-85%.

Para as análises moleculares e bioquímicas, as sementes e o gel foram descartados e os tecidos do exocarpo e mesocarpo foram avaliados separadamente. A produção de etileno, cor e firmeza dos frutos foi realizada no fruto inteiro.

As amostras foram coletadas no momento da colheita, um e sete dias depois dos tratamentos e quando os frutos estavam completamente maduros (FR). Frutos controle atingiram o estágio completamente maduro em sete dias, frutos tratados com UV-C em 10 dias e frutos tratados com 1-MCP e 1-MCP+UV-C em 14 dias.

2.2 Produção de etileno

Foram pesados aproximadamente 40 g de frutos e, logo após, acondicionados em frascos de polipropileno de 80 mL, com tampa rosca. Depois de 1 hora, foi coletado 1 mL de atmosfera gasosa, com auxílio de uma seringa hipodérmica. O etileno foi quantificado por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama, de acordo com Girardi et al. (2005) e os resultados foram expressos em nanolitros por grama por hora (nL/g/h).

2.3 Firmeza de polpa

A firmeza de polpa foi determinada com auxílio de texturômetro (Texture Analyzer, TA.XT plus, Stable Micro Systems Texture Technologies[®]), com sonda de 2 mm (diâmetro). Cada fruto foi penetrado em 25% de profundidade, com velocidade de 1 mm s⁻¹ e mensurada na região equatorial de cada fruto. Os resultados foram expressos em Newton (N).

2.4 Coloração

A coloração do exocarpo dos frutos foi medida com o emprego de colorímetro (Minolta Chromometer Modelo CR 300, D65, Osaka, Japan), com 8 mm de abertura no padrão CIE-L*a*b*. Para calcular o ângulo Hue (°Hue), que define a tonalidade de cor, usaram-se os valores de a* e b* (°Hue= $\tan^{-1}b^*/a^*$). As medições foram realizadas em faces opostas e na região equatorial de cada fruto.

2.5 Teores de clorofilas totais

A extração de clorofilas totais foi realizada a partir de 1 g de tomate, finamente triturado em nitrogênio líquido. O extrato foi preparado adicionando-se 5 ml de acetona, 80% (v/v), seguido de agitação e filtração. O filtrado foi centrifugado a 10.000 x g durante 10 min e o sobrenadante elevado a 25 ml com a solução de acetona. A absorvância foi obtida por espectrofotometria a 647 e 663 nm. Os teores de clorofilas totais foram calculados através de equação estabelecida por Lichtenthaler (1987). Os resultados foram expressos em mg/100g de matéria fresca.

2.6 Teores de carotenoides totais e individuais

O método de extração de carotenoides totais seguiu os procedimentos descritos por Rodriguez-Amaya (2001). A quantificação dos carotenoides totais foi

medida a 450 nm em espectrofotômetro e o teores de carotenoides totais expressos em mg de β -caroteno por 100 gramas de amostra fresca (mg/100g).

Os carotenoides individuais foram quantificados através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando o sistema HPLC-Shimadzu, equipado com um injetor automático, detector de UV-VIS a 450 nm, coluna de guarda CLC-ODS (5 mm, 2 x 4 mm, Supelco) e uma coluna de fase reversa RP-18 CLC-ODS (5 mm, 4,6 mm x 150 mm, Shimadzu). A separação foi realizada usando um sistema de eluição de gradiente com fases móveis de metanol (solvente A), acetonitrila (solvente B) e acetato de etila (solvente C), começando de 30:70 (A:B), atingindo 10:80:10 em 10 min, 5:80:15 em 35 min e voltando à condição inicial, após mais 10 minutos, a uma taxa de fluxo de 1 mL min⁻¹. Os picos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões e quantificados por comparação com curvas de calibração externa para os padrões de licopeno, fitoeno, β -caroteno, luteína, zeaxantina (Sigma-Aldrich®). Os resultados foram expressos em mg/100g de matéria fresca.

2.7 Teores de compostos fenólicos totais e individuais

Os compostos fenólicos totais foram quantificados utilizando o reagente Folin-Ciocalteu, segundo metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965). A absorbância foi medida a 765 nm e os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico por 100 gramas em relação à massa fresca (mg/100g).

Os compostos fenólicos individuais foram quantificados usando um HPLC Shimadzu, equipado com um injetor automático, detector de UV-VIS a 450 nm, coluna de guarda CLC-ODS (5 mm, 2 x 4 mm, Supelco) e uma coluna de fase reversa RP-18 CLC-ODS (5 mm, 4,6 mm x 150 mm, Shimadzu). O gradiente de eluição foi: solvente A (água:ácido acético, 99:1) e solvente B (metanol), começando com 100% de A, indo para 60% de A em 25 min, mantendo-se esta proporção por mais dois minutos, depois até 95% de A em 37 min e mantendo esta proporção por 5 min e um tempo de reequilíbrio de 3 min, com fluxo de 0,9 mL min⁻¹. A identificação dos compostos fenólicos foi realizada por comparação do seu tempo de retenção e com os padrões do ácido p-cumárico, ácido caféico, ácido clorogênico, quercetina, Kampferol e naringerina (Sigma-Aldrich®). Os resultados foram expressos em mg/100g de matéria fresca.

2.8 Teores de poliaminas

A extração de poliaminas e sua quantificação foi realizada segundo Vieira et al. (2007) com pequenas modificações. As poliaminas foram extraídas com ácido tricloroacético (5% em água) e identificadas por HPLC através de uma coluna C18 (30 cm x 3,9 mm i.d x 10 µm, Waters), utilizado um gradiente de eluição na qual a fase móvel A era tampão acetato (0,1 M), contendo sal de sódio 1-octanossulfônico (10 mM), ajustado para pH 4,9 com ácido acético e o eluente B era acetonitrila, a um fluxo de 0,7 mL min⁻¹. Após a separação, as aminas foram derivatizadas com o-ftalaldeído (OPA) e fluorometricamente detectadas utilizando os seguintes comprimentos de onda: 340 nm de excitação e emissão de 445 nm. Os resultados foram expressa em mg/100g de matéria fresca.

2.9 Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR quantitativa (qPCR)

A extração do RNA total foi realizada usando PureLink™ Plant Reagent (Invitrogen), seguido de digestão com DNase I™ (Invitrogen). O cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA usando SuperScript III RT™ (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. As reações de qPCR foram conduzidas em equipamento 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems), a partir de 1 µL do cDNA (diluído 5 vezes) e 2 mM de *primers forward* e *reverse*, usando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) em um volume total de 20 µL. As amostras foram depositadas em placas de 96 poços, cobertas com adesivo ótico. Os parâmetros de temperatura para a reação de qPCR foram: 50°C, por dois minutos; 95°C, por dez minutos, 40 ciclos de três etapas: 95°C, por 30 segundos; 57°C, durante um minuto e; 72°C, por um minuto, com extensão final de 72°C, por cinco minutos, a qual foi seguida pela curva padrão de dissociação, para verificar a especificidade dos *primers* utilizados. As sequências de nucleotídeos para tomate foram obtidas no Sol Genomics Network (<http://solgenomics.net>) e National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), usando *Vector*™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, E.U.A.) para desenhar os *primers* gene-específicos (Tab. 1). Para contribuir com o teste de hipótese, relacionaram-se genes envolvidos com as vias metabólicas relacionadas com as variáveis químicas e fisiológicas deste trabalho: produção de etileno, parede celular, síntese de carotenoides, síntese de compostos fenólicos e enzimas do sistema antioxidante. Os critérios de seleção foram os seguintes: tamanho 18 e 20 pb; temperatura de anelamento entre 60-65°C; percentual de

bases CG entre 40 e 60%; tamanho médio dos fragmentos amplificados entre 50 e 150 pb e não mais de duas bases C ou G entre os cinco últimos nucleotídeos da extremidade 3'. A eficiência de amplificação de cada par de *primers* foi calculada a partir da seguinte equação: $E = 10^{(-1/slope)} - 1$. Para cada amostra, o valor de Ct (threshold cycle) foi obtido e a expressão relativa foi calculada usando a expressão $ER = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak; Schmittgen, 2001). A expressão foi analisada usando *Multi Experimental Viewer* (MeV), *EASE Expression Analysis Systematic Explorer* Ver. 4.6 e apresentando o diagrama de cor usando os tomates do tratamento controle, na colheita, como calibrador.

2.10 Desenho experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido segundo um esquema inteiramente casualizado (4x4), constituído de quatro tratamentos com avaliações realizadas na colheita, um dia, sete dias e quando os frutos apresentavam-se completamente maduros (FR). A unidade experimental foi constituída de 480 frutos, realizando-se 3 repetições biológicas e três repetições técnicas. Os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilks e à homocedasticidade pelo teste de Hartley. Posteriormente, foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Os efeitos dos tratamentos foram avaliados pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (SAS Institute, 2002).

Tabela 1. *Primers* usados para qPCR.

Gene	Access #	Sequência dos <i>primers</i>	
		Forward	Reverse
Biossíntese de etileno			
Ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico sintase (ACCS)	SGN-U567978	GAGCCAGGGTGGTTCCGAGT	GAATCCTCGCGAGCGCAATA
Ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico oxidase (ACCO)	SGN-U579104	CGACACCGAGTGATGGCTGAA	GAAATGATGGCCTCACCAGCAG
Biossíntese de ácidos graxos			
Acetil-CoA carboxilase A (<i>accA</i>)	GI 225315532	GTGGTGACATGCTGATCCGTA	GGAAGCCACCAAGTTTTTCGGAA
Acetil-CoA carboxilase D (<i>accD</i>)	ID 9284	TGCCGAACCCAATGCCTACAT	TCAGCTGCTTGTGAACCTTCGG
Biossíntese de carotenoides			
Fitoeno sintase (<i>PSY</i>)	GI 120969569	GCAGGCAGCCTTGGTGAAGA	CAAGCCCAAATTCCTCCGGA
ζ-caroteno desaturase (<i>ZDS</i>)	SGN-U568537	TCGGGGGCCAAAGCTGAAA	TCGACATGCCTGCAAGCCC
Licopeno β-ciclase (<i>LCY-B</i>)	GI 150014714	TGGTTCATCCATCCACCGGT	TGGCATTGGCAACAACAGGA
β-caroteno hidroxilase (<i>CRTRB</i>)	SGN-U568606	TTGGGCGAGATGGGCACAC	TGGCGAAAACGTCGTTCCAGC
Biossíntese de compostos fenólicos			
Fenilalanine amônia liase (<i>PAL</i>)	GI 30687012	CCGGTCGTCCCAATTCCAAA	ATCCAACCGCCGTGCCATT
Chalcone sintase (<i>CHS</i>)	SGN-U579222	TGGATTTGGGCCTGGGCTT	AGCCCAGCCCCTAAGCAGC
Flavonol sintase (<i>FLS</i>)	GI 225321931	ATGGAGGCAGCTGGTGGTGAA	CAGGCCTTGGACATGGTGGATA
Enzimas antioxidantes			
Ascorbato peroxidase (<i>APX</i>)	SGN-U578449	TGGACCGCCAATCCCCTTA	GGCATCTTCATCCGCAGCAT
Catalase (<i>CAT</i>)	SGN-U578839	GCCACGCGACCAAGGATCTT	CCTCGGGGTCCATTGTTTGG
Superoxido dismutase (<i>SOD</i>)	SGN-U581590	AGGCCGTCGCCGTCCTTA	CCAAGGGCATGGACATGGAA
Metabolismo da parte celular			
Poligalacturonase (<i>PG</i>)	SGN-U577266	TGGGCCAGGCCATGGTATAA	ACCCAGAACCACCCTGCCA
Controle endógeno			
Actina (<i>ACT</i>)	GI 47105122	GTCGGAATGGGACAGAAGGAT	ACAGGGTGTTCCCTCAGGAGCAA

3 Resultados

3.1 Etileno

A radiação UV-C proporcionou aumento na produção de etileno, em média duas vezes superior àquela observada nos frutos não tratados (Fig. 1A). Além disso, aos sete dias de avaliação, os frutos tratados com UV-C ainda apresentavam elevada produção de etileno (~20 nL/g/h), indicando que ainda não estavam completamente amadurecidos. Já, os frutos do tratamento controle concluíram o ciclo climatérico aos sete dias. O uso do 1-MCP apenas confirmou o já conhecido, ou seja, ao inibir-se parcialmente a ação desse hormônio, também se inibiu parcialmente a sua produção, retardando a maturação. O tratamento com UV-C, após aplicação de 1-MCP (MCP-1+UV-C), foi incapaz de induzir a produção de etileno observada no tratamento UV-C sem 1-MCP.

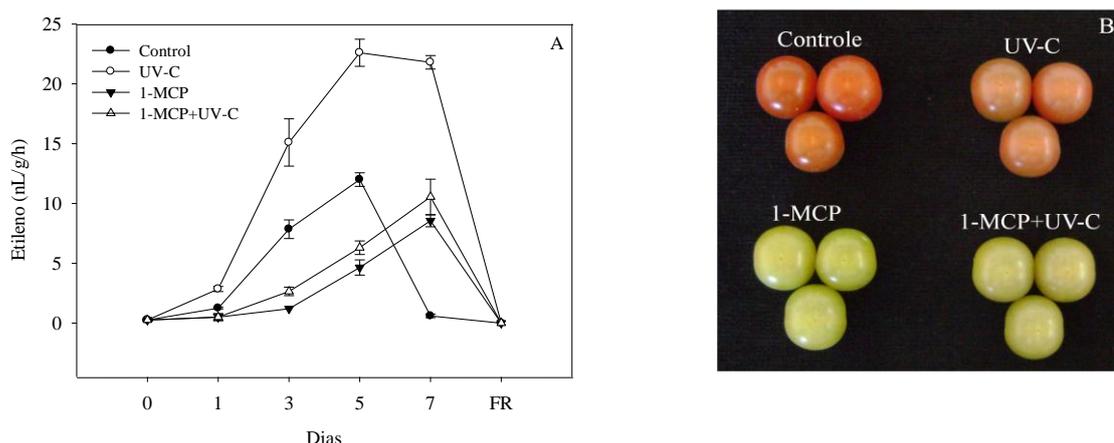


Figura 1. Produção de etileno (A) e aparência geral (B) de tomates cv. Flavortop armazenados em temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ após os tratamentos. Barras verticais indicam o desvio padrão. FR - completamente vermelhos.

3.2 Firmeza de polpa e coloração dos frutos

A firmeza de polpa diminuiu em todos os frutos, mas em menor intensidade nos tomates tratados com 1-MCP e 1-MCP+UV-C (Fig. 2A). Mais especificamente, a maior firmeza foi observada nos frutos tratados com 1-MCP, seguido por 1-MCP+UV-C, UV-C e frutos controle. O desverdeamento e avermelhamento dos frutos aumentou ao longo do tempo e, conseqüentemente, os valores do ângulo Hue foram reduzidos. Os frutos tratados com UV-C apresentaram valores mais elevados de Hue° sete dias após o tratamento quando comparados com os frutos controle.

Essas mudanças demonstram que frutos tratados com UV-C estavam mais verdes e menos vermelhos do que os frutos controle. Frutos tratados com 1-MCP e 1-MCP+UV-C ficaram verdes por mais tempo. Frutos avaliados quando totalmente maduros (FR) (7 dias para frutos controle, 10 dias para os tratados com UV-C e 14 dias para 1-MCP e 1-MCP+UV-C) apresentaram comportamento semelhante em relação a cor e firmeza (Fig. 2A e B).

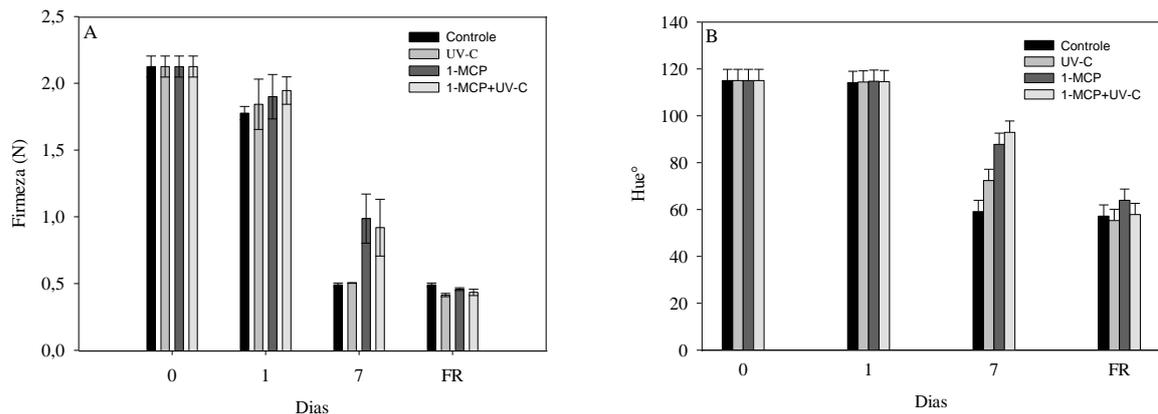


Figura 2. Firmeza de polpa (A) e valores de Hue° (B) em tomates cv. Flavortop armazenados em temperatura de 23±2°C após os tratamentos. Barras verticais indicam o desvio padrão. FR - completamente vermelhos.

3.3 Teores de clorofilas totais

O teor de clorofilas do exocarpo e do mesocarpo dos tomates diminuiu durante o amadurecimento após os tratamentos (Tab. 2). As reduções mais intensas ocorreram no exocarpo dos frutos controle, passando de aproximadamente 5,07 mg/100g para 0,40 mg/100g após sete dias. A mesma mudança ocorreu em frutos tratados com UV-C após 10 dias, indicando que esse tratamento colaborou para reduzir a velocidade de degradação de clorofilas. O uso de 1-MCP retardou ainda mais essa alteração, mas a aplicação de UV-C após o 1-MCP estimulou novamente a degradação de clorofilas. Aos sete dias frutos tratados com 1-MCP+UV-C apresentaram menos clorofilas do que frutos tratados com 1-MCP. No mesocarpo, as variações nos teores de clorofilas seguiram comportamento similar ao observado no exocarpo. Porém, em média, os teores de clorofilas no mesocarpo foram menores do que os do exocarpo.

Tabela 2. Teor de clorofilas totais, carotenoides totais e compostos fenólicos totais (mg 100g⁻¹) no exocarpo e mesocarpo de tomates Flavortop armazenados a 23±2°C após os tratamentos.

		Dias							
Tratamentos		0	1	7	FR ^{2/}				
		Clorofilas totais							
Exocarpo	Controle	5.07	aA ^{1/}	4.80	aA	0.40	cB	0.40	aB
	UV-C	5.07	aA	4.77	aA	0.90	cB	0.33	aC
	1-MCP	5.07	aA	4.73	aA	2.77	aB	0.26	aC
	1-MCP+UV-C	5.07	aA	4.60	aA	1.57	bB	0.37	aC
Mesocarpo	Controle	2.93	aA	2.63	aA	0.15	bB	0.15	aB
	UVC	2.93	aA	2.60	aA	0.60	bB	0.16	aB
	1-MCP	2.93	aA	2.77	aA	1.93	aB	0.20	aC
	1-MCP+UV-C	2.93	aA	2.83	aA	1.80	aB	0.20	aC
		Carotenoides totais							
Exocarpo	Controle	1.49	aB	1.59	aB	18.16	aA	18.16	aA
	UV-C	1.49	aB	1.50	aB	13.08	aA	17.05	aA
	1-MCP	1.49	aAB	0.89	aB	6.21	bA	6.22	bA
	1-MCP+UV-C	1.49	aB	2.00	aB	5.55	bA	12.54	aA
Mesocarpo	Controle	1.80	aB	1.06	aB	6.65	aA	6.65	bA
	UV-C	1.80	aC	1.28	aC	4.60	aA	7.26	abA
	1-MCP	1.80	aAB	0.44	aB	1.48	bAB	3.29	cA
	1-MCP+UV-C	1.80	aB	0.30	aB	1.76	bA	9.33	aA
		Compostos fenólicos totais							
Exocarpo	Controle	81.49	aB	98.51	aB	170.54	aA	170.54	aA
	UV-C	81.49	aB	101.51	aB	120.78	bB	195.30	aA
	1-MCP	81.49	aB	78.24	aB	182.45	aA	167.43	aA
	1-MCP+UV-C	81.49	aB	70.77	aB	151.55	abA	152.17	aA
Mesocarpo	Controle	66.98	aA	66.90	aA	65.52	aA	65.70	aA
	UV-C	66.98	aA	73.82	aA	71.92	aA	72.02	aA
	1-MCP	66.98	aA	71.92	aA	70.06	aA	72.11	aA
	1-MCP+UV-C	66.98	aA	73.41	aA	75.45	aA	73.57	aA

^{1/} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna ou maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05).

^{2/} FR: completamente vermelhos

3.4 Carotenoides

Os teores de carotenoides totais aumentaram em todos os frutos durante o armazenamento, tanto no exocarpo como no mesocarpo (Tab. 2). Aos sete dias após o tratamento, frutos controle e tratados com UV-C apresentaram maiores teores de carotenoides totais do que os frutos tratados com 1-MCP e 1-MCP+UV-C, tanto no exocarpo como no mesocarpo. Na fase completamente maduro (FR), frutos tratados com 1-MCP+UV-C apresentaram maior acúmulo de carotenoides totais do que o tratamento com 1-MCP no exocarpo e mesocarpo. Juntos, os teores de clorofilas e carotenoides totais (Tab. 2) podem explicar as alterações de coloração observadas (Fig. 2B).

Os carotenoides individuais (licopeno, β -caroteno e fitoeno) aumentaram ao longo do tempo em todos os frutos durante o armazenamento (Fig. 3), com exceção de luteína + zeaxantina, que diminuiu em todos os tratamentos. Os tratamentos com UV-C, 1-MCP e 1-MCP+UV-C retardaram o acúmulo de carotenoides individuais quando comparados com os frutos controle. Este efeito foi claramente observado sete dias após os tratamentos, tanto no exocarpo como no mesocarpo. Quando os frutos atingiram a fase completamente maduro, apesar de ter levado mais tempo para os frutos tratados com 1-MCP, todos eles tinham o mesmo teor de licopeno, β -caroteno e fitoeno no exocarpo. No entanto, no mesocarpo, frutos tratados com 1-MCP nunca atingiram os teores de licopeno, β -aroteno e fitoeno quando comparado aos outros tratamentos. O teor de luteína + zeaxantina nos frutos submetidos ao tratamento com 1-MCP não variou dos frutos controle, enquanto que os frutos tratados com UV-C isoladamente ou em combinação com 1-MCP tiveram menor teor de luteína + zeaxantina.

3.5 Compostos fenólicos

O teor de compostos fenólicos totais aumentou ao longo do tempo, em todos os tratamentos no exocarpo (Tab. 2). No entanto, os tratamentos apresentaram um efeito limitado sobre o teor de compostos fenólicos totais. Os frutos tratados com UV-C apresentaram os menores teores de compostos fenólicos totais depois de sete dias armazenados. Ao comparar os frutos no estágio completamente maduro, não houve diferença entre os tratamentos. No mesocarpo, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, entre os tempos de amostragem, ou para a interação tempo de amostragem *versus* tratamento.

Os principais compostos fenólicos encontrados nos frutos de tomate incluem o ácido clorogênico, ácido p -cumárico, ácido cafeico, quercetina e naringerina (Fig. 4). O ácido clorogênico foi o ácido fenólico predominante no exocarpo e mesocarpo dos tomates. Os frutos tratados 1-MCP tiveram o maior teor de ácido clorogênico, quando totalmente maduro e aos sete dias após os tratamentos. De maneira geral, os teores de ácido caféico e ácido p -cumárico diminuíram durante o armazenamento. A quercetina foi o flavonóide mais abundante encontrados nos frutos de tomate e apresentou maiores teores nos frutos completamente maduros, particularmente nos frutos tratados com UV-C. Resultados similares foram observados para a naringerina.

3.6 Poliaminas

O teor de putrescina e espermidina foi predominante nos frutos imaturos, verificando-se a sua diminuição com o avanço da maturação. O tratamento com UV-C apresentou o maior acúmulo de poliaminas. Frutos tratados com 1-MCP e 1-MCP+UV-C, mantiveram o teor de poliaminas superiores durante o amadurecimento, quando comparado com os frutos controle (não tratados) (Fig. 5). Além disso, o exocarpo e mesocarpo apresentaram respostas semelhantes aos tratamentos.

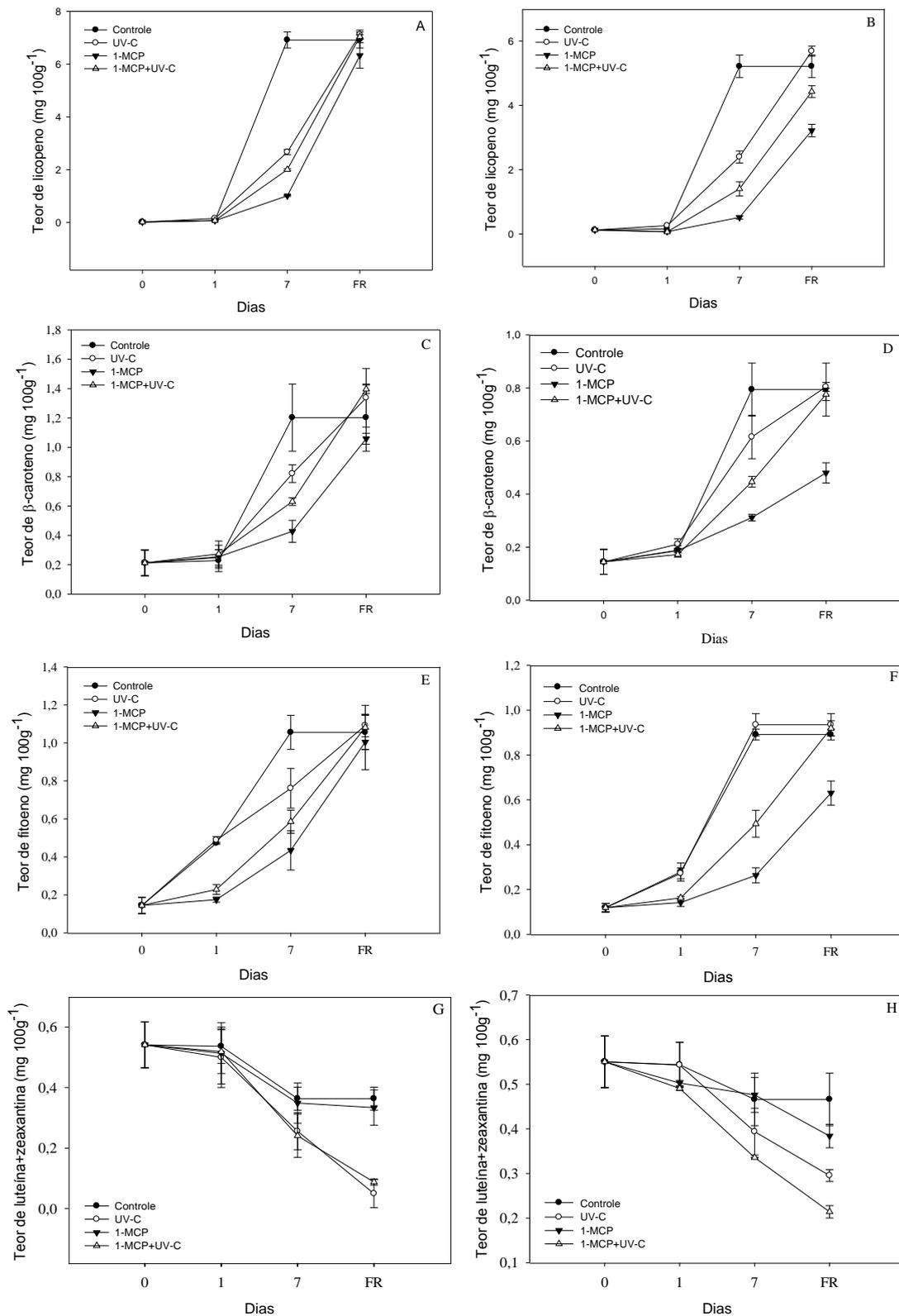


Figura 3. Teor de licopeno, β -caroteno, fitoeno e luteína+zeaxantina (mg 100g⁻¹) no exocarpo (A, C, E e G) e mesocarpo (B, D, F e H) de tomates Flavortop armazenados a 23±2°C depois dos tratamentos. Barras verticais indicam o desvio padrão. FR - completamente vermelhos.

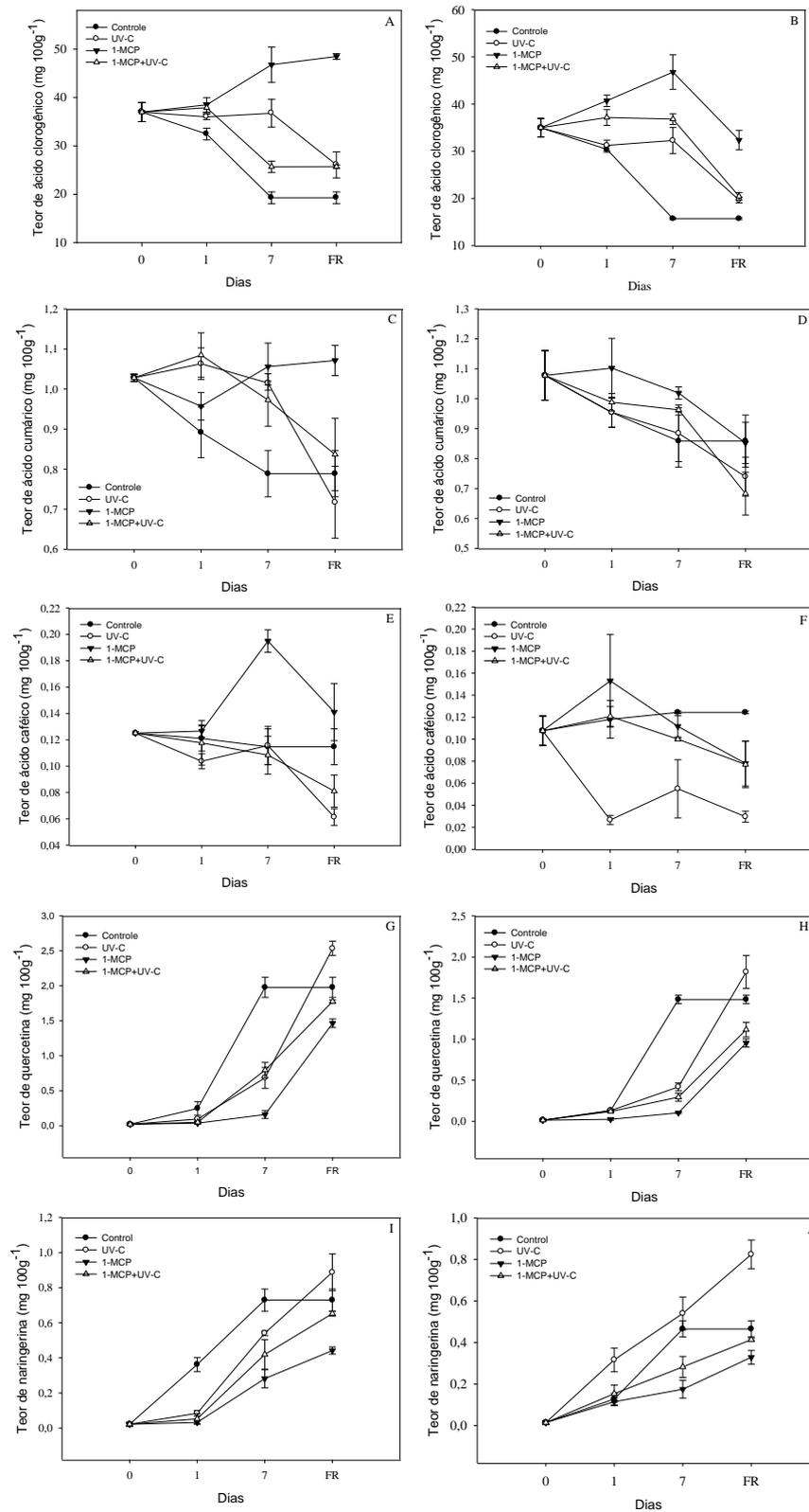


Figura 4. Teor de ácido clorogênico, ácido cumárico, ácido caféico, quercetina e naringerina (mg 100g⁻¹) no exocarpo (A, C, E, G e I) e mesocarpo (B, D, F, H e J) de tomates Flavortop armazenados a 23±2°C após os tratamentos. Barras verticais indicam o desvio padrão. FR - completamente vermelhos.

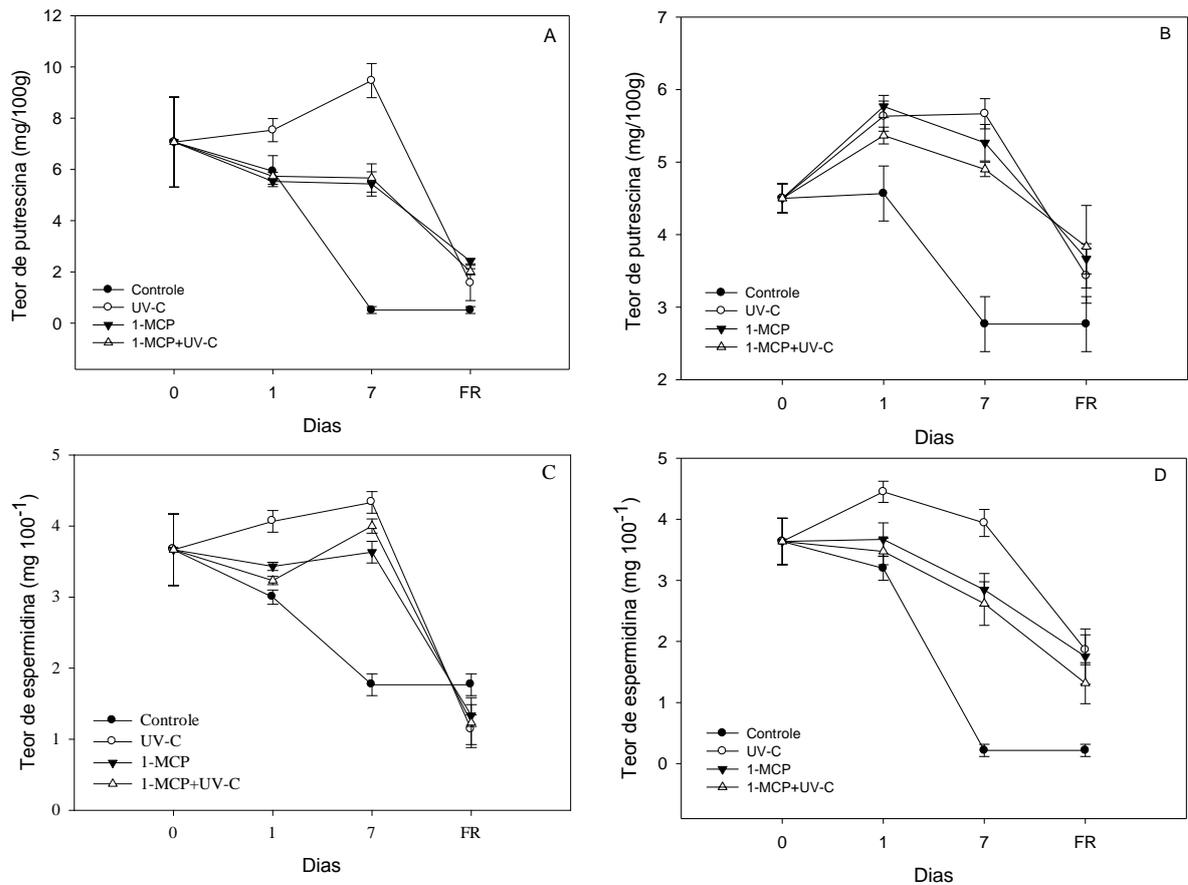


Figura 5. Teores de putrescina e espermidina (mg/100g) no exocarpo e mesocarpo de tomates cv. Flavortop armazenados em temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ após os tratamentos. Barras verticais indicam o desvio padrão. FR - completamente vermelhos.

3.7 Acúmulo de transcritos

Ao se analisar o perfil de acúmulo relativo de transcritos de genes das vias metabólicas selecionadas para este estudo, observa-se que há maior densidade de transcritos na fração do mesocarpo do que no exocarpo, tanto em frutos parcialmente maduros (um e sete dias) como em frutos maduros (sete, 10 e 14 dias). Observa-se que a radiação UV-C foi capaz de induzir rapidamente (um dia) a expressão da maioria dos genes de praticamente todas as vias metabólicas estudadas no exocarpo (9/15) e no mesocarpo (11/15), e que o 1-MCP inibe a expressão precoce da maioria dos genes do exocarpo (15/15) e do mesocarpo (11/15) (Fig. 6).

Os níveis de transcritos de *ACCS* foram elevados no exocarpo e mesocarpo dos frutos de todos os tratamentos, exceto para os frutos controle no momento da colheita, e nos frutos tratados com 1-MCP e 1-MCP+UV-C um dia após os tratamentos. A expressão de *ACCO*, de maneira geral, permaneceu inalterada no exocarpo independente dos tratamentos. No entanto, no mesocarpo, *ACCO* seguiu o mesmo padrão de expressão da *ACCS*, e teve um incremento no acúmulo de transcritos em todos os tratamentos, exceto para os frutos controle no momento da colheita, nos frutos tratados com 1-MCP e 1-MCP+UV-C, um dia após os tratamentos. Frutos tratados com UV-C foram os únicos onde a expressão de *ACCS* e *ACCO* foi incrementada um dia após o tratamento (Fig. 6).

Quanto à expressão transcricional dos genes envolvidos na biossíntese de ácidos graxos (*accA* e *accD*), observou-se que a radiação UV-C proporcionou maior acúmulo relativo de transcritos da *accA* (codificada pelo gene nuclear), tanto no exocarpo quanto no mesocarpo, um dia após os tratamentos. Por outro lado, os níveis de transcritos do gene da *accD* (codificada pelo gene plastidial) não apresentaram diferença significativa no exocarpo. No mesocarpo, as respostas foram mais tardias, elevando-se o acúmulo de transcritos somente no sétimo dia de armazenamento após a aplicação dos tratamentos (Fig. 6).

Dos genes relacionados à síntese de carotenoides, observou-se que, no exocarpo, os genes *ZDS*, *LCY-B* e *CRTRB*, não respondem aos tratamentos, enquanto que *PSY* mostrou regulação positiva em todos os tratamentos. No mesocarpo, todos os genes de síntese de carotenoides (*PSY*, *ZDS*, *LCY-B* e *CRTRB*) apresentaram incremento no acúmulo de transcritos em todos os tratamentos quando comparados com o controle. No entanto, o perfil de transcritos não seguiu uma tendência clara ao longo do tempo (Fig. 6).

Os níveis de transcritos de genes associados com a síntese de compostos fenólicos não foram afetados pelos tratamentos no exocarpo dos frutos. No entanto, no mesocarpo, foi observado aumento do acúmulo de transcritos. O nível de transcritos da *PAL* foi incrementado em todos os tratamentos ao longo do armazenamento. Os transcritos da *FLS* foram induzidos pela luz UV-C, 1-MCP e a sua combinação, apenas sete dias após os tratamentos. Houve incremento na síntese de transcritos que codificam para a *CHS* no tratamento com UV-C e especialmente no tratamento com 1-MCP+UV-C (Fig. 6).

Entre as enzimas que codificam enzimas antioxidantes, apenas *CAT* e *APX* apresentaram incremento na expressão transcricional após o tratamento com UV-C no exocarpo. No mesocarpo, a radiação UV-C induziu o acúmulo de transcritos de *SOD* um e sete dias após os tratamentos e quando os frutos estavam completamente maduros. Nos demais tratamentos, o incremento nos níveis de transcritos das enzimas antioxidantes ocorreu somente no sétimo dia de armazenamento (Fig. 6).

No exocarpo dos frutos controle totalmente maduros e dos frutos tratados com 1-MCP, houve incremento no acúmulo de transcritos de *PG* (cerca de cinco vezes maior do que a expressão da linha de base representada pela expressão dos frutos controle no momento da colheita). No mesocarpo, os níveis de transcritos de *PG* aumentaram em todos os tratamentos, sete dias após os tratamentos (Fig. 6).

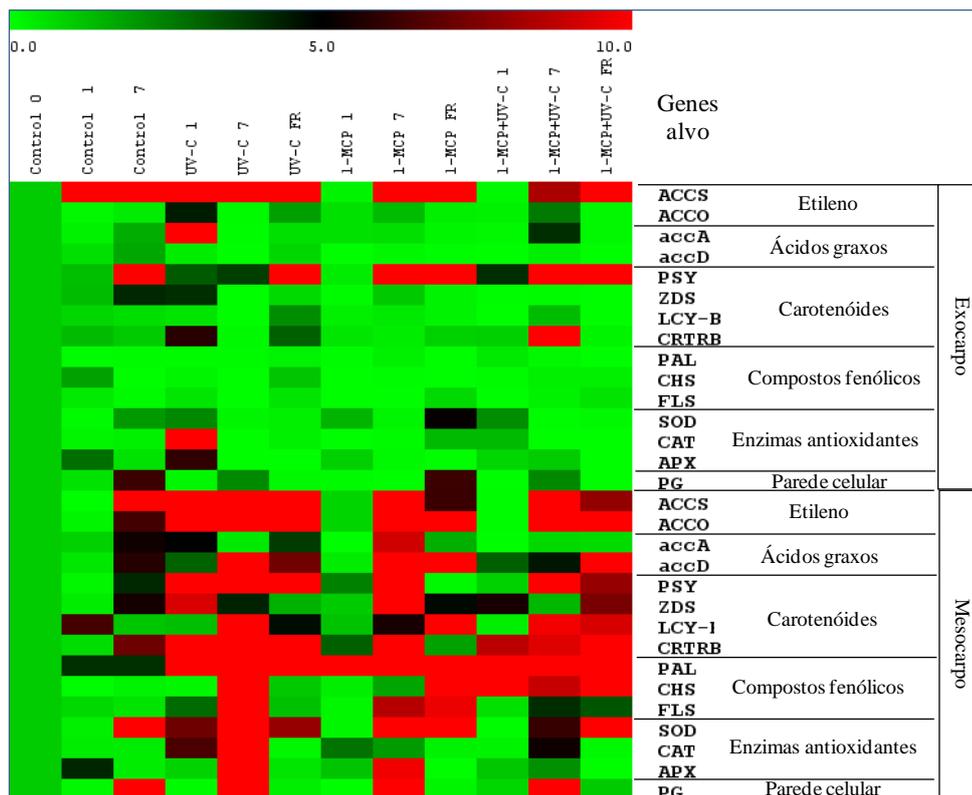


Figura 6. Acúmulo relativo de transcritos de genes que codificam para enzimas relacionadas com a síntese de etileno, modificação da parede celular, carotenoides, compostos fenólicos e enzimas antioxidantes no exocarpo e mesocarpo de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de um (1), sete (7) dias e quando apresentavam-se completamente vermelhos (FR) em temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ após os tratamentos. O nível de transcritos é apresentado numa escala de 0 a 10. A cor

verde à esquerda da escala indica o nível de expressão mínimo (0), a cor preta no centro representa 5 vezes o nível de expressão mínima e a cor vermelha representa 10 vezes mais do que o mínimo, usando o software Multi Experiment Viewer (TIGR MeV).

4 Discussão

A correlação positiva entre o aumento da produção de etileno e a evolução do amadurecimento em tomate é amplamente conhecida (CARA; GIOVANNONI, 2008). Como fatores indutores da produção desse hormônio, além da maturação, destacam-se os estresses bióticos e abióticos (WANG et al., 2002). A radiação UV-C, conhecida por ser um agente estressor (CHARLES et al., 2008a), quando aplicada em tomates Flavortop, induziu o aumento na produção de etileno (Fig. 1A). González-Aguilar et al. (2004) também observaram um aumento na taxa de respiração e produção de etileno em pêssegos tratados com diferentes doses de radiação UV-C. No entanto, esta não é uma regra geral. Por exemplo, Stevens et al. (1998) e Maharaj et al. (1999) observaram redução da produção de etileno em tomates tratados com radiação UV-C. Em tomates Flavortop a produção de etileno aumentou após o tratamento com UV-C e esta resposta fisiológica foi precedida por um aumento na expressão dos genes *ACCS* e *ACCO*, os quais estão envolvidos na biossíntese de etileno (Fig. 6), um dia após o tratamento. No entanto, contraditoriamente, este tratamento contribuiu para o retardo da mudança de coloração (Fig. 1B).

Butelli et al. (2008) estudando fatores MYB (do inglês, *metabolites family of transcription factors*) em tomates, verificou-se que ao se alterar o perfil de expressão desses fatores de transcrição, há estímulo à síntese de etileno e, mesmo assim, os frutos apresentam melhor conservabilidade, atribuída ao acúmulo de compostos antioxidantes, potencialmente atuantes como retardadores da maturação. Além disso, Shama e Anderson (2005) observaram que o estresse causado pela radiação UV ativa a biossíntese de poliaminas, que atuam no retardo do amadurecimento. De acordo com Mehta et al. (2002), a superexpressão de poliaminas em tomate, além de estimular a produção de etileno, resulta em frutos mais ricos em fitoquímicos e com maior vida de prateleira. Tomates Flavortop tratados com UV-C apresentaram um atraso na maturação e aumento no teor de putrescina e espermidina (Fig. 5), conforme já observado por Stevens et al. (1998), Maharaj et al. (1999) e Mehta et al.

(2002) em tomate, e González-Aguilar et al. (2001) em manga. O teor de espermina apresentou-se abaixo do limite de quantificação. Por outro lado, o teor de putrescina e espermidina foi elevado em todos os tratamentos (Fig. 5). Embora estes resultados não sejam suficientes para responder se o aumento de poliaminas é causa ou consequência, pode-se dizer que este aumento está envolvido no controle do amadurecimento. No entanto, Tassoni et al. (2006) afirma que o amadurecimento do tomate é estritamente associado ao etileno sem o envolvimento de poliaminas, que por sua vez só pode estender a vida de prateleira de frutos na fase madura antes da senescência. Assim, é possível que o aumento no acúmulo de poliaminas nos tomates tratados com UV-C possa atuar como um retardador da senescência (SAFTNER; BALDI, 1990).

O retardo na mudança de coloração foi o efeito mais marcante do tratamento com UV-C. Os frutos controle apresentaram-se totalmente maduros sete dias após a colheita, enquanto que os frutos tratados com UV-C tornaram-se plenamente maduros apenas dez dias após a colheita. O tratamento com 1-MCP, como esperado, retardou ainda mais o aparecimento da cor vermelha, tornando-se completamente maduros com 14 dias após a colheita. Os frutos do tratamento combinado (1-MCP+UV-C) levaram o mesmo tempo que os frutos tratados com 1-MCP para se tornarem completamente maduros. As mudanças de coloração, incluindo a degradação da clorofila e a síntese de carotenoides são eventos fortemente associados à transição de cloroplastos para cromoplastos, sendo eventos regulados pelo etileno (KAHLAU; BOCK, 2008; BARSAN et al., 2010).

Quando os genes da biossíntese de carotenoides são ativados, espera-se um consequente acúmulo de metabólitos e por sua vez a mudança de coloração. Neste estudo, embora os frutos tratados com UV-C apresentaram acúmulo de transcritos de genes envolvidos na biossíntese de etileno (*ACCO* e *ACCS*), e de genes envolvidos na biossíntese de carotenoides (*PSY*, *ZDS* e *LCY-B*) (Fig. 6), não se verificou o acúmulo de carotenoides em comparação aos tomates não tratados (Tab. 2). Desse modo, não foi observada uma relação direta entre os eventos de transcrição e as resposta fisiológicas, indicando que os eventos pós-transcripcionais ocorreram. Ao comparar os frutos sete dias após a colheita, observa-se que os frutos controle e os frutos tratados com UV-C, apresentaram maiores teores de carotenoides. O tratamento com 1-MCP inibiu o acúmulo de carotenoides totais (Tab. 2), incluindo o licopeno, o principal carotenóide presente nos frutos de tomate

(Fig. 5A e B). O teor de carotenoides totais também foi avaliado quando os frutos de cada tratamento atingiram o estágio completamente maduro (FR), uma vez que aos sete dias após os tratamentos os frutos estavam em diferentes estágios de maturação. Neste caso, quando os frutos estavam completamente vermelhos, com valores de Hue° similares, o teor de carotenoides totais foi maior no exocarpo de frutos controle e nos frutos tratados com UV-C e 1-MCP+UV-C, quando comparados com os frutos tratados com 1- MCP, sugerindo que o acúmulo de carotenoides é um evento parcialmente dependente de etileno, pois os frutos tratados com 1-MCP+UV-C apresentaram baixa produção de etileno, mas alto teor de carotenoides. A degradação da clorofila também é parcialmente dependente de etileno. O uso de 1-MCP impediu a sua degradação, mas os frutos controle e frutos tratados com UV-C tiveram uma elevada taxa de degradação da clorofila. Os frutos tratados com 1-MCP+UV-C apresentaram degradação da clorofila maior do que os frutos submetidos apenas ao tratamento com 1-MCP e degradação de clorofila inferior aos frutos tratados com UV-C.

Em geral, embora a expressão dos genes associados com a síntese de compostos fenólicos permaneceu inalterada após tratamentos, o teor de compostos fenólicos totais aumentou no exocarpo de todos os frutos, independentemente do tratamento. Por outro lado, a *PAL* apresentou incremento na expressão em todos os tratamentos no mesocarpo dos frutos (Fig. 6), o que explica os teores de compostos fenólicos totais serem elevados nos tomates Flavortop. Não foi observada nenhuma resposta diferencial ao uso da radiação UV-C ou do 1 -MCP. É possível que outros compostos fenólicos complexos não avaliados neste trabalho, tais como os taninos (BIALCZYK et al., 1999), lignina e suberina (CHARLES et al., 2008a) possam ter sido afetados.

O uso de radiação UV-C em tomates Flavortop não contribuiu para a preservação da perda de firmeza da polpa. O único tratamento que contribuiu positivamente para manter a firmeza de polpa foi a aplicação de 1-MCP, o que já é fato amplamente conhecido (JEONG et al., 2002). No entanto, a expressão da *PG*, um gene conhecido por estar envolvido no amolecimento de tomate (MAHARAJ et al., 1999), foi expresso em todos os tratamentos, incluindo o 1-MCP (Fig. 6). É importante considerar que as mudanças na firmeza da polpa em tomate são bastante complexas e, em alguns casos, não há relação direta entre a expressão da *PG* e as mudanças na firmeza. Por exemplo, em plantas transgênicas, nas quais se

silenciou um gene de *PG*, praticamente não se detectou a presença dos respectivos mRNAs, tampouco a atividade enzimática, mas houve redução da firmeza (SMITH et al., 1990).

Tendo em vista que após a percepção de um estresse biótico e/ou abiótico, como é o caso da radiação UV-C, a resposta fisiológica depende de diversas vias de sinalização, especialmente aquelas ligadas com as respostas ao estresse e vias de defesa, a fim de proteger as células e compartimentos sub-celulares dos efeitos tóxicos de espécies reativas de oxigênio (KNIGHT; KNIGHT, 2001), acredita-se que, essa sinalização pode estar relacionada com a indução de genes que atuam na eliminação de ROS (BARKA, 2001; ERKAN et al., 2008). Vinte e quatro horas após o tratamento com UV-C os frutos de tomate revelaram um ligeiro aumento no acúmulo de transcritos da *SOD*, *CAT* e *APX* no exocarpo, enquanto que no mesocarpo foi observado um maior acúmulo de RNAm da *SOD* e *CAT* (Fig. 6), indicando que a radiação UV-C atua como um agente estressor promovendo o incremento da expressão dos genes que codificam enzimas antioxidantes. Recentemente, Jiang et al. (2010) também observaram um aumento da atividade de enzimas antioxidantes *CAT*, *SOD*, *APX* e *GR* em cogumelos tratados com UV- C após a colheita.

Em conclusão, embora o tratamento com UV- C não represente uma alternativa favorável para evitar a perda de firmeza, ela promove o retardo na mudança de coloração, apesar de estimular a produção de etileno. O perfil transcricional revelou uma indução da expressão da maioria dos genes estudados após um dia após a aplicação da radiação UV-C e apesar de ser um tratamento de ação superficial, o maior acúmulo de transcritos ocorreu no mesocarpo dos frutos. O tratamento com 1-MCP+UV-C induziu o acúmulo de carotenoides totais, sugerindo que a indução no acúmulo de carotenoides totais pela radiação UV-C é um evento parcialmente dependente de etileno, visto que a aplicação de 1-MCP isoladamente inibiu o acúmulo. A degradação de clorofila também é parcialmente dependente de etileno. O uso de 1-MCP impediu a degradação, enquanto que frutos tratados com 1-MCP+UV-C apresentaram uma taxa de degradação maior do que o 1-MCP sozinho e inferior ao tratamento somente com UV-C. Visto que o etileno é o principal agente promotor da maturação, esperava-se que um aumento na sua produção seria seguido por um aumento no teor de carotenoides, no entanto isso não foi observado. Em geral, houve aumento no teor de compostos fenólicos totais durante o armazenamento no exocarpo, os quais não foram afetados pelos tratamentos. No

entanto, uma diminuição foi observada nos principais ácidos fenólicos. Uma vez que existe uma aparente contradição no fato de que a luz UV-C estimula a produção de etileno, mas retarda a maturação, foi levantada a hipótese de que este efeito podia estar relacionado com a síntese de moléculas antioxidantes tais como carotenoides e compostos fenólicos. No entanto, os resultados encontrados não confirmaram esta hipótese. Deste modo, acredita-se que o aumento na biossíntese de poliaminas esteja envolvido com retardado do amadurecimento. De fato, um aumento nos teores de poliaminas foi verificado em tomates tratados UV-C, o que sugere uma possível relação entre essas moléculas e evolução da maturação. No entanto, novos estudos superexpressando ou suprimindo a síntese dessas moléculas são necessários para provar esta hipótese.

Agradecimentos

À CAPES, FAPERGS (11/0733-0) e CNPq (301206/2010-4; 4700204/2011-7; 470705/2012-4) pelo suporte financeiro e bolsa de estudos.

5 Referencias

BARKA, E. A. Protective enzymes against reactive oxygen species during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits in response to low amounts of UV-C. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 785-791, 2001.

BARSAN, C.; SANCHEZ-BEL, P.; ROMBALDI, C.; EGEA, I.; ROSSIGNOL, M.; KUNTZ, M.; ZOUINE, M.; LATCHÉ, A.; BOUZAYEN, M.; PECH, J. C. Characteristics of the tomato chromoplast revealed by proteomic analysis. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 2413-2431, 2010.

BIALCZYK, J.; LECHOWSKI, Z.; LIBIK, A. The protective action of tannins against glasshouse whitefly in tomato seedlings. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 133, p. 197–201, 1999.

BLANKENSHIP, S. M. Ethylene effects and the benefits of 1-MCP. **Perishables Handling Quartely**, n. 108, 4p, 2001.

BRAVO, S.; GARCÍA-ALONSO, J.; MARTÍN-POZUELO, G.; GÓMEZ, V.; SANTAELLA, M.; NAVARRO-GONZÁLEZ, I.; PERIAGO, M.J. The influence of post-harvest UV-C hormesis on lycopene, β -carotene, and phenolic content and antioxidant activity of breaker tomatoes. **Food Research International**, v. 49, p. 296–302, 2012.

BUTELLI, E.; TITTA, L.; GIORGIO, M.; MOCK, H.P.; MATROS, A.; PETEREK, S.; SCHIJLEN, E. G. W. M.; HALL, R.D.; BOVY, A. G.; LUO, J.; MARTIN, C. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. **Nature Biotechnology**, v. 26, p. 1301-1308, 2008.

CARA, B.; GIOVANNONI, J. J. Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. **Plant Science**, v. 175, p. 106-113, 2008.

CHARLES, M. T.; MERCIER, J.; MAKHLOUF, J.; ARUL, J. Physiological basis of UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit I. Role of pre- and- post-challenge accumulation of the phytoalexin-rishitin. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47 p. 10-20, 2008a.

CHARLES, M. T.; BENHAMOU, N.; ARUL, J. Physiological basis of UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit IV. Biochemical modification of structural barriers. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47 p. 41-53, 2008b.

CLIFF, M.; LOK, S., LU, C., TOIVONEN, P. M. A. Effect of 1-methylcyclopropene on the sensory, visual, and analytical quality of greenhouse tomatoes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 53, p. 11–15, 2009.

COGO, S. L. P.; CHAVES, F. C.; SCHIRMER, M. A.; ZAMBAZI, R. C.; NORA, L.; SILVA, J. A.; ROMBALDI, C.V. Low soil water content during growth contributes to preservation of green colour and bioactive compounds of cold-stored broccoli (*Brassica oleraceae* L.) florets. **Postharvest Biology and Technology**, v. 60, p. 158–163, 2011.

ERKAN, M.; WANG, S. Y.; WANG, C. Y. Effect of UV treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme and decay in strawberries fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, p. 163-171, 2008.

GEORGE, B.; KAUR, C.; KHURDIYA, D.S.; KAPOOR, H.C. Antioxidants in tomato (*Lycopersium esculentum*) as a function of genotype. **Food Chemistry**, v. 84, p. 45–51, 2004.

GIRARDI, C. L.; CORRENT, A. R.; LUCCHETTA, L.; ZANUZO, M. R.; DA COSTA, T. S.; BRACKMANN, A., TWYMAN, R. M.; NORA, F. R.; NORA, L.; SILVA, J. A.; ROMBALDI, C. V. Effect of ethylene, intermittent warming and controlled atmosphere on postharvest quality and the occurrence of woolliness in peach (*Prunus persica* cv. Chiripa) during cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 38, p. 25-33, 2005.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A.; WANG, C.Y.; BUTA, J.G.; KRIZEK, D.T. Use of UV-C irradiation to prevent decay and maintain postharvest quality of ripe “Tommy Atkins” mangoes. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 36, p. 767-773, 2001.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A., WANG, C. Y., BUTA, G. J. UV-C irradiation reduces breakdown and chilling injury of peaches during cold storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 415–422, 2004.

GUILLÉN, F., CASTILLO, S., ZAPATA, P.J., MARTINEZ-ROMERO, D., VALERO, D., SERRANO, M. Efficacy of 1-MCP treatment in tomato fruit 2. Effect of cultivar and ripening stage at harvest. **Postharvest Biology and Technology**, v. 42, p. 235–242, 2006.

JAGADEESH, S.L; CHARLES, M.T.; GARIEPY, Y.; GOYETTE, B.; RAGHAVAN, G.S.V.; VIGNEAULT, C. Influence of postharvest UV-C hormesis on the bioactive components of tomato during post-treatment handling. **Food Bioprocess Technology**, 2009.

JEONG, J.; HUBER, D. J.; SARGENT, S. A. Influence of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on ripening and cell-wall matrix polysaccharides of avocado (*Persea americana*) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 25, p. 241-256, 2002.

JIANG T., JAHANGIR, M. M., JIANG, Z., LU, X., YING, T. Influence of UV-C treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activity and texture of postharvest shiitake (*Lentinus edodes*) mushrooms during storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 56, p. 209–215, 2010.

KAHLAU, S.; BOCK, R. Plastid transcriptomics and translomics of tomato fruit development and chloroplast to chromoplast differentiation: chromoplast gene expression largely serves the production of a single protein. **The Plant Cell**, v. 20, p. 856-874, 2008.

KNIGHT, H. AND KNIGHT, M.R. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 262–267, 2001.

KONDO, S.; FIEBIG, A.; OKAWA, K.; OHARA, H.; KOWITCHAROEN, L.; NIMITKEATKAI, H.; KITTIKORN, M.; KIM, M. Jasmonic acid, polyamine, and antioxidant levels in apple seedling as affected by Ultraviolet-C irradiation. **Plant Growth Regulation**, v. 64, p. 83–89, 2011.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids – pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods Enzymology**, v. 148, p. 350–382, 1987.

LIVAK, K. J. L.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LIU, L. H.; ZABARAS, D.; BENNETT, L. E.; AGUAS, P.; WOONTON, B. W. Effects of UV-C, red light and sun light on the carotenoid content and physical qualities of tomatoes during post-harvest storage. **Food Chemistry**, v. 115, p. 495-500, 2009.

LONG, M.; MILLAR, D. J.; KIMURA, Y.; DONOVAN, G.; REES, J.; FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. Metabolite profiling of carotenoid and phenolic pathways in mutant and transgenic lines of tomato: Identification of a high antioxidant fruit line. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1750–1757, 2006.

MAHARAJ, R.; ARUL, J.; NADEAU, P. Effect of photochemical treatment in the preservation of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Capello) by delaying senescence. **Postharvest Biology and Technology**, v. 15, p. 13-23, 1999.

MARQUENIE, D.; MICHAELS, C. W.; GEERAERD, A. H.; SCHENK, A.; SOONTJENS, C.; VAN IMPE, J. F.; NICOLAI, B. M. Using survival analysis to investigate the effect of UVC and heat treatment on storage rot of strawberry and sweet cherry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 187-196, 2002.

MEHTA, R.A.; CASSOL, T.; LI, N.; HANDA, A.K.; MATTOO, A.K. Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life. **Nature Biotechnology**, v. 20, p. 613-618, 2002.

POMBO, M.A; ROSLI, H.G; MARTÍNEZA, G. A.; CIVELLO P. M. UV-C treatment affects the expression and activity of defense genes in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*, Duch.). **Postharvest Biology and Technology**. v. 59, p. 94–102, 2011.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington: ILSI Press, 2001.

SAFTNER, R. A.; BALDI, B. G. Polyamine levels and tomato fruit development: possible interaction with ethylene. **Plant Physiology**, v. 92, p. 547–550, 1990.

SAS INSTITUTE, **Statistical Analysis System 9.1 for Windows**. SAS Institute Inc., Cary, NC, 2002.

SEVERO, J.; TIECHER, A.; CHAVES, F.C.; SILVA, J.A.; ROMBALDI, C.V. Gene transcript accumulation associated with physiological and chemical changes during

developmental stages of strawberry cv. Camarosa. **Food Chemistry**, v. 126, p. 995–1000, 2011.

STEVENS, C.; LIU, J.; KHAN, V. A.; LU, J. Y.; WILSON, C. L.; IGWEGBE, E. C. K.; KABWE, M. K.; CHALUTZ, E.; DROBY, S. Application of hormetic UV-C for delayed ripening and reduction of *Rhizopus* soft rot in tomatoes: the effect of tomatine on storage rot development. **Journal Phytopathology**, v. 146, p. 211-221, 1998.

SHAMA, G.; ALDERSON, P. UV hormesis in fruits: a concept ripe for commercialization. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 128–136, 2005.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with osphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SMITH, C. J. S.; 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, p. 369-379, 1990.

TASSONI, A.; WATKINS, C. B.; DAVIES, P. J. Inhibition of the ethylene response by 1-MCP in tomato suggests that polyamines are not involved in delaying ripening, but may moderate the rate of ripening or over-ripening. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 3313–3325, 2006.

VIEIRA, S. M.; THEODORO, K. H.; GLÓRIA, M. B. Profile and levels of bioactive amines in orange juice and orange soft drink. **Food Chemistry**, v. 100, p. 895–903, 2007.

WANG K. L.-C.; LI, H.; ECKER, J. R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **The Plant Cell**, S131–S151, 2002.

3 Cartografia das determinantes estruturais e genéticas associadas com a variabilidade fenotípica da textura da maçã: mapeamento de QTLs

3.1 Contexto da pesquisa do experimento de mapeamento de QTLs em maçã

Antes de começar o estudo genético das determinantes estruturais da textura da maçã, é preciso realizar o estudo fenotípico dos caracteres de interesse. Por isso, estudos preliminares foram conduzidos pelo grupo de pesquisa do *Institut de Recherche en Horticulture et Semences* – IRHS, a partir de 2007. Estes estudos, deram origem a publicação de uma tese e dois artigos (GALVEZ-LOPEZ, 2011; GALVEZ-LOPEZ et al., 2011; GALVEZ-LOPEZ et al., 2012). Partindo desses conhecimentos, o trabalho realizado durante o estágio doutoral sanduíche visou uma repetição da fenotipagem realizada em 2007 com os frutos colhidos em 2011, com o objetivo de mapear QTLs associados com a variabilidade da textura em maçã.

A população analisada denominada de HIVW, é oriunda de um cruzamento entre os genótipos X3259 e X3263 (Apêndice C). As descendências e os pais estão localizados na área experimental do IRHS-INRA, centro de Angers, França.

O princípio básico para o mapeamento de QTLs é que marcadores moleculares se encontram ligados aos locos que controlam as características de interesse. Assim o trabalho abrangeu as seguintes etapas:

- A construção do mapa genético integrado, foi realizada utilizando um total de 294 marcadores (88 SSRs e 206 SNPs), cobrindo uma região de aproximadamente 1233,4 cM (Apêndice D).

- As análises instrumentais foram realizadas em dois estágios de maturação: precoce e ótimo e em dois tempos de armazenamento: na colheita (data 1) e após dois meses de armazenamento a 1,5° C (data 2). A análise sensorial foi feita com os frutos colhidos no estágio de maturação ótimo e precoce e após dois meses de armazenamento e, a avaliação histológica somente no estágio de maturação ótimo com dois meses de armazenamento (Apêndice E).

Os relatos relacionados ao mapeamento de QTLs para o atributo de textura em maçã baseiam-se em frutos colhidos em estágio de maturação ótimo (KING et al., 2001; LIEBHARD et al., 2003; KENIS et al., 2008). No entanto, em nível comercial, os frutos são colhidos em estágios precoces, baseado na maturidade fisiológica (no estágio de desenvolvimento em que o fruto continuará seu

desenvolvimento normal e ordenado, mesmo se desligados da planta). Portanto, buscando correlacionar os resultados tanto com trabalhos anteriores, como com a situação de maturidade fisiológica, optou-se em realizar a detecção nos dois estágios de maturação.

- Os apêndices F e G descrevem os principais caracteres instrumentais e sensoriais avaliados.

- Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa R. Os resultados encontrados indicaram uma probabilidade muito baixa para o teste *F*, indicando uma heterogeneidade significativa dos genótipos, do tempo de armazenamento e da interação dos fatores. Como os efeitos individuais são mais importantes, a análise dos dados foi realizada separadamente.

- Em geral, as variáveis mostraram um padrão de distribuição normal em torno da média, o que permitiu a detecção e o mapeamento de QTLs pelo método de intervalo (IM - do inglês, *interval mapping*) em combinação com o de QTLs múltiplos (MQM - do inglês, *multiple QTL mapping*).

- A detecção de QTLs foi realizada nos diferentes parâmetros analisados nos anos de 2007 e 2011 utilizando o programa MapQTL[®] 5.0 (Van OOIJEN, 2004) e os resultados obtidos a partir da associação das características fenotípicas com as características genéticas por meio do mapa genético de ligação integrado, serão apresentados nesse capítulo. Uma representação gráfica desta análise, cujo resultado é em geral expresso na forma de um perfil de valor LOD (do inglês, *logarithm of odds*) para cada grupo de ligação do mapa genético, onde picos de LOD indicam a presença de um QTL no segmento é apresentado no Apêndice H. De maneira simplificada, o nível de significância para a declaração da existência de um QTL é expresso na forma de valor LOD, que indica, na escala logarítmica, a razão entre a probabilidade dos dados observados terem surgido assumindo a presença de um QTL sobre a probabilidade de sua ausência (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

3.2 Artigo II: “Mapeamento de QTLs para características de textura em maçã”

Aline Tiecher¹, Didiana Gálvez-Lopez^{2,3}, Pauline Lassere-Zuber³, Marc Lahaye⁴, Cesar Valmor Rombaldi¹, François Laurens²

¹UFPEL/FAEM, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, C. P. 354, CEP 90010-900, Pelotas, RS, Brasil

²INRA/UMR1345, Institut de Recherche en Horticulture et Semences, 49071 Beaucouzé, France

³INRA/UMR1095, Genetics, Diversity and Ecophysiology of Cereals, 63039 Clermont-Ferrand, France

⁴INRA/UMR1268, Biopolymères Interactions Assemblages, 44316 Nantes, France

Resumo

O objetivo deste trabalho foi detectar e mapear locos de características quantitativas (QTLs) associados com as características de textura em maçã. A análise fenotípica das variáveis de textura foi realizada em uma progênie F1 de maçã por três abordagens complementares: duas determinações instrumentais (penetrometria e compressão), análise sensorial e avaliação histológica. A progênie F1 é derivada do cruzamento entre X3259 e X3263. Os frutos foram colhidos nos anos de 2007 e 2011, em estágio de maturação ótimo e precoce e avaliados no momento da colheita e após 2 meses de armazenamento a 1,5 °C ± 80% UR. Foram detectados 19 QTLs associados as variáveis de penetrometria, compressão, análise sensorial e avaliação histológica nos grupos de ligação LG01, LG02, LG07, LG10, LG11 e LG16. QTLs relacionados com os atributos de textura já foram relatados nesses grupos de ligação, com exceção do loco que quantifica o tamanho celular, localizado no LG01. Em geral, no grupo de ligação LG01 houve co-localização das variáveis estudadas, enquanto nos grupos de ligação LG02, LG10, LG11 e LG16, os QTLs mapeados foram específicos. Além disso, algumas regiões estão co-localizadas com genes candidatos já mapeados na literatura. Estes resultados fornecem informações sobre a variabilidade genética dos caracteres de textura em maçã, confirmando a localização de QTLs em grupos de ligação específicos, bem como indicam novos QTLs.

Palavras-chave: *Malus x domestica*. Qualidade de frutos. Firmeza. Locos de características quantitativas.

1 Introdução

A maçã (*Malus x domestica* Borkh.) é uma das mais importantes culturas de frutas do mundo. Os atributos de textura são critérios fundamentais de qualidade que determinam a preferência do consumidor, sendo retratada por um grande número de caracteres descritores sensoriais (firmeza, crocância, suculência, granulidade, fibrosidade e farinosidade), como relatado por Harker et al. (2002) e Szczesniak (2002). A maçã é um fruto climatérico e entre todas as evoluções bioquímicas e fisiológicas que ocorrem durante o processo de maturação, a mudança na textura é a variação mais evidente (GOULAO; OLIVEIRA, 2008). O amolecimento do fruto, ressecamento e farinosidade, são os fatores que determinam a qualidade da fruta e a vida pós-colheita. Portanto, um objetivo importante para o setor produtivo de maçã é manter as características de textura ideais tanto tempo quanto possível ao longo de toda a vida de armazenamento das frutas.

Vários trabalhos relacionam a textura dos frutos com as propriedades mecânicas da parede celular, em conjunto com a pressão de turgescência interna e de adesão intercelular. As mudanças de textura são, em grande parte, resultantes da ação de enzimas da parede celular que atuam na lamela média e na parede celular primária que, em conjunto com a alteração da pressão de turgescência, provocam o enfraquecimento da estrutura da parede celular (ALLAN-WOJTAS et al., 2003; JARVIS et al., 2003; WALDRON et al., 2003; LONGHI et al., 2011). Programas de melhoramento da macieira visam obter variedades de maçãs competitivas. A identificação e utilização de marcadores moleculares e a seleção assistida por marcadores, têm sido usadas para caracteres como a resistência à sarna da macieira (*Venturia inaequalis*) e o teor de acidez, sob controle do gene *Ma* (DUREL et al., 2003; XU et al., 2012). Além disso, essas novas cultivares também precisam atender as qualidades sensoriais solicitadas pelos consumidores, principalmente para as variáveis de textura, a fim de entrar e permanecer no mercado. Para atingir este objetivo, é necessário um conhecimento prévio das bases genéticas da textura da maçã durante o desenvolvimento dos frutos e armazenamento. Por todas estas razões, experimentos de mapeamento de locos de características quantitativas (QTLs), co-segregando com importantes características de qualidade dos frutos, pode representar a principal estratégia de vincular a qualidade percebida com as regiões genômicas envolvidas no controle da textura dos frutos.

Até o momento, poucos dados estão disponíveis com base em avaliações sensoriais, sendo esses dados provenientes principalmente da penetrometria e das medidas de compressão de frutas inteiras, que não abrangem todos os fatores complexos que determinam a textura da maçã. Liebhard et al. (2003) e Kenis et al. (2008) relataram um número de QTLs envolvidos com a firmeza da maçã, em associação com a doçura e os níveis de acidez, enquanto King et al. (2000; 2001) identificaram vários QTLs de firmeza de polpa, associados com leituras de penetrometria, rigidez por ressonância acústica e uma série de descritores sensoriais. Estes estudos frequentemente associam QTLs nos grupos de ligação LG01, LG10, LG15 e LG16 e são essas regiões genômicas específicas que controlam a textura dos frutos de maçã, os quais já foram relatados com vários genes candidatos. Por exemplo, os genes *Md-ACS1* e *Md-ACO1*, envolvidos na biossíntese de etileno, foram respectivamente, mapeados no LG15 e LG10 (COSTA et al., 2005). Genes candidatos da expansina (*Md-Exp7*) e poligalacturonase (*Md-PG1*) (COSTA et al., 2008; COSTA et al., 2010), que são proteínas e enzimas-chave envolvidas com amolecimento do fruto, também foram identificadas respectivamente nos LG01 e LG10.

Este trabalho teve como objetivo identificar e mapear QTLs para os atributos de textura de maçã, com base na fenotipagem instrumental (penetrometria e compressão), sensorial e histológica numa descendência de maçãs em dois anos (2007 e 2011). Com base em duas publicações anteriores (i) Texture analysis in an apple progeny through instrumental, sensory and histological phenotyping (GÁLVEZ-LÓPEZ et al., 2012) e (ii) Variability of cell wall polysaccharides composition and hemicelluloses enzymatic profile in an apple progeny (GÁLVEZ-LÓPEZ et al., 2011), o mesmo local experimental e população foram utilizados para as diferentes avaliações em 2011.

2 Material e métodos

2.1 Material vegetal

O material vegetal é composto de 182 indivíduos F1 de uma progênie segregante (H1VW). Os pais nomeados X3259 e X3263 são dois genitores do programa de melhoramento do INRA (KOUASSI et al., 2009). Ambos carregam o gene de resistência à sarna - Vf. O pai X3259 tem uma boa textura, que é herdada

de um dos seus pais, a cultivar “Chantecler”. X3263 resultou do cruzamento entre a cultivar de coloração vermelha escura, “Red Winter” e o genitor INRA X3177 que apresenta uma produção boa e regular (uniforme). Os descendentes e os pais estão localizados na estação experimental do INRA de Angers (França).

2.2 Período de colheita e coleta de dados fenotípicos

Para a coleta dos dados fenotípicos, as frutas foram colhidas no ano de 2007 (07) no estágio de maturidade ótima (O), e no ano de 2011 (11) no estágio de maturidade precoce (P) e ótima (O), entre os meses de setembro e novembro, com base no sabor, cor de fundo e a avaliação do teor de amido (KOUASSI et al., 2009). Em geral, 10 a 20 frutos por genótipo foram selecionados aleatoriamente para as avaliações de qualidade relativas a textura. Os frutos foram avaliados no mesmo dia da colheita (data 1) e depois de dois meses (data 2) em armazenamento a 1,5 °C e 80% de umidade relativa. As avaliações fenotípicas foram registradas de acordo com ano, estágio de maturidade e período de armazenamento.

2.3 Avaliações fenotípicas

2.3.1 Análise instrumental, sensorial e histológica

As análises instrumentais, sensoriais e histológicas foram realizadas de acordo com Gálvez-López et al. (2012). Resumidamente, as medidas instrumentais para penetrometria e compressão foram realizados no fruto inteiro, com casca, usando o equipamento TA.XT.PLUS (Stable Micro System). Para as análises de penetrometria, as maçãs foram penetradas a partir da superfície do fruto, a uma profundidade de 10 mm, utilizando uma sonda convexa com um diâmetro de 4 mm. Seis parâmetros foram extraídos a partir da força ou curva de deformação: força máxima necessária para romper a casca do fruto e penetrar na polpa (Fp), deformação associada com Fp (Dp), área da curva - trabalho associado com Fp (Wp), inclinação da curva de deformação (Ep), força necessária para penetrar a polpa a 7 mm (Ff) e a 9 mm (Ff2) (Fig. 1A). Para a compressão, as maçãs foram comprimidas duas vezes com 5% de deformação a 50 mm s⁻¹, utilizando duas placas paralelas. Os parâmetros avaliados foram extraídos das curvas de força: força associada com a primeira compressão (H1), força associada com a segunda compressão (H2), inclinação da curva da primeira compressão (Grad1), inclinação

da curva da segunda compressão (Grad2), trabalho associado com H1 (WH1), trabalho associado com H2 (WH2) (Fig. 1B). O perfil sensorial consistiu na avaliação das variáveis de textura por um painel de especialistas, onde cada avaliador deu uma pontuação média para cada variável em cada genótipo de 1 (muito ruim ou baixo) a 5 (muito bom ou alto). As variáveis estudadas foram: firmeza (Firm), crocância (Croq), consistência (Cons), granulidade (Gran), fibrosidade (Fibr), suculência (Juic) e farinosidade (Farin). A distribuição do tamanho das células da polpa da maçã foi avaliada em seções do parênquima de todos os indivíduos. Duas seções radiais equatoriais opostas por fruto foram coletadas a partir do parênquima. A análise das imagens foi realizada através de procedimentos morfológicos matemáticos, de acordo com Devaux et al. (2008), onde curvas granulométricas foram obtidas indicando a distribuição do tamanho celular. A análise dos componentes principais foi aplicada sobre o conjunto de curvas granulométricas distinguindo as contribuições da variância total no primeiro (Cp1) e no segundo componente (Cp2) (Apêndice I).

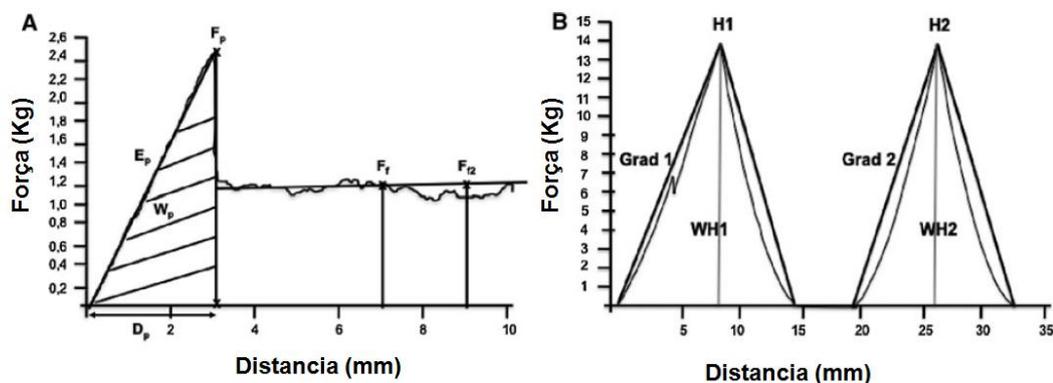


Figura 1. Curva de penetrometria (A) e curva do teste duplo de compressão (B) com os parâmetros estudados (MEHINAGIC et al., 2004; GALVEZ-LOPEZ, 2011).

2.3.2 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando R (R Development Core Team 2012) e MatLab[®] Softwares (The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, EUA). A variação fenotípica foi testada em todo o conjunto de dados. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para avaliar os efeitos genéticos, da colheita e do tempo de armazenamento para todas as variáveis. A herdabilidade individual ($h^2_{bs\ ind}$) foi calculada para todos os valores fenotípicos, utilizando a seguinte fórmula:

$$h^2_{bs\ ind} = \sigma^2_g / (\sigma^2_g + \sigma^2_e)$$

com σ^2_g e σ^2_e sendo a variância genética individual e as variâncias residuais, respectivamente. Os valores médios foram calculados para cada variável.

2.4 Extração de DNA e genotipagem com marcadores moleculares

O DNA genômico de cada um dos genótipos da população foi extraído a partir de folhas jovens (100 mg) usando DNeasy 96 Plant Kit (Qiagen) seguindo o protocolo do fabricante. Um total de 294 marcadores moleculares foram utilizados para construir o mapa genético: 88 SSR (sequência simples repetidas), anteriormente utilizados em maçã (SILFVERBERG-DILWORTH et al., 2006) e 206 SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único). Os marcadores SNPs foram desenvolvidos pela “tecnologia Illumina” e mapeados pelo instituto IASMA (San Michelle, Itália).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação dos SSR foi realizada sob as condições descritas em Silfverberg-Dilworth et al. (2006). O polimorfismo dos produtos de PCR foi detectado por eletroforese em gel ou com um sequenciador capilar de acordo com o protocolo descrito por Silfverberg-Dilworth et al. (2006). Um arranjo de esferas Illumina de 384 SNPs baseado no teste GoldenGate (Illumina Inc., San Diego, Califórnia) foi desenvolvido a partir de um conjunto de 1679 SNPs mapeados em um mapa genético integrado de maçã (<http://genomics.research.iasma.it/>). Marcadores baseados em SNP foram desenvolvidos a partir de SNPs detectados a partir de sequência genômica da maçã, originalmente desenvolvido pelo projeto IASMA no sequenciamento do genoma da maçã “Golden Delicious” (VELASCO et al. 2010). A genotipagem foi realizada utilizando um leitor Illumina BeadXpress® com tecnologia VeraCode® de acordo com o protocolo do fabricante (www.illumina.com). Os marcadores foram selecionados pela sua distribuição ao longo dos grupos de ligação da maçã. Dos 384 SNPs desenvolvidos, 206 foram escolhidos para a construção do mapa genético, pois estavam uniformemente distribuídos ao longo dos 17 grupos de ligação da maçã.

2.5 Construção do mapa genético

O mapa genético foi construído utilizando o software JoinMap® 4.0 (Van OOIJEN, 2006). A função Kosambi foi usada para calcular as distâncias genéticas, e a ordem dos marcadores foi fixada de acordo com Silfverberg-Dilworth (2006). Os

mapas dos pais também foram criados separadamente, utilizando marcadores bi-parentais e uni-parentais comuns. Os grupos de ligação homólogos dos pais com marcadores bi-parentais comuns foram então combinados e um mapa integrado foi construído com base nas frequências de recombinação médias, usando o comando “*combine groups for map integration function*” no JoinMap[®] 4.0. Para cada marcador, um traço separa a terminologia F, M ou FM, que indica a origem parental: F (feminino), M (masculino), e FM (feminino-masculino).

2.6 Análise de QTL

A análise de QTL foi realizada utilizando o software MapQTL[®] 5.0 (Van OOIJEN, 2004) sobre as médias das variáveis por genótipo para cada ano e período de armazenamento no mapa integrado. Inicialmente, o valor de LOD (do inglês, *logarithm of odds*) mínimo no qual um QTL foi declarado significativo, foi determinado usando como índice todo o genoma (GW - do inglês, *genome wide*), considerando um erro de 0,05 sobre 1000 permutações por dado. Em seguida, foi realizado o mapeamento por análise de intervalo (IM - do inglês, *interval mapping*), a cada 1cM, a fim de encontrar regiões com potenciais QTLs, ou seja, onde o valor de LOD foi maior do que o limite de permutação. Na região dos potenciais QTLs, os marcadores com os maiores valores de LOD foram tomados como cofatores. Subsequentemente, o mapeamento de QTL múltiplo (MQM - do inglês, *multiple QTL mapping*) foi realizado. Se os valores de LOD na região dos potenciais QTLs estavam abaixo do limite da significância, os seus locos de cofator foram removidos e o mapeamento MQM foi repetido. QTLs foram declarados significativos quando excederam o limite de LOD do GW calculado após o MQM. Os intervalos de confiança no mapa de ligação foram indicados em centiMorgans, correspondendo a um LOD-1 e um LOD-2 em torno da probabilidade máxima do QTL. Os QTLs foram graficamente representados usando o software MapChart versão 2.2 (VOORRIPS, 2002). A porcentagem de variância explicada por cada QTL (R^2) foi indicada a partir do mapeamento MQM. Efeitos alélicos foram estimados para cada QTL detectado na análise MQM de acordo com a: aditividade feminina: $A_f = [(\mu_{ac} + \mu_{ad}) - (\mu_{bc} + \mu_{bd})]/4$, aditividade masculina: $A_m = [(\mu_{ac} + \mu_{bc}) - (\mu_{ad} + \mu_{bd})]/4$ e dominância: $D = [(\mu_{ac} + \mu_{bd}) - (\mu_{ad} + \mu_{bc})]/4$, onde μ_{ac} , μ_{bc} , μ_{ad} e μ_{bd} são as médias fenotípicas estimadas associadas com cada uma das quatro possíveis classes genotípicas, ac, bc, ad e bd, decorrente do cruzamento ab (feminino) x cd (masculino).

3 Resultados e discussão

3.1 Construção do mapa genético

Um total de 182 indivíduos de uma progênie F1 foram utilizados para construir os mapas genéticos da população HIVW. O mapa feminino, X3259, é baseado em 201 marcadores (136 SNPs e 65 SSRs) e abrange 1.173,3 cM. O mapa masculino, X3263, é baseado em 199 marcadores (130 SNPs e SSR 69) e cobre 1059,4 cM. Grupos de ligação homólogos foram combinados para construir um mapa integrado, que é composto de 294 marcadores (206 SNP e 88 SSRs), os quais foram polimórficos para um ou ambos os pais da progênie estudada, e abrange 1.233,4 cM, em comparação com o mapa de referência (SILFVERBERG-DILWORTH et al., 2006). O número de grupos de ligação foi designado de acordo com Silfverberg-Dilworth (2006). A densidade média dos marcadores no mapa integrado é 4,19 cM/marcador. A maior diferença entre os dois indicadores foi de 23,4 cM no LG17.

As extremidades dos grupos de ligação LG03, LG07, LG08, LG09, LG13, LG14 foram estendidas neste estudo em comparação com o mapa de referência. O LG4 permaneceu curto devido à frequência de marcadores homozigotos desenvolvidos na parte inferior. O desenvolvimento de marcadores SNP permitiu a criação de um mapa mais denso.

3.2 Avaliações das características fenotípicas

Os resultados obtidos na mensuração de todas as variáveis estudadas no presente trabalho: penetrometria, compressão, análise sensorial e histológica estão apresentados na Tab. 1.

Dos 182 indivíduos F1 utilizados para a construção dos mapas genéticos, somente os indivíduos apresentados na Tab. 2 foram avaliados nas análises fenotípicas, com posterior utilização das médias para a detecção de QTLs. Cabe ressaltar que, embora tenha sido realizada a fenotipagem dos frutos provenientes do ano de 2011, colhidos em estágio de maturação ótimo com dois meses de armazenamento refrigerado (1,5 °C), os dados foram insuficientes para a investigação genética, e por isso, os dados referentes as avaliações instrumentais não estão incluídos nesse trabalho.

Tabela 1. Resultados médios obtidos da mensuração das variáveis de penetrometria, compressão, análise sensorial e histológica na população HIVW colhida no ano de 2007 e 2011, em estágio de maturação precoce e ótimo, avaliado na colheita e após dois meses de armazenamento refrigerado (1,5 °C±80% UR).

Variáveis	2007		2011			
	Ótimo		Precoce		Ótimo	
	Colheita	2 meses	Colheita	2 meses	Colheita	2 meses
Penetrometria						
Fp (Kg)	2,40 ± 0,65*	1,79 ± 0,34	2,40 ± 0,91	1,81 ± 0,62	2,13 ± 0,90	1,61 ± 0,49
Dp (mm)	2,04 ± 0,25	2,31 ± 0,44	2,81 ± 0,74	2,25 ± 0,56	2,24 ± 0,71	1,25 ± 0,12
Wp (Kg mm)	2,76 ± 0,89	2,24 ± 0,73	3,04 ± 1,28	2,36 ± 1,09	2,63 ± 1,23	2,09 ± 0,85
Ep (Kg mm ⁻¹)	0,95 ± 0,61	0,70 ± 0,26	1,08 ± 0,35	0,56 ± 0,25	1,04 ± 0,36	0,51 ± 0,23
Ff (Kg)	0,95 ± 0,62	0,75 ± 0,28	1,33 ± 0,37	1,36 ± 0,38	1,18 ± 0,40	0,50 ± 0,21
Ff2 (Kg)	1,04 ± 0,61	1,14 ± 0,35	1,41 ± 0,40	1,24 ± 0,34	1,21 ± 0,47	0,86 ± 0,32
Compressão						
H1 (Kg)	17,28 ± 3,26	12,75 ± 3,29	15,30 ± 1,36	10,34 ± 1,26	14,97 ± 1,46	9,04 ± 1,26
H2 (Kg)	16,33 ± 3,11	12,19 ± 3,19	16,42 ± 2,23	11,89 ± 2,01	19,52 ± 2,39	9,54 ± 1,20
WH1 (Kg mm)	51,55 ± 13,50	37,37 ± 12,53	34,83 ± 15,32	24,33 ± 9,61	34,51 ± 15,65	24,63 ± 9,62
WH2 (Kg mm)	34,88 ± 10,72	27,56 ± 9,78	26,28 ± 11,13	19,29 ± 12,71	25,70 ± 9,63	22,03 ± 2,04
Grad1 (Kg mm ⁻¹)	4,07 ± 1,36	3,07 ± 0,67	3,48 ± 1,28	2,51 ± 0,84	3,82 ± 0,87	2,39 ± 0,68
Grad2 (Kg mm ⁻¹)	5,74 ± 1,71	3,98 ± 0,89	3,56 ± 1,89	3,25 ± 1,12	4,94 ± 1,49	3,10 ± 1,14
Análise sensorial						
Firmeza	2,42 ± 0,81	2,12 ± 0,72		1,94 ± 0,53		1,90 ± 0,49
Crocância	2,46 ± 0,88	2,09 ± 0,82		2,12 ± 0,61		2,06 ± 0,59
Consistência	2,47 ± 0,67	2,96 ± 0,69		3,30 ± 0,89		3,48 ± 0,74
Granulosidade	2,7 ± 1,03	3,71 ± 1,22		3,67 ± 0,90		3,63 ± 0,99
Fibrosidade	2,61 ± 2,22	1,82 ± 0,98		1,77 ± 0,90		1,72 ± 0,72
Suculência	2,50 ± 0,63	2,11 ± 0,56		1,82 ± 0,77		1,74 ± 0,42
Farinosidade	1,24 ± 0,70	1,63 ± 0,87		2,89 ± 0,97		2,90 ± 1,02
Avaliação histológica						
Cp1		0,73 ± 1,40				0 ± 1,2
Cp2		-0,04 ± 0,45				0 ± 0,49

* Médias das repetições ± desvio padrão.

Tabela 2. Número de indivíduos fenotipados da população HIVW.

Ano	Estágio de maturação	Período de armazenamento	Avaliações		
			Instrumental	Sensorial	Histológica
2007	Ótimo	Data 1	104	104	
		Data 2	94	103	99
2011	Precoce	Data 1	120		
		Data 2	106	108	
	Ótimo	Data 1	74		
		Data 2	44	59	77

3.2.1 Herdabilidade

Para selecionar as variáveis mais relevantes para a identificação de QTLs, a herdabilidade genética para as variáveis instrumentais, sensoriais e histológicas foi determinada para os anos 2007 e 2011, considerando todos os estágios de maturação e condições de armazenamento (Tab. 3). A maioria das variáveis apresentou herdabilidade genética moderada ($> 0,4$) e alta ($> 0,6$). Para as variáveis instrumentais, os valores encontrados ficaram entre 0,4 e 0,79, para as variáveis sensoriais os valores ficaram entre 0,52 e 0,94, enquanto que para as variáveis histológicas entre 0,45 e 0,6. Esses resultados indicam que as variáveis avaliadas sofrem pouca influência não-controlável.

Tabela 3. Estimativa da herdabilidade (h^2) das variáveis fenotípicas para a população HIVW nos anos de 2007 e 2011.

Variáveis	2007		2011			
	Ótimo		Precoce		Ótimo	
	Colheita	2 meses	Colheita	2 meses	Colheita	2 meses
Compressão						
H1	0,63	0,72	0,68	0,72	0,75	0,76
H2	0,56	0,71	0,74	0,71	0,66	0,78
WH1	0,66	0,74	0,74	0,75	0,77	0,79
WH2	0,64	0,71	0,67	0,73	0,72	0,76
Grad1	0,57	0,67	0,59	0,67	0,67	0,70
Grad2	0,40	0,69	0,62	0,68	0,69	0,77
Penetrometria						
Fp	0,65	0,53	0,57	0,71	0,59	0,55
Dp	0,32	0,58	0,49	0,51	0,44	0,62
Wp	0,45	0,51	0,49	0,63	0,50	0,52
Ep	0,79	0,60	0,67	0,70	0,70	0,77
Ff	0,66	0,63	0,68	0,75	0,67	0,75
Ff ₂	0,69	0,61	0,72	0,78	0,69	0,76
Sensorial						
CRISP	0,85	0,89		0,72		0,66
FIRMN	0,86	0,87		0,67		0,52
JUIC	0,80	0,73		0,55		0,54
MELT	0,72	0,79		0,72		0,45
GRAIN	0,84	0,89		0,73		0,75
FIBER	0,81	0,94		0,86		0,57
MEALI	0,89	0,80		0,82		0,67
Histologia						
CP1		0,56				0,60
CP2		0,45				0,40

3.3. Análise de QTLs

Os resultados do mapeamento de QTLs estão apresentados na Fig.2 e na Tab. 4. Com base na análise de mapeamento de QTLs múltiplos, foi possível

detectar 19 QTLs, com valor de LOD superior ao do GW em seis grupos de ligação (LG01, LG02, LG07, LG10, LG11 e LG16), sendo 10 QTLs identificados para o ano de 2007 e nove QTLs para o ano 2011. A percentagem da variação fenotípica (R^2), explicada pelas associações loco marcador e QTL, variou de 8,7 a 42,9 para as variáveis instrumentais e de 32 a 67,6 para as variáveis sensoriais.

De maneira geral, os QTLs detectados correspondem a regiões já relatadas na literatura, englobando os parâmetros instrumentais e sensoriais (KING et al., 2000; 2001; LIEHBARD et al., 2003 ; KENIS et al., 2008; LONGHI et al., 2011).

3.3.1 QTLs para as variáveis instrumentais

Dados instrumentais utilizados na análise de QTL permitiram a identificação de 13 QTLs associados às variáveis de penetrometria e compressão (Fig. 2). Destes, somente dois QTLs, localizados no LG01, correspondem as variáveis de compressão, os quais estão co-localizados com as variáveis de penetrometria. Nesta região é possível identificar QTLs para a data 1, que corresponde as avaliações fenotípicas no momento da colheita, independentemente do ano e do estágio de maturação.

Um grande número de QTLs para as variáveis estudadas encontram-se na região do gene de resistência *Vf* (LG01). Além disso, Costa et al. (2008) mapeou o gene da expansina (*Md-Exp7*) em uma região do grupo de ligação LG01. Embora essa região seja frequentemente relatada com o mapeamento de QTLs de textura (KING et al., 2000; 2001), esses resultados devem ser considerados com cautela, pois esta região apresentou distorções no mapa genético utilizado para a detecção de QTL, que podem induzir viés na detecção (informação pessoal fornecida por François Laurens).

Além do mapeamento já evidenciado nos grupos de ligação LG01, QTLs foram mapeados nos grupos de ligação LG02, LG07, LG11 e LG16. O QTL mapeado no grupo de ligação LG16 apresentou um valor de LOD alto (Tab. 4). Esse QTL foi mapeado na região que codifica o gene *Ma*, responsável pelo acúmulo de ácido málico (KING et al., 2000; 2001). Um alto valor de LOD também foi evidenciado no QTL localizado no LG02 (Tab. 4). Dois QTLs relacionados com a penetrometria foram mapeados nos grupos de ligação LG07 e LG11 (Fig. 2). No entanto, enquanto no grupo de ligação LG16 diversos QTLs já foram relatados (KING et al., 2000; 2001; KENIS et al., 2008), nos grupos de ligação LG02, LG07 e

LG11, somente Kenis et al. (2008), King et al. (2001) e Liebhart et al. (2003), identificaram QTLs relacionados com os parâmetros de textura, respectivamente, nesses cromossomos.

3.3.2 QTLs para as variáveis sensoriais

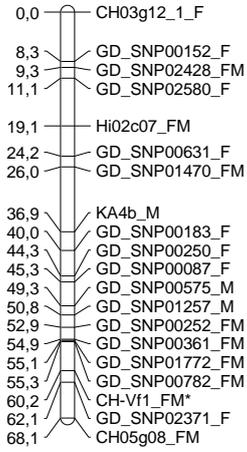
QTLs para as variáveis sensoriais foram localizados nos grupos de ligação LG01, LG07 e LG10. Nos grupos de ligação LG01 e LG07, as variáveis sensoriais estão agrupados com parâmetros instrumentais. No entanto, no LG10, uma importante região foi identificada com a localização de três QTLs sensoriais, sem co-localização com qualquer QTL instrumental, com valor de LOD variando entre 7,18 a 12,9, e explicando 47,3 a 67,6% da variação fenotípica total (Tab. 4).

O grupo de ligação LG10 já foi relatado na literatura como sendo uma região importante para a textura (KING et al., 2000; KENIS et al., 2008; LONGHI et al., 2011). Além disso, alguns genes candidatos já foram mapeados nesse grupo de ligação. Por exemplo, o gene que codifica para ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidase (*Md-ACO1*), que catalisa uma das etapas da biossíntese de etileno, foi mapeado na parte inferior do LG10 (COSTA et al., 2005) e o gene que codifica para poligalacturonase (*Md-PG1*), que é uma das principais enzimas envolvidas na despolimerização da pectina, foi mapeado numa região central do LG10 (COSTA et al., 2010). Neste estudo, enfatizou-se uma região sensorial de aproximadamente 20,0 cM no LG10, a qual pode estar relacionada com a localização desses genes candidatos.

3.3.3 QTLs para as variáveis histológicas

A fim de avaliar a contribuição do estudo celular nos atributos de textura, o tamanho de célula foi avaliado em seções radiais de maçãs colhidas em 2007 e 2011, após dois meses de armazenamento. Somente um QTL foi detectado para essa variável, o qual está localizado no grupo de ligação LG01 (Fig. 1). Até hoje, nenhum trabalho relacionou a detecção de QTLs com o tamanho celular. Embora ele não esteja co-localizado com outras variáveis de penetrometria, compressão e análise sensorial, a maneira em que os tecidos e os componentes celulares estão organizados e como eles se relacionam pode ser a chave para o entendimento de como a estrutura celular afeta as propriedades sensoriais, como a textura.

LG01



WH1_O_date1_07 LOD=6.24_R²=19.8

WH2_O_date1_07 LOD=5.21_R²=16.8

Op1_O_date2_07 LOD=5.73_R²=21.7

Ep_P_date1_11 LOD=10.77_R²=22.1

Fp_P_date1_11 LOD=4.91_R²=9.9

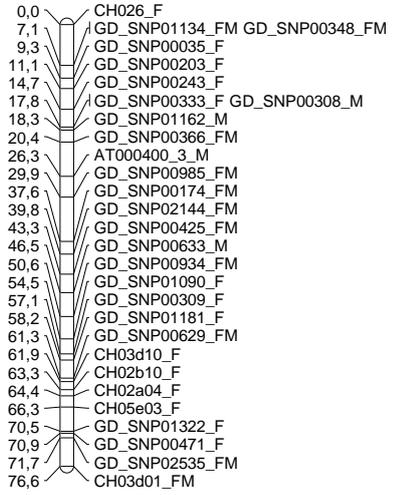
F1_P_date1_11 LOD=10.41_R²=37.9

FI2_P_date1_11 LOD=9.02_R²=34.9

Ff_O_date1_11 LOD=6.48_R²=27.5

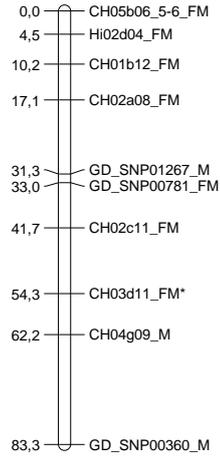
Farin_O_date2_11 LOD=5.81_R²=33.1

LG02



Dp_O_date2_07 LOD=7.53_R²=18.3

LG10



Fibr_O_date2_11 LOD=10.73_R²=32

FI2_O_date1_07 LOD=6.27_R²=42.9

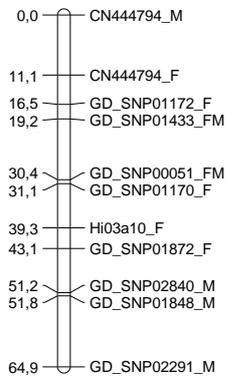
FI_O_date1_07 LOD=6.08_R²=42.3

Gran_O_date2_07 LOD=12.67_R²=59

Fibr_O_date2_07 LOD=7.8_R²=47.3

Crq_O_date2_07 LOD=12.9_R²=67.6

LG07



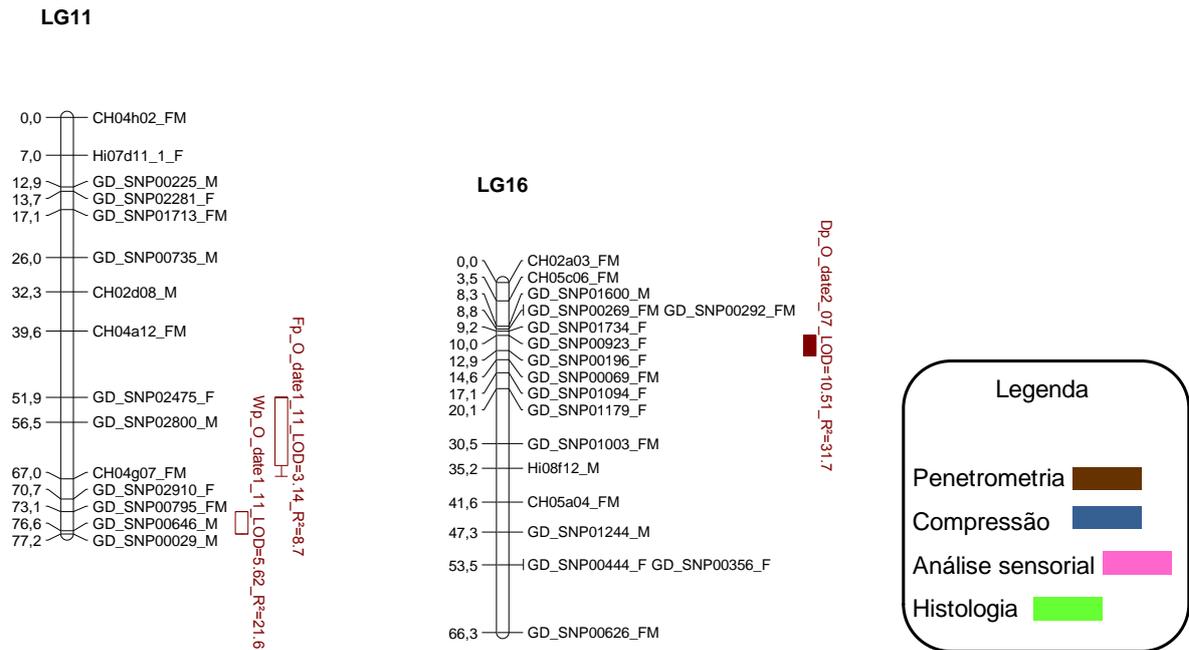


Figura 2. Locos de características quantitativas (QTLs) detectados no mapa integrado para os atributos de textura, com base na progênie F1 derivada do cruzamento X3259 x X3263 de híbridos de maçã. As distâncias em centiMorgans (Kosambi) são indicadas no lado direito dos cromossomos e marcadores moleculares estão na esquerda. QTLs detectados em 2007 (07) e 2011 (11) foram representados, respectivamente, com caixas sólidas e abertas, estendidas por linhas representando os intervalos de confiança baseados nos logaritmos das probabilidades LOD-1 e LOD-2.

Tabela 4. QTLs detectados para os parâmetros instrumentais (penetrometria e compressão), sensoriais e histológicos, detectados pelo método de mapeamento múltiplo (MQM).

Categoria das variáveis	Variáveis	QTL*	LG	Posição (cM)	Locus	LOD	R² (%)	A_m	A_f	D
Penetrometria	Fp	Fp_P_date1_11	LG01	52,84	GD_SNP00252_FM	4,91	10,1	0,06	0,15	-0,02
		Fp_O_date1_11	LG11	56,48	GD_SNP02800_M	3,14	8,7	0,12	0,11	0,072
	Dp	Dp_O_date2_07	LG02	37,59	GD_SNP00174_FM	7,53	18,3	-0,17	-0,02	0,039
		Dp_O_date2_07	LG16	12,92	GD_SNP00196_F	10,51	31,7	-0,13	0,22	-0,06
	Wp	Wp_O_date1_11	LG11	76,12	GD_SNP00646_M	5,62	21,6	0,30	0,27	0,17
	Ep	Ep_P_date1_11	LG01	52,84	GD_SNP00252_FM	10,77	22,1	0,03	0,08	0,02
	Ff	Ff_P_date1_11	LG01	51,84	GD_SNP01257_M	10,41	37,9	0,09	0,15	0,07
		Ff_O_date1_11	LG01	59,31	CH-Vf1_FM*	6,48	27,5	0,03	0,14	0,06
		Ff_O_date1_07	LG07	14,13	CN444794_F	6,08	42,3	0,19	-0,18	-0,28
	Ff2	Ff2_P_date1_11	LG01	50,84	GD_SNP01257_M	9,02	34,9	0,10	0,16	0,07
Ff2_O_date1_07		LG07	14,13	CN444794_F	6,27	42,9	0,21	-0,20	-0,29	
Compressão	WH1	WH1_O_date1_07	LG01	50,33	GD_SNP01257_M	6,24	19,8	-6,07	-2,25	0,44
	WH2	WH2_O_date1_07	LG01	50,33	GD_SNP01257_M	5,21	16,8	-4,37	-1,8	0,49
Análise sensorial	Farinosidade	Farin_O_date2_11	LG01	55,31	CH-Vf1_FM*	5,81	33,1	0,43	0,45	0,28
	Fibrosidade	Fibr_P_date2_11	LG07	15,13	GD_SNP01172_F	10,73	32	0,91	-0,45	-0,55
		Fibr_O_date2_07	LG10	62,24	CH04g09_M	7,18	47,3	-0,08	-0,68	0,10
	Crocância	Croq_O_date2_07	LG10	83,31	GD_SNP00360_M	12,9	67,6	-0,12	-0,71	0,02
Granulosidade	Gran_O_date2_07	LG10	83,31	GD_SNP00360_M	12,64	59	0,12	0,94	0,08	
Avaliação histológica	Cp1	Cp1_O_date2_07	LG01	62,13	GD_SNP02371_F	5,73	21,7	-0,69	-0,21	0,02

* O nome do QTL indica a variável, o estágio de maturação – (P): precoce; (O): ótimo, a data de avaliação – (date1): colheita; (date2): 2 meses de armazenamento a 1,5 °C ± 80% UR e o ano – (07): 2007; (11): 2011.

4 Conclusão

Neste estudo, um conjunto de QTLs foi detectado revelando regiões genômicas que controlam as variáveis relacionadas com a textura da maçã. Essas regiões detectadas confirmam resultados já relatados na literatura, especialmente os relativos aos grupos de ligação LG01, LG10 e LG16, além de terem sido detectados novos QTLs para essas características. No entanto, a comparação da posição desses QTLs nos grupos de ligação é limitada, pois as suas posições não são indicadas, ou seja, é possível somente indicar se há presença de QTLs ou não nos grupos de ligação já relatados na literatura.

Das regiões onde foram detectados QTLs, algumas eram específicas para as variáveis instrumentais ou sensoriais, das quais se destacou a região sensorial, no grupo de ligação LG10. A co-localização entre os parâmetros, demonstra complementaridades significativas entre as avaliações fenotípicas, encontradas especialmente no grupo de ligação LG01.

A detecção de QTLs em relação às variáveis sofreu grande instabilidade em relação aos anos de avaliação. Isso pode ser explicado devido à queda de granizo que ocorreu em 2011, que pode ter alterado o metabolismo das maçãs colhidas nesse ano, pois a qualidade da maçã está intimamente ligada às condições ambientais pré-colheita e pós-colheita. Pressupôs-se, inicialmente, que regiões comuns para as variáveis instrumentais e sensoriais nos diferentes anos, estádios de maturação e datas de avaliação seriam encontradas. No entanto, isso não foi verificado.

Os resultados aqui apresentados devem ser completados com a cartografia dos principais genes candidatos envolvidos com a regulação da textura em maçã e com a verificação da estabilidade genética dos QTLs ao longo de vários anos. Estes resultados servirão de base para futuras pesquisas, nas quais os principais genes que controlam as determinantes estruturais que atuam sobre a qualidade da textura serão avaliados. Eles também abrem novas perspectivas para melhorar a qualidade de maçã pela seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento genético. Além disso, fornece ao cabedal científico um avanço sobre o determinismo genético da qualidade da textura de maçã.

Agradecimentos

Ao programa CAPES-COFECUB (631/09), CNPq e FAPERGS pela bolsa de estudos e suporte financeiro.

5 Referências

ALLAN-WOJTAS, P.; SANFORD, K.A.; MCRAE, K.B.; CARBYN, S. An integrated microstructural and sensory approach to describe apple texture. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 128, p. 381-390, 2003.

COSTA, F.; STELLA, S.; VAN de WEG, W.E.; GUERRA, W.; CECCHINEL, M.; DALLAVIA, J.; KOLLER, B.; SANSAVINI, S. Role of the genes Md-ACO1 and Md-ACS1 in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh). **Euphytica**, v. 141, p. 181-190, 2005.

COSTA, F.; VAN DE WEG, W.E.; 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 domestica* Borkh) and pear (*Pyrus communis*). **Tree Genetics & Genomes**, v. 4, p. 575-586, 2008.

COSTA, F.; PEACE, C.P.; STELLA, S.; SERRA, S.; MUSACCHI, S.; BAZZANI, M.; SANSAVINI, S.; VAN DE WEG, W.E. QTL dynamics for fruit firmness and softening around an ethylene-dependent polygalacturonase gene in apple (*Malus x domestica* Borkh.). **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 3029-3039, 2010.

DEVAUX, M.F.; BOUCHET, B.; LEGLAND, D.; GUILLON, F.; LAHAYE, M. Macrovision and grey level granulometry for quantification of tomato pericarp structure. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47, p. 199-209, 2008.

DUREL, C.E.; PARISI, L.; LAURENS, F.; VAN DE WEG, W.E.; LIEBHARD, R.; JOURJON, M.F. Genetic dissection of partial resistance to race 6 of *Venturia inaequalis* in apple. **Genome**, v. 46, p. 224-234, 2003.

GÁLVEZ-LÓPEZ, D. **Etude des déterminants structuraux et génétiques de la texture de la pomme.** 2011. 160f. Thèse (Doctorat in Biotechnologie agroalimentaire) - Faculté des Sciences et des Techniques, Université de Nantes, Nantes.

GÁLVEZ-LÓPEZ, D.; LAURENS, F.; QUÉMÉNER, B.; LAHAYE, M. Variability of cell wall polysaccharides composition and hemicelluloses enzymatic profile in an apple progeny. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, p. 1104-1109, 2011.

GÁLVEZ-LÓPEZ, D.; LAURENS, F.; DEVAUX, M.F.; LAHAYE, M. Texture analysis in an apple progeny through instrumental, sensory and histological phenotyping. **Euphytica**, v. 185, p. 171-183, 2012.

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

HARKER, F.R.; MAINDONALD, J.; MURRAY, S.H.; GUNSON, F.A.; HALLETT, I.C.; WALKER, S.B. Sensory interpretation of instrumental measurements 1: texture of apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 22, p. 225-239, 2002.

JARVIS, M.C.; BRIGGS, S.P.H.; KNOX, J.P. Intercellular adhesion and cell separation in plants. **Plant Cell and Environment**, v. 26, p. 977-989, 2003.

KENIS, K.; KEULEMANS, J.; DAVEY, M. Identification and stability of QTLs for fruit quality traits in apple. **Tree Genetics & Genomes**, v. 4, p. 647-661, 2008.

KING, G.J.; MALIEPAARD, C.; LYNN, J.R.; ALSTON, F.H.; DUREL, C.E.; EVANS, K.M.; GRIFFON, B.; LAURENS, F.; MANGANARIS, A.G.; SCHREVEENS, T.; TARTARINI, S.; VERHAEGH, J. Quantitative genetic analysis and comparison of physical and sensory descriptors relating to fruit flesh firmness in apple (*Malus pumila* Mill.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 1074-1084, 2000.

KING, G.J.; LYNN, J.R.; DOVER, C.J.; EVANS, K.M.; SEYMOUR, G.B. Resolution of

quantitative trait loci for mechanical measures accounting for genetic variation in fruit texture of apple (*Malus pumila* Mill.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p. 1227-1235, 2001.

KOUASSI, A.B.; DUREL, C.E.; COSTA, F.; TARTARINI, S.; WEG, E.D.V.; EVANS, K.; FERNANDEZ-FERNANDEZ, F.; GOVAN, C.; BOUDICHEVSKAJA, A.; DUNEMANN, F.; ANTOFIE, A.; LATEUR, M.; STANKIEWICZ-KOSYL, M.; SOSKA, A.; TOMALA, K.; LEWANDOWSKI, M.; RUTKOVSKI, K.; ZURAWICZ, E.; GUERRA, W.; LAURENS, F. Estimation of genetic parameters and prediction of breeding values for apple fruit-quality traits using pedigreed plant material in Europe. **Tree Genetics and Genomes**, v. 5, p. 659-672, 2009.

LIEBHARD, R.; KELLERHALS, M.; PFAMMATTER, W.; JERTMINI, M.; GESSLER, C. Mapping quantitative physiological traits in apple (*Malus x domestica* Borkh.). **Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 511-526, 2003.

LONGHI, S.; MORETTO, M.; VOLA, R.; VELASCO, R.; COSTA, F. Comprehensive QTL mapping survey dissects the complex fruit texture physiology in apple (*Malus x domestica* Borkh.). **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 1107-1121, 2011.

MEHINAGIC, E.; ROYER, G.; SYMONEAUX, R.; BERTRAND, D.; JOURJON F. Prediction of the sensory quality of apples by physical measurements. **Postharvest Biology and Technology**, v. 34, p. 257-269, 2004.

SILFVERBERG-DILWORTH, E.; MATASCI, C.L.; VAN DE WEG, W.E.; VAN KAAUWEN, M.P.W.; WALSER, M.; KODDE, L.P.; SOGLIO, V.; GIANFRANCESCHI, L.; DUREL, C.E.; COSTA, F.; YAMAMOTO, T.; KOLLER, B.; GESSLER, C.; PATOCCHI, A. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. **Tree Genetics and Genomes**, v. 2, p. 202-224, 2006.

SZCZESNIAK, A.S. Texture is a sensory property. **Food Quality and Preference**, v. 13, p. 215-225, 2002.

WALDRON, K.W.; PARK, M.L.; SMITH, A.C. Plant cell walls and food quality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, p. 101-119, 2003.

Van OOIJEN, J.W. **JoinMap[®] 4: Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations**. Wageningen, 2006. p. 63.

Van OOIJEN, J.W. **MapQTL[®] 5: Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations**. Wageningen, 2004. p. 63.

VELASCO, R.; et al. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). **Nature Genetics**, v. 42, p. 833-839, 2010.

VOORRIPS, R. E. MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs. **The Journal of Heredity**, v. 93, p. 77-78, 2002.

XU, K.; WANG, A.; BROWN, S. Genetic characterization of the *Ma* locus with pH and titratable acidity in apple. **Molecular Breeding**, v. 30, p. 899-912, 2012.

4 Considerações finais e perspectivas

O trabalho de tese foi realizado em colaboração entre o PPGCTA da UFPel e o IRHS do INRA e tratou de duas temáticas distintas de estudo. No entanto, os assuntos convergem, pois ambos trataram de aspectos relacionados com a qualidade pós-colheita de frutos, visando o entendimento das alterações bioquímico-fisiológicas e transcricionais e permitindo incluir informações de marcadores moleculares, auxiliando no entendimento da arquitetura genética dos caracteres quantitativos através da detecção e mapeamento de QTLs.

Assim, no primeiro estudo, buscou-se avaliar as alterações moleculares decorrentes da ação da radiação UV-C no armazenamento de tomates cv. Flavortop e suas relações com as respostas bioquímico-fisiológicas e com os eventos influenciados pelo hormônio vegetal etileno. Nesse experimento, optou-se utilizar o tomate como modelo, por se tratar de um fruto climatérico com comportamento clássico, que apresenta um ciclo de vida relativamente curto. De maneira geral, observou-se que:

- A radiação UV-C estimulou a produção de etileno e mesmo assim retardou a maturação, especialmente pela menor evolução da coloração dos frutos;
- Os frutos tratados com 1-MCP apresentaram retardo na produção de etileno, no desenvolvimento da coloração e na perda da firmeza de polpa;
- A aplicação de UV-C em frutos submetidos ao tratamento com 1-MCP (1-MCP+UV-C) não foi capaz de promover as mesmas respostas fisiológicas verificadas nos tomates com a presença do etileno;
- Ao analisar o perfil transcricional dos genes envolvidos com as vias metabólicas estudadas, foi verificado que a radiação UV-C induz rapidamente (no primeiro dia) a expressão da maioria dos genes estudados e que o 1-MCP inibe fortemente a expressão dos genes tanto no exocarpo como no mesocarpo e, apesar da radiação UV-C ser um agente de ação superficial, o maior acúmulo de transcritos ocorreu no mesocarpo dos frutos;
- O aumento no teor de poliaminas nos frutos tratados com radiação UV-C pode ser uma das causas do retardo da maturação.

No segundo estudo, que consistiu na fenotipagem de caracteres associados com a textura da maçã e a detecção e o mapeamento de QTLs em uma população derivada do cruzamento entre X3259 e X3263 de maçã, permitiu-se verificar que:

- Houve a detecção e o mapeamento de 19 locos quantitativos que controlam a textura em maçã, os quais estão localizados em diferentes grupos de ligação;

- Há uma complexidade dos parâmetros da textura da maçã, ou seja, há áreas específicas para a sazonalidade, para o estágio de maturação e para o período de avaliação (na colheita ou após dois meses de armazenamento refrigerado a $1,5\text{ °C} \pm 80\% \text{ UR}$).

Para esclarecimento e aprofundamento dos estudos, sugere-se:

- Estudar genes relacionados com a biossíntese de poliaminas;
- Realizar estudo da atividade enzimática das principais enzimas envolvidas nas rotas metabólicas estudadas;

- Determinar a concentração de ROS relacionando seu envolvimento na sinalização celular;

- Realizar a aplicação exógena de poliaminas buscando confirmar sua relação com as respostas ao UV-C;

- Realizar novos experimentos para mapear os principais genes candidatos e verificar as suas posições em relação aos QTLs detectados;

- Verificar a estabilidade dos QTLs através da detecção em anos sucessivos;

- Empregar os QTLs identificados na seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento genético.

5. Referências

ABBOT, J.A. Quality measurement of fruits and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 15, p. 207-225, 1999.

ADAMS-PHILLIPS, L.; BARRY, C.; GIOVANNONI, J. Signal transduction systems regulating fruit ripening. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 331-338, 2004.

ALLAN-WOJTAS, P.; SANFORD, K.A.; MCRAE, K.B.; CARBYN, S. An integrated microstructural and sensory approach to describe apple texture. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 128, p. 381-390, 2003.

ALEXANDER, L.; GRIERSON, D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 2039-2055, 2002.

BAKA, M.; MERCIER, J.; CORCUFF, F.; CASTAIGNE, F.; ARUL, J. Photochemical treatment to improve storability of fresh strawberries. **Journal of Food Science**, v. 64, p. 1068-1072, 1999.

BAPAT, V.A.; TRIVEDI, P.K.; GROSH, A.; SANE, V.A.; GANAPATHI, T.R.; NATH, P. Ripening of fleshy fruit: Molecular insight and the role of ethylene. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 94-107, 2010.

BARKA, E. A. Protective enzymes against reactive oxygen species during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits in response to low amounts of UV-C. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 785-791, 2001.

BARSAN, C.; SANCHEZ-BEL, P.; ROMBALDI, C.; EGEE, I.; ROSSIGNOI, M.; KUNTZ, M.; ZOUINE, M.; LATCHÉ, A.; BOUZAYEN, M.; PECH, J. C. Characteristics of the tomato chromoplast revealed by proteomic analysis. **Journal of Experimental Botany**, p.1-9, 2010.

BIALCZYK, J.; LECHOWSKI, Z.; LIBIK, A. The protective action of tannins against glasshouse whitefly in tomato seedlings. **The Journal of Agricultural Science**, v. 133, p. 197-201, 1999.

BLANKENSHIP, S. M. Ethylene effects and the benefits of 1-MCP. **Perishables Handling Quartely**, n. 108, 4p, 2001.

BLEECKER, A.B.; KENDE, H. Ethylene: A Gaseous Signal Molecule in Plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 16, p. 1-18, 2000.

BRAMLEY, P. M. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 2107-2113, 2002.

BRAVO, S.; GARCÍA-ALONSO, J.; MARTÍN-POZUELO, G.; GÓMEZ, V.; SANTAELLA, M.; NAVARRO-GONZÁLEZ, I.; PERIAGO, M.J. The influence of post-harvest UV-C hormesis on lycopene, β -carotene, and phenolic content and antioxidant activity of breaker tomatoes. **Food Research International**, v. 49, p. 296–302, 2012.

BREUSEGEM, F. V.; VRANOVÁ, E.; DAT, J. F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, p.405-414, 2001.

BUTELLI, E.; TITTA, L.; GIORGIO, M.; MOCK, H. P.; MATROS, A.; PETEREK, S.; SCHIJLEN, E.G.W.M.; HALL, R.D.; BOVY, A.G.; LUO, J.; MARTIN C. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. **Nature Biotechnology**, v. 26, p. 1301-1308, 2008.

CARA, B.; GIOVANNONI, J.J. Molecular biology of ethylene during tomato fruit 483 development and maturation. **Plant Science**, v. 175, p. 106-113, 2008.

CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Mapas Genéticos em Plantas. **Bragantia**, v. 61, p. 89-100, 2002.

CHARLES, M. T.; MERCIER, J.; MAKHLOUF, J.; ARUL, J. Physiological basis of UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit I. Role of pre-and-post-challenge accumulation of the phytoalexin-rishitin. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47 p. 10-20, 2008a.

CHARLES, M. T.; BENHAMOU, N.; ARUL, J. Physiological basis of UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit III. Ultrastructural modifications and their impact on fungal colonization. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47 p. 27-40, 2008b.

CHOI, S.T.; HUBER, D.J.; KIM, J.G. HONG, Y.P. Influence of chlorine and mode of application on efficacy of aqueous solutions of 1-methylcyclopropene in delaying tomato (*Solanum lycopersicum*.) fruit ripening. **Postharvest Biology and Technology**, v. 53, p. 16-21, 2009.

CISNEROS-ZEVALLOS, L. The use of controlled postharvest abiotic stresses as a tool for enhancing the nutraceutical content and adding-value of fresh fruits and vegetables. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 1560-1565, 2003.

CLIFF, M.; LOK, S.; LU, C.; TOIVONEN, P. M. A. Effect of 1-methylcyclopropene on the sensory, visual, and analytical quality of greenhouse tomatoes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 53, p. 11-15, 2009.

COGO, S. L. P.; CHAVES, F. C.; SCHIRMER, M. A.; ZAMBAZI, R. C.; NORA, L.; SILVA, J. A.; ROMBALDI, C.V. Low soil water content during growth contributes to preservation of green colour and bioactive compounds of cold-stored broccoli (*Brassica oleraceae* L.) florets. **Postharvest Biology and Technology**, v. 60, p. 158-163, 2011.

COLLARD, B.B.Y.; JAHUFER, M.Z.Z.; BROUWER, J.B.; PANG, E.C.K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica**, v. 142, p. 169-196, 2005.

COSTA, F.; STELLA, S.; VAN de WEG, W.E.; GUERRA, W.; CECCHINEL, M.; DALLAVIA, J.; KOLLER, B.; SANSAVINI, S. Role of the genes Md-ACO1 and Md-ACS1 in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh). **Euphytica**, v. 141, p. 181-190, 2005.

COSTA, F.; VAN DE WEG, W.E.; 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 domestica* Borkh) and pear (*Pyrus communis*). **Tree Genetics & Genomes**, v. 4, p. 575-586, 2008.

COSTA, F.; PEACE, C.P.; STELLA, S.; SERRA, S.; MUSACCHI, S.; BAZZANI, M.; SANSAVINI, S.; VAN DE WEG, W.E. QTL dynamics for fruit firmness and softening around an ethylene-dependent polygalacturonase gene in apple (*Malus x domestica* Borkh.). **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 3029-3039, 2010.

D'AMOUR, J.; GOSSELIN, C.; ARUL, J.; CASTAIGNE, F.; WILLEMOT, C. Gamma irradiation affects cell wall composition of strawberries. **Journal of Food Science**, v. 58, p. 182-185, 1993.

DEVAUX, M.F.; BOUCHET, B.; LEGLAND, D.; GUILLON, F.; LAHAYE, M. Macro-vision and grey level granulometry for quantification of tomato pericarp structure. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47, p. 199-209, 2008.

DUGARDEYN, J.; STAETEN, D. V. D. Ethylene: Fine-tuning plant growth and development by stimulation and inhibition of elongation. **Plant Science**, v. 175, p. 59-70, 2008.

DUREL, C.E.; PARISI, L.; LAURENS, F.; VAN DE WEG, W.E.; LIEBHARD, R.; JOURJON, M.F. Genetic dissection of partial resistance to race 6 of *Venturia inaequalis* in apple. **Genome**, v. 46, p. 224-234, 2003.

ERKAN, M.; WANG, S. Y.; WANG, C. Y. Effect of UV treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme and decay in strawberries fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, p. 163-171, 2008.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genética**. Brasília, 1995. 220 p.

FRASER, P. D.; ENFISSI, E.; M.A.; BRAMLEY, P. M. Genetic engineering of carotenoid formation in tomato fruit and the potential application of systems and synthetic biology approaches. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 483, p. 196-204, 2009.

GÁLVEZ-LÓPEZ, D. **Etude des déterminants structuraux et génétiques de La texture de la pomme**. 2011. 160f. Thèse (Doutorat an Biotechnologie agroalimentaire) - Faculté des Sciences et des Techniques, Université de Nantes, Nantes.

GÁLVEZ-LÓPEZ, D.; LAURENS, F.; QUÉMÉNER, B.; LAHAYE, M. Variability of cell wall polysaccharides composition and hemicelluloses enzymatic profile in an apple progeny. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, p. 1104-1109, 2011.

GÁLVEZ-LÓPEZ, D.; LAURENS, F.; DEVAUX, M.F.; LAHAYE, M. Texture analysis in an apple progeny through instrumental, sensory and histological phenotyping. **Euphytica**, v. 185, p. 171-183, 2012.

GEORGE, B.; KAUR, C.; KHURDIYA, D.S.; KAPOOR, H.C. Antioxidants in tomato (*Lycopersium esculentum*) as a function of genotype. **Food Chemistry**, v. 84, p. 45-51, 2004.

GIOVANNONI, J.J. Genetic regulation of fruit development and ripening. **The Plant Cell**, v. 16, p. S170-S180, 2004.

GIRARDI, C. L.; CORRENT, A. R.; LUCCHETTA, L.; ZANUZO, M. R.; DA COSTA, T. S.; BRACKMANN, A., TWYMAN, R. M.; NORA, F. R.; NORA, L.; SILVA, J. A.; ROMBALDI, C. V. Effect of ethylene, intermittent warming and controlled atmosphere on postharvest quality and the occurrence of woolliness in peach (*Prunus persica* cv. Chiripa) during cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 38, p.25-33, 2005.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; WANG, C. Y.; BUTA, J. G.; KRIZEK, D. T. Use of UV-C irradiation to prevent decay and maintain postharvest quality of ripe “Tommy Atkins” mangoes. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 36, p. 767-773, 2001.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; WANG, C. Y.; BUTA, J. G. UV-C irradiation reduces breakdown and chilling injury of peaches during cold storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 415-422, 2004.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; VILLEGAS-OCHOA, M. A.; MARTÍNEZ-TÉLEZ, M. A.; GARDEA, A. A.; AYALA-ZAVALA, J. F. Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C. **Journal of Food Science**, v. 72, p. 197-202, 2007.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A.; VILLA-RODRIGUEZ, J.A.; AYALA-ZAVALA, J.F.; YAHIA, E.M. Improvement of the antioxidant status of tropical fruits as a secondary response to some postharvest treatments. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 475-482, 2010.

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

GUILLÉN, F.; CASTILLO, S.; ZAPATA, P.J.; MARTINEZ-ROMERO, D.; VALERO, D.; SERRANO, M. Efficacy of 1-MCP treatment in tomato fruit 2. Effect of cultivar and ripening stage at harvest. **Postharvest Biology and Technology**, v. 42, p. 235-242, 2006.

HARKER, F.R.; GUNSON, F.A.; JAEGER, S.R. The case for fruit quality: an interpretive review of consumer attitudes, and preferences for apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 28, p. 333-347, 2003.

HERTOG, M.L.A.T.M.; NICHOLSON, S.E.; BANKS, N.H. The effect of modified atmospheres on the rate of firmness change in “Braeburn” apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 23, p. 175-184, 2001.

JAGADEESH, S. L.; CHARLES, M. T.; GARIEPY, Y.; GOYETTE, B.; RAGHAVAN, G.S.; VIGNEAULT, C. Influence of postharvest UV-C hormesis on the bioactive components of tomato during post-treatment handling. **Food Bioprocess Technol**, v. 4, p. 1463-1472, 2011.

JARVIS, M.C.; BRIGGS, S.P.H.; KNOX, J.P. Intercellular adhesion and cell separation in plants. **Plant Cell and Environment**, v. 26, p. 977-989, 2003.

JEONG, J.; HUBER, D. J.; SARGENT, S. A. Influence of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on ripening and cell-wall matrix polysaccharides of avocado (*Persea americana*) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 25, p. 241-256, 2002.

JIANG T.; JAHANGIR, M. M.; JIANG, Z.; LU, X.; YING, T. Influence of UV-C treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activity and texture of postharvest shiitake (*Lentinus edodes*) mushrooms during storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 56, p. 209-215, 2010.

KAHLAU, S.; BOCK, R. Plastid transcriptomics and translatomics of tomato fruit development and chloroplast to chromoplast differentiation: chromoplast gene expression largely serves the production of a single protein. **The Plant Cell**, v. 20, p. 856-874, 2008.

KENIS, K.; KEULEMANS, J.; DAVEY, M. Identification and stability of QTLs for fruit quality traits in apple. **Tree Genetics & Genomes**, v. 4, p. 647-661, 2008.

KING, G.J.; MALIEPAARD, C.; LYNN, J.R.; ALSTON, F.H.; DUREL, C.E.; EVANS, K.M.; GRIFFON, B.; LAURENS, F.; MANGANARIS, A.G.; SCHREVEVS, T.; TARTARINI, S.; VERHAEGH, J. Quantitative genetic analysis and comparison of physical and sensory descriptors relating to fruit flesh firmness in apple (*Malus pumila* Mill.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 1074-1084, 2000.

KING, G.J.; LYNN, J.R.; DOVER, C.J.; EVANS, K.M.; SEYMOUR, G.B. Resolution of quantitative trait loci for mechanical measures accounting for genetic variation in fruit texture of apple (*Malus pumila* Mill.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p. 1227-1235, 2001.

KNIGHT, H.; KNIGHT, M.R. Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. **Trends in Plant Science**, v.6, p. 262-267, 2001.

KONDO, S.; FIEBIG, A.; OKAWA, K.; OHARA, H.; KOWITCHAROEN, L.; NIMITKEATKAI, H.; KITTIKOM, M.; KIM, M. Jasmonic acid, polyamine, and antioxidant levels in apple seedling as affected by Ultraviolet-C irradiation. **Plant Growth Regulation**, v. 64, p. 83-89, 2011.

KOUASSI, A.B.; DUREL, C.E.; COSTA, F.; TARTARINI, S.; WEG, E.D.V.; EVANS, K.; FERNANDEZ-FERNANDEZ, F.; GOVAN, C.; BOUDICHEVSKAJA, A.; DUNEMANN, F.; ANTOFIE, A.; LATEUR, M.; STANKIEWICZ-KOSYL, M.; SOSKA, A.; TOMALA, K.; LEWANDOWSKI, M.; RUTKOVSKI, K.; ZURAWICZ, E.; GUERRA, W.; LAURENS, F. Estimation of genetic parameters and prediction of breeding values for apple fruit-quality traits using pedigreed plant material in Europe. **Tree Genetics and Genomes**, v. 5, p. 659-672, 2009.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987.

LIEBHARD, R.; KELLERHALS, M.; PFAMMATTER, W.; JERTMINI, M.; GESSLER, C. Mapping quantitative physiological traits in apple (*Malus x domestica* Borkh.). **Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 511-526, 2003.

LIU, L. H.; ZABARAS, D.; BENNETT, L.E.; AGUAS, P.; WOONTON, B.W. Effects of UV-C, red light and sun light on the carotenoid content and physical qualities of tomatoes during post-harvest storage. **Food Chemistry**, v. 115, p. 495-500, 2009.

LIVAK, K. J. L.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LONGHI, S.; MORETTO, M.; VOLA, R.; VELASCO, R.; COSTA, F. Comprehensive QTL mapping survey dissects the complex fruit texture physiology in apple (*Malus x domestica* Borkh.). **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 1107-1121, 2011.

MAHARAJ, R., ARUL, J., NADEAU, P. Effect of photochemical treatment in the preservation of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Capello) by delaying senescence. **Postharvest Biology and Technology**, v. 15, p. 13-23, 1999.

MARQUENIE, D. MICHAELS, C.W.; GEERAERD, A.H.; SCHENK, A.; SOONTJENS, C.; VAN IMPE, J.F.; NICOLAI, B.M. Using survival analysis to investigate the effect of UVC and heat treatment on storage rot of strawberry and sweet cherry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 187-196, 2002.

MARTIN-TANGUY, J. Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). **Plant Growth Regulation**, v. 4, p. 135-148, 2001.

MATHOOKO, F.M.; KUBO, Y.; INABA, A.; NAKAMURA, R. Induction of ethylene biosynthesis and polyamine accumulation in cucumber fruit in response to carbon dioxide stress. **Postharvest Biology and Technology**, v. 5, p. 51-65, 1995.

MEHINAGIC, E.; ROYER, G.; SYMONEAUX, R.; BERTRAND, D.; JOURJON F. Prediction of the sensory quality of apples by physical measurements. **Postharvest Biology and Technology**, v. 34, p. 257-269, 2004.

MEHTA, R.A., CASSOL, T., LI, N., HANDA, A.K., MATTOO, A.K. Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life. **Nature Biotechnology**, v. 20, p. 613-618, 2002.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.7, p. 405-410, 2002.

NEILY, M.H.; MATSUKURA, C.; MAUCOURT, M.; BERNILLON, S.; DEBORDE, C.; MOING, A.; YIN, Y-G.; SAITO, T.; MORI, K.; ASAMIZU, E.; ROLIN, D.; MORIGUCHI, T.; EZURA, H. Enhanced polyamine accumulation alters carotenoid metabolism at the transcriptional level in tomato fruit over-expressing spermidine synthase. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 242-252, 2011.

NISHIYAMA, K.; GUI, M.; ROSE, J. K. C.; KUBO, Y.; BENNETT, K. A.; WANGJIN, L.; KATO, K.; USHIJIMA, K.; NAKANO, R.; INABA, A.; BOUZAYEN, M.; PECH, J. C.; BENNETT, A. B. Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in Charentais melon. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 1281-1290, 2007.

NUÑES, M. C. N.; BRECHT, J. K.; MORAIS, A. M. M. B.; SARGENT, S. A. Physical and chemical quality characteristics of strawberries after storage are reduced by a short delay to cooling. **Postharvest Biology and Technology**, v. 6, p. 17-28, 1995.

ODRIOZOLA-SERRANO, I.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Effect of minimal processing on bioactive compounds and color attributes of fresh-cut tomatoes. **LWT- Food Science and Technology**, v. 41, p. 217-226, 2008.

PECH, J.C.; BOUZAYEN, M.; LATCHÉ, A. Climateric fruit ripening: Ethylene-dependent and independent regulation of ripening pathways in melon fruit. **Plant Science**, v. 175, p. 114-120, 2008.

POMBO, M. A.; ROSLI, H. G.; MARTÍNEZ, G. A.; CIVELLO, M. UV-C treatment affects the expression and activity of defense genes in strawberry fruit (*Fragaria × ananassa*, Duch.). **Postharvest Biology and Technology**, v. 59, p. 94-102, 2011.

RIDLEY B.L.; O'NEILL, M.A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 57, p. 926-967, 2001.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington: ILSI Press, 2001. 64p.

SAFTNER, R. A.; BALDI, B. G. Polyamine levels and tomato fruit development: possible interaction with ethylene. **Plant Physiology**, v. 92, p. 547-550, 1990.

SAS INSTITUTE. **SAS user-s guide: statistics**, version 9.1. Cary: SAS Institute.

SEMAGN, K.; BJØRNSTAD, A.; NDJIONDJOP, M.N. An overview of molecular marker methods for plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 2540-2568, 2006.

SEVERO, J.; TIECHER, A.; CHAVES, F. C.; SILVA, J. A.; ROMBALDI, C. V. Gene transcript accumulation associated with physiological and chemical changes during developmental stages of strawberry cv. Camarosa. **Food Chemistry**, v. 126, p. 995-1000, 2011.

SHAMA, G., ALDERSON, P. UV hormesis in fruits: a concept ripe for commercialization. **Trends Food Science and Technology**, v. 16, p.128-136, 2005.

SILFVERBERG-DILWORTH, E.; MATASCI, C.L.; VAN DE WEG, W.E.; VAN KAAUWEN, M.P.W.; WALSER, M.; KODDE, L.P.; SOGLIO, V.; GIANFRANCESCHI, L.; DUREL, C.E.; COSTA, F.; YAMAMOTO, T.; KOLLER, B.; GESSLER, C.; PATOCCHI, A. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. **Tree Genetics and Genomes**, v. 2, p. 202-224, 2006.

SINGLETON, L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SMITH, C. J. S.; 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, p. 369-379, 1990.

STEVENS, C.; LIU, J.; KHAN, V.A.; LU, J.Y.; WILSON, C.L.; IGWEGBE, E.C.K.; KABWE, M.K.; CHALUTZ, E.; DROBY, S. Application of Hormetic UV-C for delayed ripening and reduction of *Rhizopus* soft rot in tomatoes: the effect of tomatine on storage rot development. **Journal Phytopathology**, v. 146, p. 211-221, 1998.

SZCZESNIAK, A.S. Texture is a sensory property. **Food Quality and Preference**, v. 13, p. 215-225, 2002.

TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. **The Plant Journal**, v. 54, p. 733-749, 2008.

TASSONI, A.; WATKINS, C. B.; DAVIES, P. J. Inhibition of the ethylene response by 1-MCP in tomato suggest that polyamines are not involved in delaying ripening, but may moderate the rate of ripening or over-ripening. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 3313-3325, 2006.

TIECHER, A. **Efeito da radiação UV-C na expressão gênica e nas respostas bioquímico-fisiológicas em frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.)**. 2010. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

TAYLOR, N.L.; TAN, Y-F.; JACOBY, R.P.; MILLAR, A.H. Abiotic environmental stress induced changes in the *Arabidopsis thaliana* chloroplast, mitochondria and peroxisome proteomes. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 367-378, 2009.

Van OOIJEN, J.W. **JoinMap[®] 4: Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations**. Wageningen, 2006. p. 63.

Van OOIJEN, J.W. **MapQTL[®] 5: Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations**. Wageningen, 2004. p. 63.

VELASCO, R. et al., 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). **Nature Genetics**, v. 42, p. 833-841, 2010.

VICENTE, A. R.; PINEDA, C.; LEMOINE, L.; CIVELLO, P. M.; MARTINEZ, G. A.; CHAVES, A. R. UV-C treatments reduce decay, retain quality and alleviate chilling injury in pepper. **Postharvest Biology and Technology**, v. 35, p. 69-78, 2005.

VIEIRA, S. M.; THEODORO, K. H.; GLÓRIA, M. B. Profile and levels of bioactive amines in orange juice and orange soft drink. **Food Chemistry**, v. 100, p. 895-903, 2007.

VOORRIPS, R. E. MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs. **The Journal of Heredity**, v. 93, p. 77-78, 2002.

VORWERK, S.; SOMERVILLE, S.; SOMERVILLE, C. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 203-209, 2004.

WALDRON, K.W.; PARKER, M.L.; SMITH, A.C. Plant Cell Walls and Food Quality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, p. 128-146, 2003.

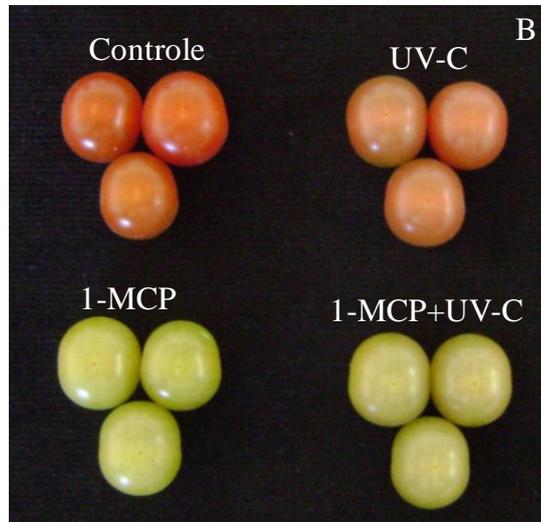
WANG K. L.-C.; LI, H.; ECKER, J. R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **The Plant Cell**, S131–S151, 2002.

XU, K.; WANG, A.; BROWN, S. Genetic characterization of the *Ma* locus with pH and titratable acidity in apple. **Molecular Breeding**, v. 30, p. 899-912, 2012.

ZAPATA, P.J.; SERRANO, M.; PRETEL, M.T.; AMORÓS, A.; BOTELLA, M.A. Polyamines and ethylene changes during germination of different plant species under salinity. **Plant Science**, v.167, p. 781-788, 2004.

APÊNDICES

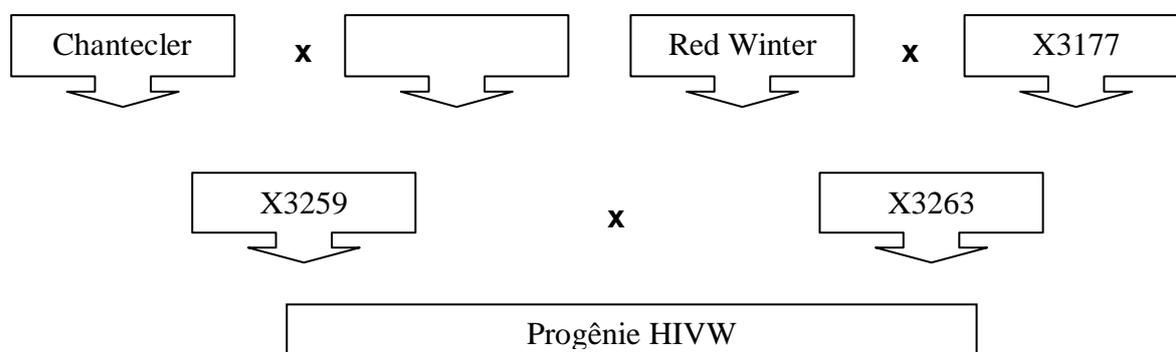
APÊNDICE A - Coloração e aparência geral de tomates cv. Flavortop armazenados após sete dias da aplicação dos tratamentos.



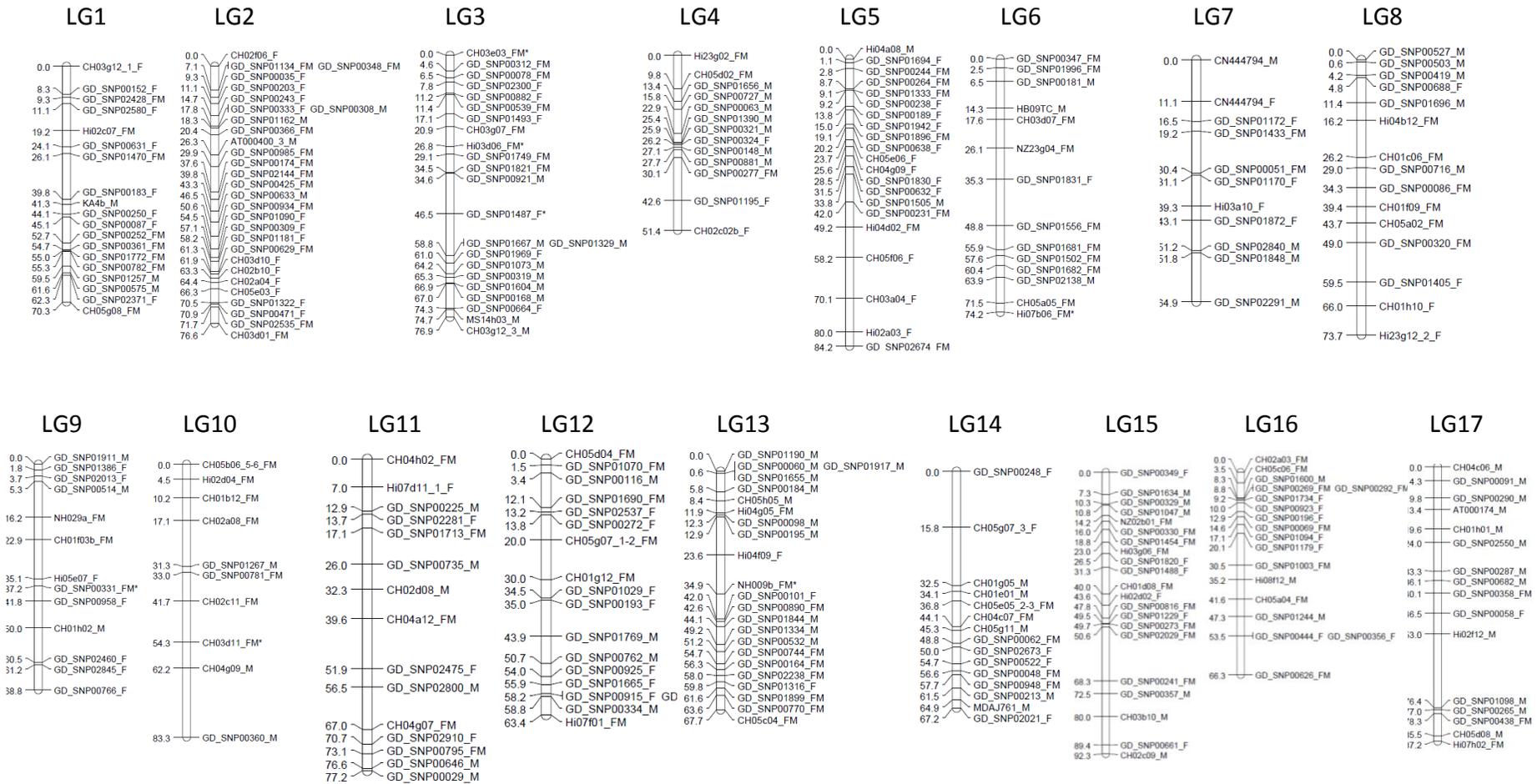
APÊNDICE B - Eficiência de amplificação dos *primers* para qPCR.

Gene	Slope	Eficiência
Biossíntese de etileno		
Ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico sintase (<i>ACCS</i>)	-2.83686	2.25
Ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico oxidase (<i>ACCO</i>)	-3.121	2.09
Biossíntese de ácidos graxos		
Acetil-CoA carboxilase A (<i>accA</i>)	-3.812	1.83
Acetil-CoA carboxilase D (<i>accD</i>)	-1.994	3.17
Biossíntese de carotenoides		
Fitoeno sintase (<i>PSY</i>)	-2.82383	2.26
ζ-caroteno desaturase (<i>ZDS</i>)	-2.62409	2.40
Licopene β-ciclase (<i>LCY-B</i>)	-3.09334	2.11
β-caroteno hidroxilase (<i>CRTRB</i>)	-3.306	2.01
Biossíntese de compostos fenólicos		
Fenilalanina amônia liase (<i>PAL</i>)	-2.06174	3.06
Chalcona sintase (<i>CHS</i>)	-2.81895	2.26
Flavonol sintase (<i>FLS</i>)	-2.616	2.41
Enzimas antioxidantes		
Ascorbato peroxidase (<i>APX</i>)	-2.22287	2.82
Catalase (<i>CAT</i>)	-2.72842	2.33
Superoxido dismutase (<i>SOD</i>)	-3.46378	1.94
Metabolismo da parede celular		
Poligalacturonase (<i>PG</i>)	-3.75015	1.85
Controle endógeno		
Actina (<i>Act</i>)	-3.296	2.01

APÊNDICE C - Pedigree da progênie analisada, resultante do cruzamento entre os genitores X3259 e X3263.



APÊNDICE D - Mapa genético de ligação integrado de um cruzamento (X3259 x X3263) baseado em 182 indivíduos, utilizando marcadores SNP e SSR. O mapa é constituído de 17 grupos de ligação. Esquerda do grupo de ligação: distâncias no mapa em centiMorgans (cM); direita: identificação dos marcadores moleculares. LG: do inglês, *linkage group*.



APÊNDICE E - Avaliações fenotípicas da população de maçãs derivadas do cruzamento entre X3259 x X3263

Ano	Estágio de maturação	Período de armazenamento	Avaliações		
			Instrumental	Sensorial	Histológica
2007	Ótimo	Data 1	104	104	
		Data 2	94	103	99
2011	Precoce	Data 1	120		
		Data 2	106	108	
	Ótimo	Data 1	74		
		Data 2	44	59	77

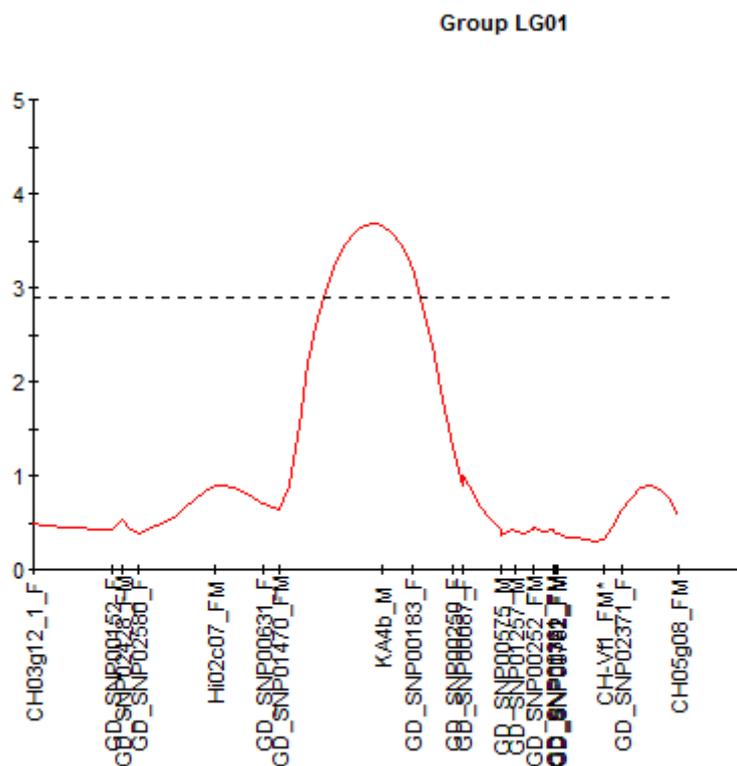
APÊNDICE F - Definição dos parâmetros de penetrometria e compressão (MEHINAGIC et al., 2004; GALVEZ-LOPEZ, 2011).

Parâmetros	Definição
Curvas de penetrometria	
Fp (Kg)	Força máxima da curva de penetração necessária para romper a pele e penetrar na polpa do fruto
Dp (mm)	Deformação associada à Fp antes da ruptura da pele
Wp (Kg mm)	Área sob a curva entre o e Fp. Trabalho mecânico para penetrar na polpa do fruto
Ep (Kg mm ⁻¹)	Declive da curva entre o e Fp representando a elasticidade do tecido
Ff (Kg)	Força mensurada à 7 mm de deformação
Ff2 (Kg)	Força mensurada à 9 mm de deformação
Curvas de compressão	
H1 (Kg)	Força máxima a partir da primeira compressão do teste de dupla compressão
H2 (Kg)	Força máxima a partir da segunda compressão do teste de dupla compressão
WH1 (Kg mm)	Área sob a primeira curva de carga/descarga
WH2 (Kg mm)	Área sob a segunda curva de carga/descarga
Grad1(Kg mm ⁻¹)	Declive a partir da fase de carga da primeira compressão
Grad2 (Kg mm ⁻¹)	Declive a partir da fase de carga da segunda compressão

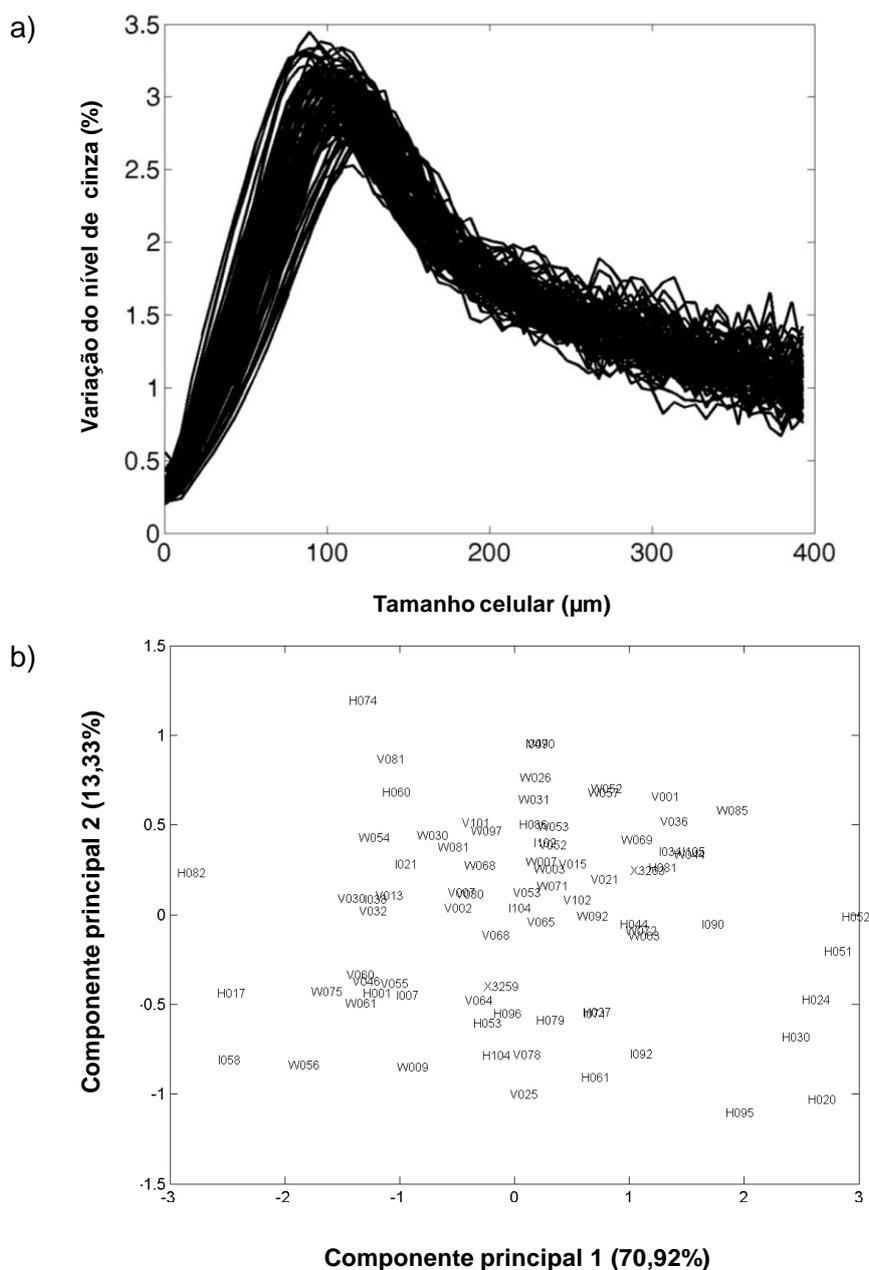
APÊNDICE G - Definição dos principais atributos sensoriais (ALLAN-WOJTAS et al., 2003; GALVEZ-LOPEZ, 2011).

Atributo	Definição
Firmeza	Força requerida para morder o fruto
Crocância	Crocância da primeira mordida, mais a quantidade de barulho desta mordida com os dentes da frente
Suculência	Quantidade de suco liberado pela polpa do fruto
Consistência	Força requerida para mastigar a polpa da maçã
Granulosidade	Percepção física da presença de grãos
Fibrosidade	Percepção física da presença de fibras
Farinosidade	Percepção da polpa seca e farinosa

APÊNDICE H - QTL localizado com marcadores moleculares em maçã: Distribuição do valor de LOD para o caráter “crocância” ao longo do grupo de ligação LG1. Observe o pico do valor de LOD próximo ao marcador KA4b_M, apresentando forte evidência para a presença de QTL associado ao controle do caráter nesta região.



APÊNDICE I – Distribuição do tamanho celular da progênie HIVW colhida no ano de 2011, no estágio de maturação ótimo após dois meses em armazenamento a 1,5° C e 80% de umidade relativa. a) Curvas granulométricas resultantes da análise das imagens através de procedimentos morfológicos matemáticos, onde cada curva representa a média do tamanho das células por genótipo. b) Análise de componentes principais das curvas granulométricas.



ANEXOS

ANEXO A - Artigo I publicado na revista Postharvest Biology and Technology

Postharvest Biology and Technology 86 (2013) 230–239



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Postharvest Biology and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/postharvbio

UV-C effect on ethylene, polyamines and the regulation of tomato fruit ripening



Aline Tiecher, Luciane Arantes de Paula, Fábio Clasen Chaves*, Cesar Valmor Rombaldi

UFPe/FAEM, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, C. P. 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 1 February 2013
Accepted 6 July 2013

Keywords:
Solanum lycopersicum
Abiotic stress
Ethylene
1-Methylcyclopropene
Polyamine

ABSTRACT

Molecular responses of tomato fruit harvested at the breaker ripening stage treated with UV-C (3.7 kJ/m²) and 1-methylcyclopropene (1-MCP; 2 μL/L) both separately and in combination, were evaluated postharvest until fruit reached fully ripe stage. Metabolite content and transcript accumulation of selected genes were examined in both the exocarp and mesocarp tissues of tomato fruit. UV-C radiation induced ethylene production but delayed red color development. As expected, 1-MCP inhibited ethylene production, color development and loss of flesh firmness. UV-C treatment delayed degreening and carotenoid accumulation when compared to control fruit. In addition, polyamine content of UV-C treated fruit was higher than in untreated tomatoes. In general, the studied genes had increased transcript accumulation one day after UV-C treatment and the mesocarp showed higher gene expression than the exocarp. 1-MCP prevented transcript accumulation of almost all genes on either the exocarp or mesocarp one day after treatments. The 1-MCP+UV-C induction of total carotenoid accumulation suggested that UV-C induction of total carotenoid accumulation is a partially ethylene dependent event, since 1-MCP alone inhibited accumulation and UV-C alone induced accumulation. Chlorophyll degradation was also partially ethylene dependent. 1-MCP prevented degradation, but control and UV-C treated fruit had high chlorophyll degradation while 1-MCP+UV-C treated fruit showed chlorophyll degradation higher than in 1-MCP alone and lower than in UV-C alone. The results suggest that UV-C slows down ripening, despite ethylene production stimulation, with molecular changes more pronounced in the mesocarp than the exocarp, and changes limited to phytochemical content, which may be influenced by the increased polyamine content.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Climacteric fruit such as tomatoes (*Solanum lycopersicum* Mill.) are characterized by continued ripening after harvest, with increased respiratory rates and ethylene production (Picton et al., 1993; Cara and Giovannoni, 2008). Postharvest changes in gene expression affect sensory attributes and may contribute to improving fruit nutritional and functional quality. Chlorophyll degradation and carotenoid biosynthesis in tomatoes result in easily perceived degreening and reddening (Barsan et al., 2010). Carotenoids, including lycopene, phytoene, β-carotene, lutein and zeaxanthin and phenolics including caffeic, p-coumaric, and chlorogenic acids, in addition to naringerin, quercetin, rutin and kaempferol, vary with genotype (George et al., 2004), cultivation conditions (Cogo et al., 2011), maturation stage (Severo et al., 2011), and storage conditions (Bravo et al., 2012). Furthermore, the biosynthesis of these

specialized metabolites is induced by moderate abiotic stresses (Charles et al., 2008a,b; Liu et al., 2009; Jagadeesh et al., 2011).

UV-C radiation (100–280 nm) has been shown to reduce pathogen inoculum and promote accumulation of specialized metabolites (Maharaj et al., 1999; Charles et al., 2008a,b). For example, UV-C treatment induced synthesis of phenolic compounds in strawberry (Erkan et al., 2008) and in tomato (Jagadeesh et al., 2011; Bravo et al., 2012). Pombo et al. (2011) demonstrated that prevention of strawberry rot by UV-C application is associated with activation of defense genes encoding β-1,3-glucanases, chitinases, peroxidases, and phenylalanine ammonia lyase. Charles et al. (2008a,b) demonstrated UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato, and Barka (2001) observed increased activity of antioxidant enzymes in tomatoes exposed to UV-C radiation. Moreover, Liu et al. (2009) and Bravo et al. (2012) found higher lycopene contents in tomatoes treated with UV-C and Stevens et al. (1998) observed higher polyamine contents in UV-C treated tomatoes. An increase in polyamine (putrescine and spermine) content after UV-C treatment was found in mangoes and apples (González-Aguilar et al., 2001; Kondo et al., 2011). Overall, UV-C can contribute to increased fruit and vegetable storability and quality by three

* Corresponding author. Tel.: +55 53 32757258; fax: +55 53 32757258.
E-mail address: fabio.chaves@ufpel.edu.br (F.C. Chaves).

major ways: reducing pathogen inoculum (Marquenie et al., 2002), inducing PR proteins (thaumatin-like, glucanases, chitinases, others) and/or specific metabolites involved in systemic plant defense (Charles et al., 2008a,b; Pombo et al., 2011), and/or by changing hormonal signaling, altering the ripening process and metabolite accumulation (Stevens et al., 1998; Maharaj et al., 1999). Postharvest UV-C treatment of fruit and vegetables, therefore, has the potential to become a technological alternative to improve conservation. The application of hormetic doses of UV-C cannot only improve storage potential, but also increase nutritional and functional properties of fruit and vegetables.

This investigation focused on understanding gene transcript accumulation and biochemical responses to hormetic doses of UV-C applied to tomatoes cv. Flavortop. The hypothesis was that stress caused by UV-C could result initially in higher molecular responses in the exocarp than the mesocarp, activating metabolic pathways involved in protection of cell homeostasis, and preventing senescence despite an increase in ethylene production.

2. Materials and methods

2.1. Plant material, treatments and storage conditions

Tomatoes (*S. lycopersicum* cv. Flavortop) were cultivated in a greenhouse at Universidade Federal de Pelotas, in Pelotas, RS. Fruit were harvested in January 2011, at the breaker ripening stage. Only defect-free fruit were used. Fruit were on average 2 cm long, 2.5 cm in diameter and 5.5 g in weight. Approximately 15 min after harvest, fruit were treated with UV-C light. Fruit were placed 60 cm distant from the bulbs and during 16 min received 3.7 kJ/m² of radiation. The treatment conditions were based on previous reports (Maharaj et al., 1999; Charles et al., 2008a,b) and exploratory tests, using UV-C doses ranging from 0 to 6.0 kJ/m². Every 4 min, fruit were turned 180° to allow for all the fruit surface to be evenly irradiated. The radiation source consisted of four germicidal bulbs (Phillips® 30 W), emitting light at 254 nm. Radiation intensity was determined using a digital UV light meter (RS-232 Modelo MRUR-203, Instrutherm®). Knowing that UV-C treatment induces ethylene synthesis, and that this hormone could interfere in the responses to UV-C, a 1-methylcyclopropene (1-MCP – Smartfresh®, containing 0.34% of the active ingredient) treatment was designed to evaluate UV-C impact without the influence of ethylene. The ethylene action inhibitor 1-MCP is known for its ability to extend shelf-life, through fruit firmness maintenance, delaying carotenoid accumulation, reducing respiration rate and ethylene production (Blankenship and Dole, 2003; Guillén et al., 2006; Cliff et al., 2009). In order to block the ethylene action, an elevated concentration of 1-MCP (2 µL/L) was applied during 24 h at room temperature (RT, 23 ± 2 °C, with RH of 80–85%). Treatments consisted of fruit without UV-C or 1-MCP application (control), UV-C application at 3.7 kJ/m², 1-MCP application at 2 µL/L for 24 h, and a combined 1-MCP + UV-C application under the same conditions used when applied separately. For the combined treatment, UV-C was applied 24 h after the 1-MCP application. After treatments, fruit were stored in plastic trays in the dark at RT.

For the molecular and biochemical analyses, seeds and locular jelly were discarded and exocarp and mesocarp tissues were evaluated separately. Ethylene production, color and fruit firmness were determined on whole fruit.

Samples were taken at harvest, one and seven days after treatments and when fruit were fully ripe (FR). Control fruit reached the fully ripe stage in seven days, UV-C treated fruit in 10 days, 1-MCP and 1-MCP + UV-C treated fruit in 14 days.

2.2. Ethylene production

40 g of fruit were enclosed in 80 mL polypropylene flasks. One hour later, 1 mL of the headspace was sampled with a hypodermic syringe needle. Ethylene was quantified by GC-FID according to Girardi et al. (2005) and results were expressed in nL/g/h. Ethylene production was monitored over 14 days.

2.3. Flesh firmness

Flesh firmness was determined in the equatorial region of each fruit using a texture meter (Texture Analyzer, TA.XT plus, Stable Micro Systems Texture Technologies®), with a 2 mm (diameter) probe. Fruit were pierced up to 25% depth at 1 mm s⁻¹. Results were expressed in Newtons (N).

2.4. Exocarp color

Color was measured with a colorimeter (Minolta Chromometer Modelo CR 300, D65, Osaka, Japan), using a 8 mm opening standard CIE-L*a*b*. Hue angle (Hue°) was calculated using the formula $\text{Hue}^\circ = \arctan(b^*/a^*)$. Measurements were performed on opposite sides of each fruit at the equatorial region.

2.5. Chlorophyll content

Tomato (1 g fw) was finely ground in liquid nitrogen, suspended in 5 mL acetone (80%, v/v), stirred for 15 min and filtered. The filtrate was centrifuged at 10,000 × g for 10 min and the supernatant brought to 25 mL with the acetone solution. Optical density was measured at 647 nm and 663 nm in an UV/vis spectrophotometer. Total chlorophyll content was determined using the equations described by Lichtenthaler (1987) and expressed in mg 100 g⁻¹ fw.

2.6. Carotenoid content

Carotenoids were extracted with acetone, partitioned into petroleum ether and saponified with methanolic KOH (10%), according to Rodriguez-Amaya (2001). Total carotenoid content was measured at 450 nm in a spectrophotometer, and expressed as mg of β-carotene per 100 g fw.

Individual carotenoids were quantified using a high performance liquid chromatograph (HPLC) equipped with a UV/vis detector set at 450 nm, a CLC-GODS (5 mm, 2 mm × 4 mm, Supelco) guard column and a RP-18 CLC-ODS (5 mm, 4.6 mm × 150 mm, Shimadzu) reverse-phase column. Separation was performed using a gradient elution system with mobile phases: methanol (solvent A), acetonitrile (solvent B), and ethyl acetate (solvent C), starting at 30:70 (A:B), reaching 10:80:10 in 10 min, 5:80:15 in 35 min and returning to the initial condition after 10 more minutes, at a flow rate of 1 mL min⁻¹. Peaks were identified by retention time comparison to standards and quantified using an external calibration curve for lycopene, phytoene, β-carotene, lutein, and zeaxanthin (Sigma–Aldrich) standards. Individual carotenoid content were expressed as mg 100 g⁻¹ fw.

2.7. Phenolic content

Tomato (1 g fw) finely ground in liquid nitrogen was suspended in 20 mL of methanol and stirred for 3 h at 23 °C in the dark, and then centrifuged for 15 min at 12,000 × g. Total phenolic content was determined using Folin–Ciocalteu reagent according to Singleton and Rossi (1965). Optical density was measured at 765 nm after a 2 h incubation at 25 °C. Results were expressed in gallic acid equivalents (mg 100 g⁻¹ fw).

Individual phenolic compounds were quantified in the same HPLC system described previously and the UV detector was set at 280 nm. The elution gradient was: solvent A (water and acetic acid; 99:1) and solvent B (methanol), starting at 100% A, going to 60% A in 25 min, maintaining this proportion for two more minutes, then to 95% A in 37 min, and maintaining this proportion for 5 min and a re-equilibration time of 3 min. Flow rate was set as 0.9 mL/min. Identification of phenolic compounds was performed by comparison of their retention time and UV spectra with those from standards *p*-coumaric, caffeic, chlorogenic, quercetin, kaempferol, naringerin, *cis*-resveratrol and *trans*-resveratrol (Sigma–Aldrich). Results were expressed as mg 100 g⁻¹ fw.

2.8. Polyamine content

Polyamine extraction and quantification was carried out following Vieira et al. (2007) with minor changes. Polyamines were extracted with trichloroacetic acid (5% in water) and analyzed by HPLC separated in a C18 column (30 cm × 3.9 mm i.d. × 10 μm, Waters). Polyamine analyses used an elution gradient program in which mobile phase A was acetate buffer (0.1 M) containing 1-octanesulfonic sodium salt (10 mM), adjusted to pH 4.9 with acetic acid and eluent B was acetonitrile, at a flow rate of 0.7 mL min⁻¹. After separation, the amines were derivatized with *o*-phthalaldehyde (OPA) and detected fluorometrically at 340 nm excitation and 445 nm emission. Results were expressed as mg 100 g⁻¹ fw.

2.9. RNA extraction, cDNA synthesis and real time PCR (qPCR)

RNA extraction using PureLink™ Plant Reagent (Invitrogen) was followed by DNase I™ (Invitrogen) digestion. cDNA was synthesized from RNA (2 μg) using SuperScript III RT™ (Invitrogen), according to manufacturer instructions. qPCR reactions were performed in a 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems), using cDNA (1 μL; diluted 5×) and 2 mM of forward and reverse primers, using SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) in a total volume of 20 μL. Samples were placed in 96-well plates. qPCR reaction parameters were: 50 °C, for 2 min; 95 °C, for 10-min; 40 cycles of three stages, 95 °C, for 30 s; 57 °C, for 1 min; and 72 °C, for 1 min. Final extension at 72 °C, for 5 min, was followed by the standard dissociation curve to verify primer specificity. Tomato nucleotide sequences were obtained from the Sol Genomics Network (<http://solgenomics.net>) and the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), using Vector™ NTI Advance™ 10 (Invitrogen) for gene-specific primer design (Table 1). Gene choice was based on metabolic pathways expected to be affected by treatments and matched physiological and biochemical analyses: ethylene production, fatty acid biosynthesis, carotenoid biosynthesis, phenolic compound biosynthesis, antioxidant enzymes and cell wall metabolism. Primer selection criteria was as follows: size between 18 and 20 bp; annealing temperature between 60 and 65 °C; percent CG bases between 40 and 60%; average size of amplified fragments 50 and 150 bp; not more than two C or G bases among the last five nucleotides at the 3' end. Amplification efficiency of each primer was calculated as follows: $E = (10^{(-1/slope)} - 1) \times 100$. For each sample, the Ct value (threshold cycle) was obtained and relative expression was calculated as follows: $ER = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Results were analyzed using EASE Expression Analysis Systematic Explorer Ver. 4.6 and Multi Experimental Viewer (MeV) software. Untreated tomatoes at harvest were used as baseline correction.

2.10. Experimental design and statistical analysis

The experiment was set in completely randomized design (4 × 4), constituted of four treatments evaluated at harvest, at day one and day seven after treatments, and when fruit reached a fully ripe stage (FR). The experimental unit was constituted of 480 fruit, with three biological replicates and three analytical replicates. Data was verified for normality using Shapiro–Wilks' test and for homoscedasticity using Hartley's test, and submitted to an ANOVA ($p \leq 0.05$). Effects of treatments were evaluated using Tukey's test ($p \leq 0.05$) (Sas Institute, 2002).

3. Results

3.1. Ethylene

UV-C radiation promoted ethylene production, on average twice as high as in untreated fruit (Fig. 1A). In addition, while control fruit had concluded the climacteric in 7 days, UV-C treated fruit after 7 days storage still had elevated ethylene production (~20 nL/g/h), which indicated that fruit were not completely ripe (confirmed by visual examination, Fig. 1B). 1-MCP treatment inhibited ethylene and delayed ripening. UV-C treatment after 1-MCP application (1-MCP+UV-C) was unable to induce the ethylene production observed for UV-C treatment without 1-MCP.

3.2. Flesh firmness and fruit color

Flesh firmness decreased in fruit from all treatments though much less in 1-MCP and 1-MCP+UV-C treated fruit (Fig. 2A). More specifically, the highest firmness was retained in the 1-MCP treated fruit, followed by 1-MCP+UV-C, UV-C and untreated (control) fruit. Degreening and reddenning increased over time as fruit ripened; accordingly, Hue angle values went down. UV-C treated fruit had higher Hue° values 7 days after treatment when compared to untreated control fruit. These changes meant that UV-C treated fruit were greener and less red than control fruit. 1-MCP and 1-MCP+UV-C treated fruit stayed green longer. Fruit evaluated when fully ripe (FR) (7 days for control fruit, 10 days for UV-C treated and 14 days for 1-MCP and 1-MCP+UV-C) showed similar behavior concerning color and firmness (Fig. 2A and B).

3.3. Chlorophyll

Total chlorophyll content decreased during ripening after treatments in both exocarp and mesocarp tissues (Table 2). The major decrease occurred in the exocarp of control fruit, going from 5.07 mg 100 g⁻¹ to 0.40 mg 100 g⁻¹ after seven days. Similar changes were observed in UV-C treated fruit after 10 days, indicating that this treatment contributes to chlorophyll degradation. 1-MCP delayed chlorophyll degradation but UV-C application following 1-MCP was able to overcome the 1-MCP effect and induced chlorophyll degradation in the exocarp only. 1-MCP effect on the mesocarp was unaltered by UV-C application. On average, chlorophyll content was lower in the mesocarp than the exocarp.

3.4. Carotenoids

Total carotenoid content increased during storage in all fruit both in the exocarp and mesocarp (Table 2). At 7 days after treatments, control and UV-C treated fruit had higher total carotenoid contents than 1-MCP and 1-MCP+UV-C treated fruit, both in the exocarp and the mesocarp. Total carotenoid contents in the exocarp were three to five times higher than in the mesocarp. At the fully ripe stage (FR), 1-MCP+UV-C treated fruit had higher

Table 1
Primers sequences used for quantitative real-time PCR of target genes.

Gene	Access #	Primer sequences	
		Forward	Reverse
Ethylene biosynthesis			
1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid synthase (ACCS)	SGN-U567978	GAGCCAGGGTGGTTCCGAGT	GAATCCTCGGAGCGCAATA
1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase (ACCO)	SGN-U579104	CGACACCGAGTGATGGCTGAA	GAAATGATGGCTCACCAGCAG
Fatty acids biosynthesis			
Acetyl-CoA carboxylase A (<i>accA</i>)	GI 225315532	GTGGTGACATGCTGATCCGTA	GGAAGCCCAAGTTTTCGGAA
Acetyl-CoA carboxylase D (<i>accD</i>)	ID 9284	TGCCGAACCCAATGCCTACAT	TCAGCTGCTGTGAACCTCGG
Carotenoid biosynthesis			
Phytoene synthase (<i>PSY</i>)	GI 120969569	GCAGGCAGCCTTGGTGAAGA	CAAGCCCAAATCCCCGGA
ζ -carotene desaturase (<i>ZDS</i>)	SGN-U568537	TCGGGGCCAAAGCTGAAA	TCGACATGCTCGAAGCCC
Lycopene β -cyclase (<i>LYC-B</i>)	GI 150014714	TGGTTCATCCATCCACCGGT	TGGCATTGGCAACAACAGGA
β -carotene hydroxylase (<i>CRTTB</i>)	SGN-U568606	TTGGCCGAGATGGGCACAC	TGGCCAAAACGTCGTTCCAGC
Phenolic compounds biosynthesis			
Phenylalanine ammonia lyase (<i>PAL</i>)	GI 30687012	CCGGTCGTCCTCAATCCAAA	ATCCAACCGCCGTGCATT
Chalcone synthase (<i>CHS</i>)	SGN-U579222	TGGATTTGGGCTGGGCTT	AGCCAGCCCACTAAGCAGC
Flavonol synthase (<i>FLS</i>)	GI 225321931	ATGGAGGCAGCTGGTGTGAA	CAGGCTTGGACATGGTGATA
Antioxidant enzymes			
Ascorbate peroxidase (<i>APX</i>)	SGN-U578449	TGGACCCCAATCCCCTTA	GGCATCTTATCCGCAGCAT
Catalase (<i>CAT</i>)	SGN-U578839	GCCACGGACCAAGGATCTT	CCTCGGGGTCCATTGTTTGG
Superoxide dismutase (<i>SOD</i>)	SGN-U581590	AGGCCGTCGCCGCTCTTA	CCAAGGGATGGACATGGAA
Cell wall metabolism			
Polygalacturonase (<i>PG</i>)	SGN-U577266	TGGGCCAGGCCATGGTATAA	ACCCAGAACCACCCTGCCA
Endogenous control			
Actin (<i>ACT</i>)	GI 47105122	GTCGGAATGGGACAGAAGGAT	ACAGGGTGTCTCAGGAGCAA

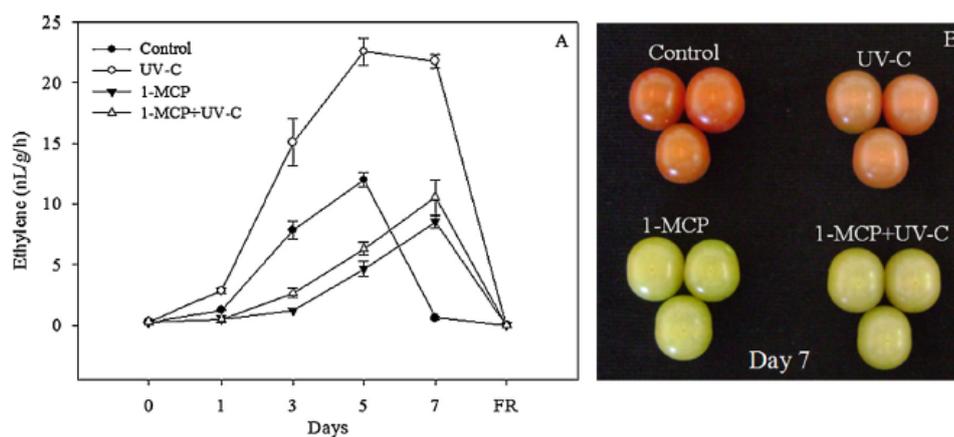


Fig. 1. Ethylene production (A) and visual aspect (B) of Flavortop tomatoes stored at $23 \pm 2^\circ\text{C}$ after treatments. Vertical bars represent the standard deviation. FR, fully ripe.

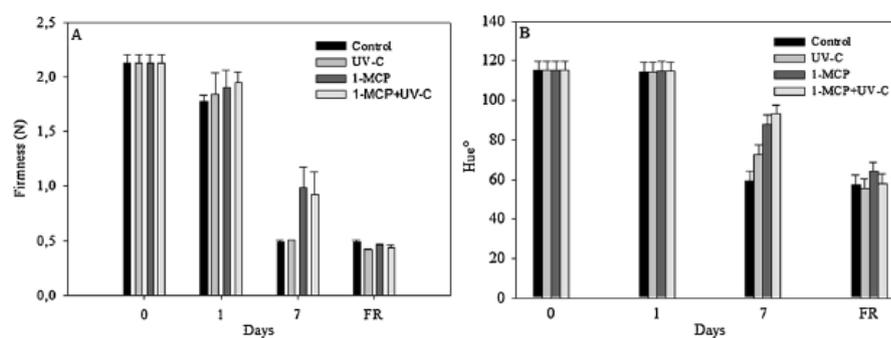


Fig. 2. Flesh firmness (A) and Hue° (B) of Flavortop tomatoes stored at $23 \pm 2^\circ\text{C}$ after treatments. Vertical bars represent the standard deviation. FR, fully ripe.

Table 2
Total chlorophyll, total carotenoid and total phenolic content ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) in exocarp and mesocarp tissues of Flavortop tomatoes stored at $23 \pm 2^\circ \text{C}$ after treatments.

Treatments	Days			
	0	1	7	FR ^b
Total chlorophyll				
Exocarp				
Control	5.07 aA ^a	4.80 aA	0.40 cB	0.40 aB
UV-C	5.07 aA	4.77 aA	0.90 cB	0.33 aC
1-MCP	5.07 aA	4.73 aA	2.77 aB	0.26 aC
1-MCP+UV-C	5.07 aA	4.60 aA	1.57 bB	0.37 aC
Mesocarp				
Control	2.93 aA	2.63 aA	0.15 bB	0.15 aB
UV-C	2.93 aA	2.60 aA	0.60 bB	0.16 aB
1-MCP	2.93 aA	2.77 aA	1.93 aB	0.20 aC
1-MCP+UV-C	2.93 aA	2.83 aA	1.80 aB	0.20 aC
Total carotenoid				
Exocarp				
Control	1.49 aB	1.59 aB	18.16 aA	18.16 aA
UV-C	1.49 aB	1.50 aB	13.08 aA	17.05 aA
1-MCP	1.49 aB	0.89 aB	6.21 bA	6.22 bA
1-MCP+UV-C	1.49 aB	2.00 aB	5.55 bA	12.54 aA
Mesocarp				
Control	1.80 aB	1.06 aB	6.65 aA	6.65 bA
UV-C	1.80 aC	1.28 aC	4.60 aA	7.26 abA
1-MCP	1.80 aB	0.44 aB	1.48 bA	3.29 cA
1-MCP+UV-C	1.80 aB	0.30 aB	1.76 bA	9.33 aA
Total phenolic				
Exocarp				
Control	81.49 aB	98.51 aB	170.54 aA	170.54 aA
UV-C	81.49 aB	101.51 aB	120.78 bB	195.30 aA
1-MCP	81.49 aB	78.24 aB	182.45 aA	167.43 aA
1-MCP+UV-C	81.49 aB	70.77 aB	151.55 abA	152.17 aA
Mesocarp				
Control	66.98 aA	66.90 aA	65.52 aA	65.70 aA
UV-C	66.98 aA	73.82 aA	71.92 aA	72.02 aA
1-MCP	66.98 aA	71.92 aA	70.06 aA	72.11 aA
1-MCP+UV-C	66.98 aA	73.41 aA	75.45 aA	73.57 aA

^a Means followed by the same small caps letter in a column or by the same tall caps letter in a row do not differ using Tukey's test ($p \leq 0.05$).

^b FR, fully ripe.

accumulation of total carotenoids than from the 1-MCP treatment in the mesocarp and exocarp.

Individual carotenoids (lycopene, β -carotene and phytoene) increased over time in all fruit during storage (Fig. 3), except for lutein+zeaxanthin, which decreased in all treatments. UV-C, 1-MCP and 1-MCP+UV-C treatments retarded individual carotenoid accumulation when compared to control fruit. This effect was clearly observed at seven days after treatments for both exocarp and mesocarp. When fruit reached the fully ripe stage, though it took longer for 1-MCP treated fruit to reach maturity, they all had the same lycopene, β -carotene and phytoene levels in the exocarp. In the mesocarp however, 1-MCP treated fruit never reached the lycopene, β -carotene and phytoene contents of the others. Lutein+zeaxanthin contents in 1-MCP treated fruit did not vary from controls, while UV-C treated fruit either alone or in combination with 1-MCP had even lower lutein+zeaxanthin contents. Taken together, total chlorophyll and carotenoid contents (Table 2) explain the observed color changes (Fig. 2B).

3.5. Phenolic compounds

Total phenolic contents increased over time in all treatments in exocarp tissues (Table 2). Treatments showed limited effect on total phenolic contents. Only UV-C treated fruit at seven days after harvest had lower total phenolic contents. When comparing fruit at the fully ripe stage, there was no difference between treatments for the phenolic contents. In the mesocarp, no significant differences were observed among treatments, among sampling times, or

for the interaction sampling time versus treatment. Major phenolic compounds in tomato fruit include chlorogenic acid, coumaric acid, caffeic acid, quercetin and naringenin (Fig. 4). Chlorogenic acid was the predominant phenolic acid identified in the exocarp and mesocarp of tomatoes. 1-MCP treated fruit had the highest chlorogenic acid content when fully ripe and at seven days after treatments. Caffeic acid and coumaric acid in general declined during fruit ripening. Quercetin was the most abundant flavonoid in tomato fruit and peaked at FR, particularly in UV-C treated fruit. Similar results were observed for naringenin.

3.6. Polyamines

Putrescine and spermidine predominated in immature fruit and polyamine contents decreased as ripening advanced. UV-C delivered the highest putrescine and spermidine accumulation. 1-MCP and 1-MCP+UV-C treated fruit maintained higher polyamine contents during ripening when compared to untreated controls (Fig. 5). Exocarp and mesocarp tissues showed similar responses to treatments.

3.7. Transcript accumulation

Tomato mesocarp tissue had overall higher transcript accumulation than the exocarp for all tested genes at all times examined. One day after UV-C treatment, most exocarp (9/15) and mesocarp (11/15) genes were upregulated while 1-MCP treatment had the opposite effect and did not upregulate any of the tested exocarp (15/15) and most of mesocarp (11/15) genes (Fig. 6).

ACCS transcripts were high in both exocarp and mesocarp tissues in fruit from all treatments most of the time except for control fruit at harvest, 1-MCP and 1-MCP+UV-C treated fruit one day after treatments. ACCO expression was generally unaltered in the exocarp independent of treatments. In the mesocarp however, ACCO followed the same expression pattern of ACCS, and was upregulated in all fruit except for control fruit at harvest, and in 1-MCP and 1-MCP+UV-C treated fruit one day after treatments. UV-C treated fruit were the only ones where ACCS and ACCO expression was upregulated one day after treatments (Fig. 6).

UV-C resulted in higher relative transcript accumulation of *accA* (nuclear encoded gene), both in the exocarp as well as in the mesocarp as soon as one day after treatments; in the following days, accumulation dropped. *accD* (plastid encoded gene) remained unaltered for all fruit in the exocarp. In the mesocarp however, responses occurred later, with transcript accumulation peaking seven days after treatments (Fig. 6).

Carotenoid synthesis genes *ZDS*, *LCY-B* and *CRTRB* were generally unresponsive to treatments in exocarp tissues while *PSY* showed upregulation in all treatments. In the mesocarp however, all carotenoid synthesis genes *PSY*, *ZDS*, *LCY-B* and *CRTRB* showed upregulation upon treatments when compared to control fruit. At times for instance, transcript accumulation profile of these genes in the mesocarp did not follow a clear trend with instances of up and down regulation over time (Fig. 6).

Transcript levels of phenolic compound associated genes in the exocarp were not affected by any of the treatments. However, in the mesocarp, increased transcript accumulation was observed. For all treated fruit, *PAL* transcripts were upregulated at all times. *FLS* transcripts were induced by UV-C, 1-MCP, and their combination, only seven days after treatments. *CHS* transcripts responded to UV-C, more so when ethylene was inhibited after 1-MCP treatment (Fig. 6).

Among *SOD*, *CAT*, and *APX*, encoding antioxidant enzymes, only *CAT* and *APX* were rapidly upregulated by UV-C in the exocarp. In the mesocarp however, UV-C induced *SOD* transcript accumulation one and seven days after treatments and when fruit were fully

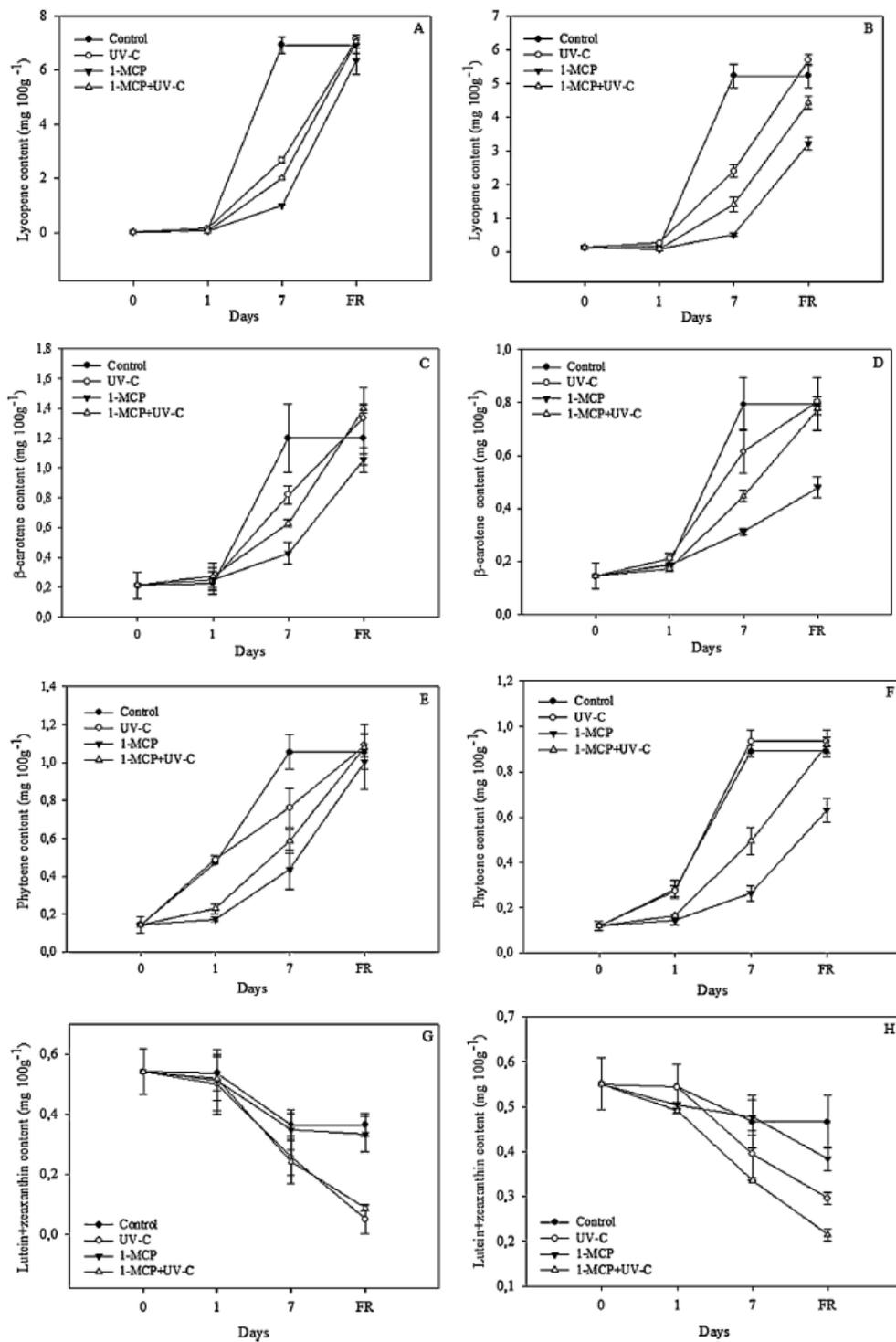


Fig. 3. Lycopene, β -carotene, phytoene and lutein + zeaxanthin contents (mg 100 g⁻¹) in exocarp (A, C, E and G) and mesocarp (B, D, F and H) tissues of Flavortop tomatoes stored at 23 \pm 2 °C after treatments. Vertical bars represent the standard deviation. FR, fully ripe.

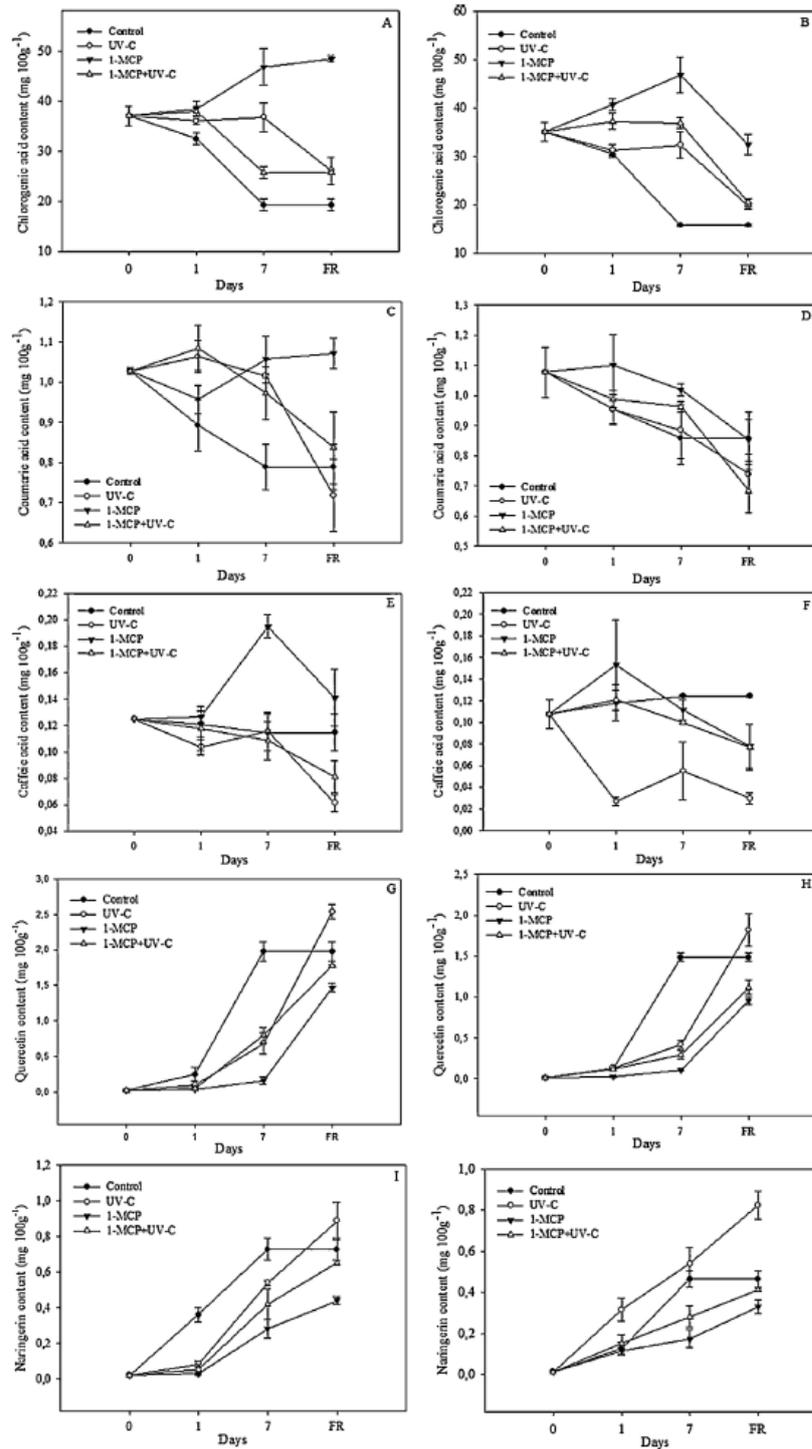


Fig. 4. Chlorogenic acid, coumaric acid, caffeic acid, quercetin and naringenin contents (mg 100g⁻¹) in exocarp (A, C, E, G and I) and mesocarp (B, D, F, H and J) tissues of Flavortop tomatoes stored at 23 ± 2 °C after treatments. Vertical bars represent the standard deviation. FR, fully ripe.

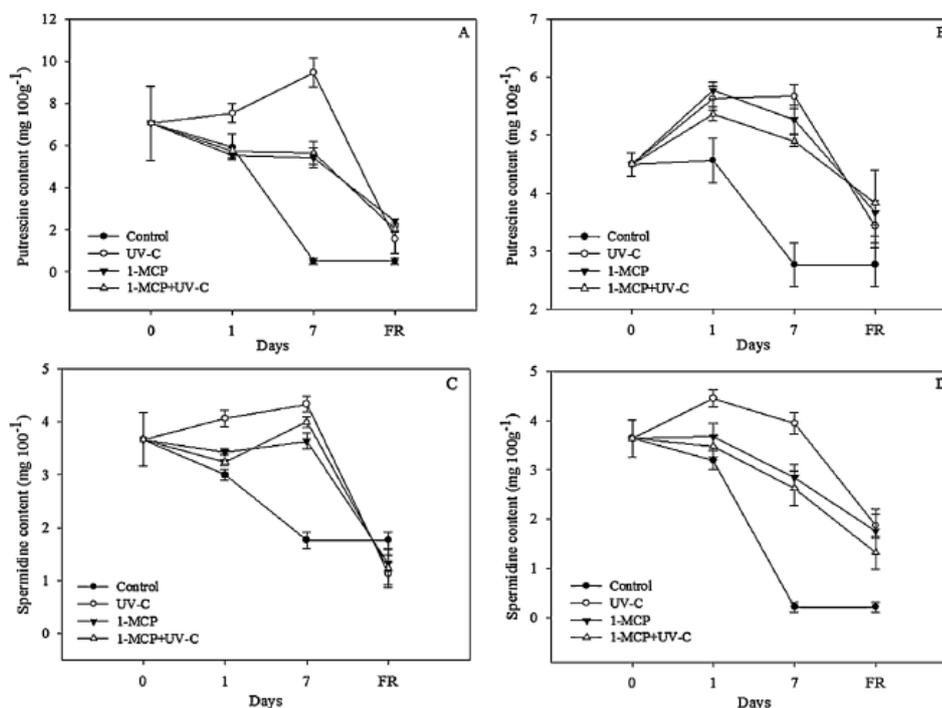


Fig. 5. Putrescine and spermidine contents (mg 100g⁻¹) in exocarp (A and C) and mesocarp (B and D) tissues of Flavortop tomatoes stored for seven days at 23 ± 2 °C after treatments. Vertical bars represent the standard deviation, FR, fully ripe.

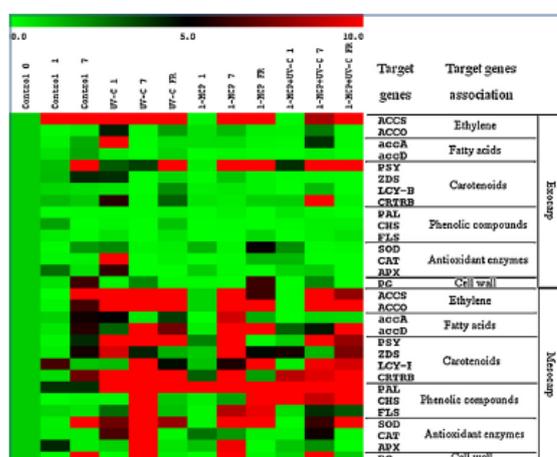


Fig. 6. Relative transcript accumulation of genes encoding enzymes associated with ethylene production, fatty acids biosynthesis, carotenoid biosynthesis, phenolic compound biosynthesis, antioxidant enzymes and cell wall metabolism in exocarp and mesocarp tissue samples of tomatoes cv. Flavortop stored at 23 ± 2 °C after treatments. Samples were collected at 1, and 7 days after treatment and when fully ripe. Transcript level is represented on a 0–10 scale using Multi Experiment Viewer software (TIGR MeV). Green color on the left represents minimal expression, black color in the middle of the scale represents transcription level 5 times higher than green and red color represents the maximum transcription observed, 10 times higher than green. Mesocarp. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

ripe. Upregulation at seven days and when fruit were fully ripe also occurred in fruit from other treatments, therefore its expression was independent of treatments. *CAT* relative transcript accumulation also increased with UV-C treatment, otherwise remaining unaltered. *APX* transcript accumulation peaked only in the mesocarp of UV-C and of 1-MCP treated fruit seven days after treatments (Fig. 6).

In the exocarp of fully ripe control fruit and 1-MCP treated fruit, only *PG* transcripts were upregulated, about five times higher than baseline expression represented by control fruit expression at harvest. In the mesocarp, *PG* transcripts were upregulated in fruit from all treatments seven days after treatments (Fig. 6).

4. Discussion

The positive correlation between the increase in ethylene production and tomato ripening is widely known (Picton et al., 1993; Cara and Giovannoni, 2008). Biotic and abiotic stresses, in addition to ripening stage, are factors affecting ethylene production (Wang et al., 2002). UV-C, known to be a strong oxidant stressor (Charles et al., 2008a) when applied to Flavortop tomatoes induced an increase in ethylene production (Fig. 1A). González-Aguilar et al. (2004) also observed an increase in respiration rates and ethylene production in peaches treated with different UV-C doses. However, this is not a general rule. For example, Stevens et al. (1998) and Maharaj et al. (1999) observed reduction of ethylene production in tomatoes treated with UV-C radiation. In Flavortop tomatoes the ethylene production increased after UV-C treatment and this physiological response was preceded by an increase in *ACCS* and *ACCO* genes involved in ethylene biosynthesis (Fig. 6), one day after the onset of the treatments. Yet in contrast,

this treatment contributed to the slowing down of color change (Fig. 1B).

Butelli et al. (2008) found that changing MYB (DNA-binding domain) expression in tomatoes however, stimulated ethylene delayed ripening. In addition, Shama and Alderson (2005) observed that the stress caused by UV radiation activated the biosynthesis of potentially ripening retarding polyamines. According to Mehta et al. (2002), polyamine super-expression in tomato, besides stimulating ethylene production, results in increased phytochemical content and extended shelf-life. UV-C treated Flavortop tomatoes had delayed ripening and increased putrescine and spermidine contents (Fig. 5), in agreement with previous reports by Stevens et al. (1998), Maharaj et al. (1999) and Mehta et al. (2002) in tomatoes, and González-Aguilar et al. (2001) in mangoes. Although present, spermine was below the limits of quantitation. Putrescine and spermidine contents on the other hand, were elevated upon treatments (Fig. 5). Although these findings are not sufficient to answer whether the increase in polyamines is a cause or consequence, it is safe to infer that this increase is involved in ripening control. On the other hand, Tassoni et al. (2006) stated that tomato ripening is strictly associated with ethylene without the involvement of polyamines, which in turn can only extend fruit shelf-life at the mature stage prior to senescence. Thus, it is possible that increased polyamine accumulation in UV-C treated tomatoes could act as a senescence retardant (Saftner and Baldi, 1990).

Fruit color changes were the most marked effect of the UV-C treatment. Control fruit were fully ripe seven days after harvest while UV-C treated fruit became fully ripe only 10 days after harvest. 1-MCP, as expected, delayed reddening even further; it was not until 14 days after harvest that fruit became fully ripe. Fruit from the combined treatment 1-MCP+UV-C, took the same amount of time as 1-MCP treated fruit to become fully ripe. Color change, including chlorophyll degradation and carotenoid synthesis, is tightly associated with the chloroplast transition to chromoplasts, which are regulated by ethylene (Kahlau and Bock, 2008; Barsan et al., 2010).

When carotenoid biosynthesis genes are activated, a consequent accumulation of these metabolites and in turn a color change is expected. In this study, while UV-C treated tomatoes showed accumulation of transcripts of ethylene biosynthesis genes *ACCs* and *ACCO*, and of carotenoid biosynthesis genes *PSY*, *ZDS* and *LCY-B* (Fig. 6), it did not result in more carotenoid accumulation when compared to untreated tomatoes (Table 2). A direct relationship between transcriptional events and physiological response was not observed, indicating that posttranscriptional events took place. Carotenoid content matched color development but did not follow carotenoid gene transcript profiles. When comparing fruit at seven days after harvest, control and UV-C treated fruit showed the highest carotenoid content. 1-MCP treatment inhibited total carotenoid accumulation (Table 2) including lycopene, the major carotenoid present in tomato fruit (Fig. 5A and B). Total carotenoid content was also evaluated when fruit from each treatment reached the fully ripe stage, completely red (FR), since at seven days after treatments, fruit were at different maturation stages. In this case, while fruit were all apparently fully red with similar Hue^a values, total carotenoid content was higher in the exocarp of control, UV-C, and 1-MCP+UV-C treated fruit when compared to those treated with 1-MCP; suggesting that carotenoid accumulation is a partially ethylene dependent event since 1-MCP+UV-C treated fruit had low ethylene production but accumulated high carotenoid content. Chlorophyll degradation is also partially ethylene dependent. 1-MCP prevented degradation but control and UV-C treated fruit had high chlorophyll degradation while 1-MCP+UV-C treated fruit showed chlorophyll degradation higher than in 1-MCP alone and lower than in UV-C alone.

In general, although phenolic compound associated genes remained unaltered upon treatments and over time, total phenolic content increased in the exocarp of all fruit from all treatments. On the other hand, *PAL* was upregulated in the mesocarp tissue of fruit from all treatments (Fig. 6), which explains the general elevated total phenolic contents found. No differential response to UV-C or 1-MCP was observed. It is possible that other complex phenolic compounds not evaluated in this work, such as tannins (Bialczyk et al., 1999), lignin and suberin (Charles et al., 2008a), could have been affected.

In Flavortop tomatoes UV-C treatment did not contribute to flesh firmness preservation. Confirming an already widely known fact, 1-MCP treatment contributed to maintaining flesh firmness in tomato (Jeong et al., 2002). However, expression of *PG*, a gene known to be involved in tomato softening (Maharaj et al., 1999), was up regulated in 1-MCP treated fruit (Fig. 6). It is important to consider that flesh firmness changes in tomato are somewhat complex, and in some cases there is no direct relation between *PG* expression and changes in firmness. For example, in transgenic plants in which *PG* was silenced and respective mRNAs were practically undetectable, reduced enzyme activity was observed but the fruit still showed reduced flesh firmness (Smith et al., 1990). Thus, UV-C acts more in color (degreening and reddening) than in firmness changes.

Once a stress is perceived there are signaling activations, particularly those associated with defense pathways, prior to the physiological response (Knight and Knight, 2001). Among the signals, there is activation of genes associated with quenching of reactive oxygen species (Barka, 2001; Erkan et al., 2008). Twenty-four hours after UV-C treatment, tomato fruit showed a slight increase in *SOD*, *CAT* and *APX* transcript accumulation in the exocarp while in the mesocarp a higher mRNA accumulation of *SOD* and *CAT* (Fig. 6) was observed, indicating that UV-C radiation acts as an oxidative stress upregulating genes coding for antioxidant enzymes. Recently, Jiang et al. (2010) also observed an increased activity of antioxidant enzymes *CAT*, *SOD*, *APX* and *GR* in shiitake mushrooms treated with UV-C after harvest.

In conclusion, although UV-C treatment did not represent a favorable alternative to prevent flesh softening, it retarded color changes despite inducing ethylene production. Transcript profiles revealed an induction of expression of most of the studied genes after UV-C application one day after the onset of the treatments, and despite being a surface acting treatment the highest transcript accumulation occurred in the mesocarp of the fruit. The 1-MCP+UV-C induction of total carotenoid accumulation suggested that UV-C induction of total carotenoid accumulation is a partially ethylene dependent event since 1-MCP alone inhibited accumulation and UV-C alone induced accumulation. Chlorophyll degradation is also partially ethylene dependent. 1-MCP prevented degradation but control and UV-C treated fruit had high chlorophyll degradation while 1-MCP+UV-C treated fruit showed chlorophyll degradation higher than in 1-MCP alone and lower than in UV-C alone. Since ethylene promotes ripening, it was expected that an increase in ethylene production would be followed by an increase in carotenoid content; however this was not seen. These findings are in agreement with those from Picton et al. (1993), who showed that transgenic tomatoes with suppressed ethylene production still produced lycopene and that ethylene supply did not recover lycopene content of non-transformed fruit, showing that ethylene dependent, partially dependent and independent events coexist. In general, total phenolics increased during storage in the exocarp and were not affected by treatments. However, a decrease was observed for the main phenolic acids. Since there is an apparent contradiction in the fact that UV-C stimulates ethylene production but delays ripening, it was hypothesized that this fact could be associated with the synthesis of antioxidant molecules such as

carotenoids and phenolic compounds. However, the results seen here did not confirm this hypothesis. It was then hypothesized that other events were involved with the delayed ripening; perhaps UV stress could be activating polyamine biosynthesis. Indeed, an increase in polyamines occurred in UV-C treated tomatoes, suggesting a possible relationship between these molecules and ripening change. However, new studies overexpressing or suppressing the synthesis of these molecules will be needed to prove this proposition.

Acknowledgements

To CAPES, FAPERGS (11/0733-0) and CNPq (301206/2010-4, 4700204/2011-7, and 470705/2012-4) for financial support and scholarships.

References

- Barka, E.A., 2001. Protective enzymes against reactive oxygen species during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits in response to low amounts of UV-C. *Aust. J. Plant Physiol.* 28, 785–791.
- Barsan, C., Sanchez-Bel, P., Rombaldi, C.V., Egea, I., Rossignol, M., Kuntz, M., 2010. Characteristics of the tomato chromoplast revealed by proteomic analysis. *J. Exp. Bot.* 61, 2413–2431.
- Bialczyk, J., Lechowski, Z., Libik, A., 1999. The protective action of tannins against glasshouse whitefly in tomato seedlings. *J. Agri. Sci.* 133, 197–201.
- Blankenship, S.M., Dole, J.M., 2003. 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biol. Technol.* 28, 1–25.
- Bravo, S., García-Alonso, J., Martín-Pozuelo, G., Gómez, V., Santaella, M., Navarro-González, I., et al., 2012. The influence of post-harvest UV-C hormesis on lycopene, β -carotene, and phenolic content and antioxidant activity of breaker tomatoes. *Food Res. Int.* 49, 296–302.
- Butelli, E., Titta, L., Giorgio, M., Mock, H.P., Matros, A., Peterek, S., et al., 2008. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nat. Biotechnol.* 26, 1301–1308.
- Cara, B., Giovannoni, J.J., 2008. Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. *Plant Sci.* 175, 106–113.
- Charles, M.T., Benhamou, N., Arul, J., 2008a. Physiological basis of UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit IV. Biochemical modification of structural barriers. *Postharvest Biol. Technol.* 47, 41–53.
- Charles, M.T., Mercier, J., Makhoul, J., Arul, J., 2008b. Physiological basis of UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit I. Role of pre- and post-challenge accumulation of the phytoalexin-rishitin. *Postharvest Biol. Technol.* 47, 10–20.
- Cliff, M., Lok, S., Lu, C., Toivonen, P.M.A., 2009. Effect of 1-methylcyclopropene on the sensory, visual, and analytical quality of greenhouse tomatoes. *Postharvest Biol. Technol.* 53, 11–15.
- Cogo, S.L.P., Chaves, F.C., Schirmer, M.A., Zambiasi, R.C., Nora, L., Silva, J.A., et al., 2011. Low soil water content during growth contributes to preservation of green colour and bioactive compounds of cold-stored broccoli (*Brassica oleracea* L.) florets. *Postharvest Biol. Technol.* 60, 158–163.
- Erkan, M., Wang, S.Y., Wang, C.Y., 2008. Effect of UV treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme and decay in strawberries fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 48, 163–171.
- George, B., Kaur, C., Khurdiya, D.S., Kapoor, H.C., 2004. Antioxidants in tomato (*Lycopersicon esculentum*) as a function of genotype. *Food Chem.* 84, 45–51.
- Girardi, C.L., Corrent, A.R., Lucchetta, L., Zanuzo, M.R., Da Costa, T.S., Brackmann, A., et al., 2005. Effect of ethylene, intermittent warming and controlled atmosphere on postharvest quality and the occurrence of woolliness in peach (*Prunus persica* cv. Chiripá) during cold storage. *Postharvest Biol. Technol.* 38, 25–33.
- González-Aguilar, G.A., Wang, C.Y., Buta, J.G., Krizek, D.T., 2001. Use of UV-C irradiation to prevent decay and maintain postharvest quality of ripe 'Tommy Atkins' mangoes. *Int. J. Food Sci. Technol.* 36, 767–773.
- González-Aguilar, G.A., Wang, C.Y., Buta, G.J., 2004. UV-C irradiation reduces breakdown and chilling injury of peaches during cold storage. *J. Sci. Food Agr.* 84, 415–422.
- Guillén, F., Castillo, S., Zapata, P.J., Martínez-Romero, D., Valero, D., Serrano, M., 2006. Efficacy of 1-MCP treatment in tomato fruit 2. Effect of cultivar and ripening stage at harvest. *Postharvest Biol. Technol.* 42, 235–242.
- Jagadeesh, S.L., Charles, M.T., Garipey, Y., Goyette, B., Raghavan, G.S., Vigneault, C., 2011. Influence of postharvest UV-C hormesis on the bioactive components of tomato during post-treatment handling. *Food Bioprocess Technol.* 4, 1463–1472.
- Jeong, J., Huber, D.J., Sargent, S.A., 2002. Influence of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on ripening and cell-wall matrix polysaccharides of avocado (*Persea americana*) fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 25, 241–256.
- Jiang, T., Jahangir, M.M., Jiang, Z., Lu, X., Ying, T., 2010. Influence of UV-C treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activity and texture of postharvest shiitake (*Lentinus edodes*) mushrooms during storage. *Postharvest Biol. Technol.* 56, 209–215.
- Kahlau, S., Bock, R., 2008. Plastid transcriptomics and translomics of tomato fruit development and chloroplast-to-chromoplast differentiation: chromoplast gene expression largely serves the production of a single protein. *Plant Cell* 20, 856–874.
- Knight, H., Knight, M.R., 2001. Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.* 6, 262–267.
- Kondo, S., Fiebig, A., Okawa, K., Ohara, H., Kowitcharoen, L., Nimitkeatkai, H., et al., 2011. Jasmonic acid, polyamine, and antioxidant levels in apple seedling as affected by Ultraviolet-C irradiation. *Plant Growth Regul.* 64, 83–89.
- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids—pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148, 350–382.
- Livak, K.J.L., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25, 402–408.
- Liu, L.H., Zabarar, D., Bennett, L.E., Aguas, P., Woonton, B.W., 2009. Effects of UV-C, red light and sun light on the carotenoid content and physical qualities of tomatoes during post-harvest storage. *Food Chem.* 115, 495–500.
- Maharaj, R., Arul, J., Nadeau, P., 1999. Effect of photochemical treatment in the preservation of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Capello) by delaying senescence. *Postharvest Biol. Technol.* 15, 13–23.
- Marquenie, D., Lammertyn, J., Geeraerd, A.H., Soontjens, C., Van Impe, J.F., Nicolai, B.M., et al., 2002. Inactivation of conidia of *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructigena* using UV-C and heat treatment. *Int. J. Food Microbiol.* 74, 27–35.
- Mehta, R.A., Cassol, T., Li, N., Handa, A.K., Mattoo, A.K., 2002. Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life. *Nature Biotechnol.* 20, 613–618.
- Picton, S., Barton, S.L., Bouzayen, M., Hamilton, A.J., Grierson, D., 1993. Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene. *Plant J.* 3, 469–481.
- Pombo, M.A., Rosli, H.G., Martínez, G.A., Civello, M., 2011. UV-C treatment affects the expression and activity of defense genes in strawberry fruit (*Fragaria × ananassa* Duch.). *Postharvest Biol. Technol.* 59, 94–102.
- Rodríguez-Amaya, D., 2001. A Guide to Carotenoid Analysis in Foods. ILSI Press, Washington.
- Saftner, R.A., Baldi, B.G., 1990. Polyamine levels and tomato fruit development: possible interaction with ethylene. *Plant Physiol.* 92, 547–550.
- SAS Institute, 2002. Statistical Analysis System 9.1 for Windows. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Severo, J., Techer, A., Chaves, F.C., Silva, J.A., Rombaldi, C.V., 2011. Gene transcript accumulation associated with physiological and chemical changes during developmental stages of strawberry cv. Camarosa. *Food Chem.* 126, 995–1000.
- Stevens, C., Liu, J., Khan, V.A., Lu, J.Y., Wilson, C.L., Iowegbe, E.C.K., et al., 1998. Application of hormetic UV-C for delayed ripening and reduction of *Rhizopus* soft rot in tomatoes: the effect of tomatine on storage rot development. *J. Phytopathol.* 146, 211–221.
- Shama, G., Alderson, P., 2005. UV hormesis in fruits: a concept ripe for commercialization. *Trends Food Sci. Technol.* 16, 128–136.
- Singleton, L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158.
- Smith, C.J.S., Watson, C.F., Morris, C., Bird, C.R., Seymour, G.B., Gray, J.E., et al., 1990. Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. *Plant Mol. Biol.* 14, 369–379.
- Tassoni, A., Watkins, C.B., Davies, P.J., 2006. Inhibition of the ethylene response by 1-MCP in tomato suggests that polyamines are not involved in delaying ripening, but may moderate the rate of ripening or over-ripening. *J. Exp. Bot.* 57, 3313–3325.
- Vieira, S.M., Theodoro, K.H., Glória, M.B., 2007. Profile and levels of bioactive amines in orange juice and orange soft drink. *Food Chem.* 100, 895–903.
- Wang, K.L.-C., Li, H., Ecker, J.R., 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*, S131–S151.