

## Área: Ciência de Alimentos

# ATUAÇÃO DOS GENES *MDFLA2*, *MDUDP* E *MDCOBRA* NA MANUTENÇÃO DA PAREDE CELULAR DE MAÇÃS DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO REGULAR E CONTROLADO

**Camila Francine Paes Nunes\*, Isadora Rubin de Oliveira, Tatiane Timm Storch, Cesar Valmor Rombaldi, Fábio Clasen Chaves, César Luis Girardi**

*Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas, Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia 'Eliseu Maciel', Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS*

*\*E-mail: camilafpnunes@gmail.com*

**RESUMO** – A maçã é um fruto suscetível a alterações nos atributos sensoriais durante a pós-colheita. Para evitar modificações na firmeza os frutos são armazenados sob refrigeração em atmosfera regular (AR) ou controlada (AC) combinadas a aplicação de 1-metilciclopropeno (1-MCP). As alterações nos frutos durante a maturação são coordenadas por genes que codificam para enzimas relacionadas a degradação e expansão da parede celular. No entanto, ainda não está esclarecido quais enzimas são as responsáveis pela manutenção da firmeza em maçãs durante o armazenamento. O objetivo do estudo foi verificar se o *MdFLA2*, *MdUDP* e *MdCOBRA* participam da manutenção da firmeza em maçãs tratadas com 1-MCP e armazenadas em AR e AC. Após o armazenamento os frutos foram colocados a 25 °C por sete dias, para simular condições da prateleira. Foram realizadas análises de firmeza e quantificação relativa do acúmulo de transcritos. Frutos tratados ou não com 1-MCP, que não foram armazenados sob refrigeração, não apresentaram redução da firmeza, assim como os armazenados em AC por 180 dias. No armazenamento AR apenas frutos tratados com 1-MCP não apresentaram perda de firmeza. Os genes *MdFLA2*, *MdUDP* e *MdCOBRA* tiveram maior acúmulo transcricional quando os frutos receberam o tratamento com 1-MCP, este resultado só não foi observado para AR 180 dias, onde os frutos controle que apresentaram maior acúmulo transcricional. O *MdFLA2*, *MdUDP* e *MdCOBRA* possivelmente desempenham um papel importante na manutenção da firmeza em maçãs na presença do 1-MCP antes do período de armazenamento refrigerado e após o armazenamento de seis meses em AC.

**Palavras-chave:** *Malus x domestica*, Maxigala, 1-metilciclopropeno, expressão transcricional, firmeza de polpa.

## 1 INTRODUÇÃO

A macieira (*Malus x domestica*) é uma frutífera de clima temperado de origem na Europa e na Ásia introduzida recentemente em Fraiburgo, Santa Catarina com mudas vindas da França e atualmente produzida em

larga escala no sul do Brasil (ABPM, 2018). Dentre as variedades cultivadas no país, a cv. Gala e seus clones tem uma elevada aceitação em virtude das suas qualidades sensoriais, como alta firmeza de polpa, crocância, suculência, coloração da epiderme bastante avermelhada e sabor levemente ácido (THEWES et al., 2015). A firmeza de polpa é considerada um dos principais atributos sensoriais em maçãs, pois ela é um indicador do estágio de maturação em que o fruto se encontra (GWANPUA et al., 2014). Para ampliar o período de conservação e dispor de maçãs ao longo do ano os frutos são armazenados sob refrigeração (0°C) em condições de atmosfera regular (AR) ou atmosfera controlada (AC) (MAZZURANA et al., 2016). A AC utiliza baixas concentrações de O<sub>2</sub> com concentrações mais elevadas de CO<sub>2</sub> que favorecem a redução da respiração e da produção de etileno, proporcionando frutos com maior firmeza de polpa (GWANPUA et al., 2014; MAZZURANA et al., 2016). Associado a essas condições de armazenamento é feita a aplicação de 1-metilciclopropeno (1-MCP), um potente inibidor da ação do etileno que contribui para prolongar o tempo de armazenamento que pode ser de até seis meses (BRACKMANN et al., 2010).

A firmeza de polpa dos frutos pode estar relacionada com a composição da parede celular, que é altamente complexa. Os principais componentes da parede (pectina e hemicelulose) podem sofrer solubilização e despolimerização que ocasionam o amolecimento da polpa dos frutos durante a maturação (GWANPUA et al., 2014). Estas alterações são coordenadas por enzimas de degradação e expansão de parede como poligalacturonases, β-galactosidasas, pectato liases, arabinofuranosidasas, pectina metilesterases e expansinas (CAO et al., 2012; GWANPUA et al., 2016). As alterações na parede celular nas primeiras fases do desenvolvimento do fruto são reguladas por genes de biossíntese, que catalisam a transferência de moléculas de açúcar e participam da formação dos componentes da pectina e da hemicelulose (CAO et al., 2012). Durante a pós-colheita ainda não está bem esclarecido o que acontece com estes genes e suas respectivas proteínas. É possível que genes codificadores de enzimas envolvidas na rota de biossíntese de açúcares da parede celular também participem na preservação e manutenção da textura da maçã em resposta à aplicação de 1-MCP sob armazenamento refrigerado em atmosfera regular e atmosfera controlada. Com isso, o objetivo deste trabalho foi verificar se os genes codificadores das enzimas de biossíntese de parede celular *MdFLA2*, *MdUDP* e *MdCOBRA* participam da manutenção da firmeza em maçãs cv. Gala durante o armazenamento prolongado em atmosferas regular e controlada após tratamento com 1-metilciclopropeno.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas maçãs ‘Gala’ (*Malus x domestica*), clone Maxigala (porta-enxerto M9) colhidas em fevereiro de 2014, no pomar da empresa Schio Agropecuária Ltda, situada no município de Vacaria Brasil, RS. Após a colheita, as maçãs foram transportadas em caixas plásticas até o laboratório de pós-colheita da Embrapa Uva e Vinho, sede Bento Gonçalves/RS, onde foram divididas em dois grupos, cada um com aproximadamente 100kg de frutos. O primeiro grupo foi tratado com uma solução 1-MCP (SmartFresh™) de 1ppm (1μL L<sup>-1</sup>). Posteriormente, os frutos foram acondicionados em caixas plásticas de 140L, por 24h e mantidos à 0°C. O segundo grupo não recebeu tratamento com 1-MCP (grupo controle), mas foi submetido às mesmas condições. Após a aplicação do 1-MCP os frutos com e sem 1-MCP foram armazenados sob refrigeração (0°C) em atmosfera regular - AR (90% umidade relativa) e atmosfera controlada - AC (1% de O<sub>2</sub> e 2% de CO<sub>2</sub>) por 180 dias. Os frutos

controles e os tratados com 1-MCP foram amostrados no tempo zero (colheita) e após 180 dias. Em ambos os casos os frutos foram acondicionados a temperatura de 25 °C, durante sete dias, para a simulação do *shelf-life*, e somente após esse período foram realizadas as análises de firmeza de polpa e de acúmulo de transcritos.

A firmeza de polpa (FP) foi determinada utilizando penetrômetro automático (modelo P830075, Fruit Texture Analyser) com uma ponteira de 11mm. Para essa determinação foram utilizados 15 frutos por tratamento para cada momento de coleta de amostra e em cada um dos frutos foram realizadas 2 leituras, em lados equatorialmente opostos, sendo os resultados expressos em Newton (N).

Para a análise da expressão transcricional dos genes *MdFLA2* (MDP0000282305), *MdUDP* (MDP0000193220) e *MdCOBRA* (MDP0000094767) foi realizada a extração do RNA total, usando de 6g de polpa de um pool de nove maçãs maceradas e liofilizadas. Para a síntese de cDNA, foi utilizado 1,0µg de RNA total acrescentado de 1µL de DNase I (Invitrogen, MA, USA) e submetidos a transcrição reversa através do kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen), utilizando 1,0µL do iniciador de oligo dT. A partir dos cDNAs obtidos foi realizada a sua quantificação relativa (QR), que foi conduzida em equipamento StepOne™ Real Time PCR Systems (Life Technologies) (STORCH et al., 2015).

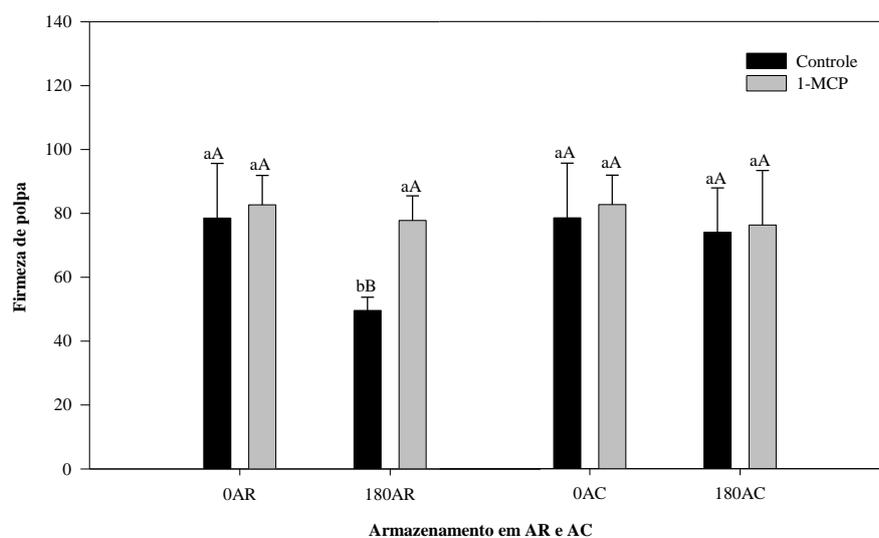
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando as maçãs se destinam ao armazenamento elas devem ser colhidas ainda imaturas com firmeza de polpa (FP) entre 75,5 e 84,5N (ALBERTI et al., 2016; GIRARDI et al., 2004). Neste trabalho os frutos apresentavam no momento da colheita uma FP ideal para o armazenamento de 81,9N.

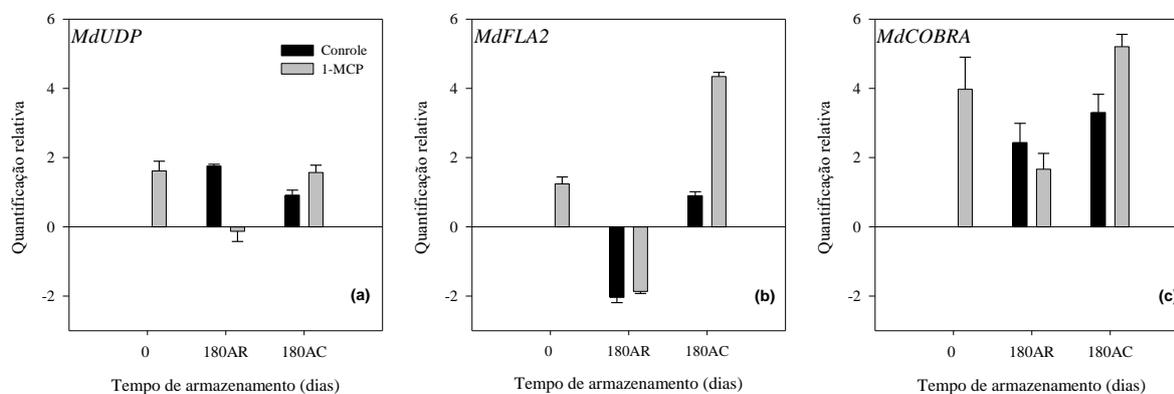
Após sete dias a temperatura ambiente frutos controle e tratados com 1-MCP que não passaram por armazenamento refrigerado não apresentavam diferença em relação a firmeza de polpa (Figura 1). No entanto os frutos tratados com 1-MCP apresentavam maior acúmulo de transcritos para os três genes estudados (Figura 2).

No armazenamento refrigerado por 180 dias sob atmosfera regular (AR) as maçãs tratadas com 1-MCP mantiveram a firmeza de polpa enquanto frutos não tratados apresentaram redução da firmeza de polpa (Figura 1). Frutos armazenados em atmosfera controlada (AC) não apresentaram diferença na firmeza de polpa (Figura 1). Portanto quando as maçãs são armazenadas sob controle de atmosfera não é necessário a aplicação do inibidor do hormônio etileno. Isto porque em AC a baixa concentração de O<sub>2</sub> e alta concentração de CO<sub>2</sub> em combinação com a temperatura de zero graus Celsius regulam reações oxidativas na polpa do fruto e reduzem a biossíntese de etileno e a atividade respiratória (BRACKMANN et al., 2010; GWANPUA, et al., 2012).

**Figura 1:** Efeito do tratamento com 1-MCP e do armazenamento por 180 dias em atmosfera regular (AR) e atmosfera controlada (AC) em maçãs ‘Gala’. Todos os frutos armazenados ou não foram colocados a 25 °C por sete dias. Os resultados são representados em média ± desvio padrão (n = 3). Médias acompanhadas de mesmas letras maiúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0.05) e comparam entre si frutos controle e tratados com 1-MCP dentro da mesma atmosfera testada. Médias acompanhadas de mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0.05) e comparam frutos armazenados por 180 dias com frutos não armazenados.



**Figura 2:** Expressão transcricional dos genes de biossíntese de parede celular *MdFLA2* (a), *MdUDP* (b) e *MdCOBRA* (c) em maçãs cv. ‘Gala’, clone Maxigala, tratadas e não tratadas com 1-MCP e armazenadas sob refrigeração por 180 dias em atmosfera regular (AR) e atmosfera controlada (AC), seguido de uma exposição à temperatura ambiente (TA) 25°C durante sete dias. Para os cálculos de quantificação relativa, foram utilizados resultados de expressão dos frutos controle do momento da colheita + 7 dias de exposição a TA como normalizador. Os resultados dos gráficos foram expressos em log 2.



Frutos não-tratados com 1-MCP armazenados em AR apresentaram aumento da expressão dos genes *MdUDP* e *MdCOBRA* e redução da expressão do gene *MdFLA2* quando comparados aos frutos controle não armazenados. Frutos tratados com 1-MCP e armazenados em AR tiveram redução na expressão relativa dos três genes estudados quando comparados com frutos tratados com 1-MCP e não armazenados (Figura 2).

Frutos tratados com 1-MCP e armazenados em AC apresentaram aumento da expressão relativa do gene *MdFLA2* enquanto *MdUDP* e *MdCOBRA* não diferiram em termos de acúmulo de transcritos em relação aos frutos tratados com 1-MCP não armazenados (Figura 2).

O aumento no acúmulo transcricional dos genes *MdFLA2*, *MdUDP* e *MdCOBRA* (Figura 2), que codificam para as enzimas envolvidas na rota de biossíntese dos componentes da parede celular, pode estar

relacionado com a manutenção da firmeza de polpa (Figura 1) dos frutos que foram tratados com 1-MCP e não receberam armazenamento refrigerado e para os que foram tratados e armazenados por seis meses em AC.

#### 4 CONCLUSÃO

Pode se concluir que a aplicação do inibidor do hormônio etileno se faz necessária para manter a firmeza dos frutos durante seis meses de armazenamento apenas quando não há controle da atmosfera gasosa. No entanto, também se observou uma possível relação da manutenção da firmeza de polpa com o aumento no acúmulo transcricional dos genes relacionados a biossíntese dos principais componentes de parede celular (*MdFLA2*, *MdUDP* e *MdCOBRA*), para as maçãs tratadas com 1-metilciclopropeno (1-MCP) que não receberam armazenamento refrigerado e para as que foram tratadas e armazenadas na presença de 1% de O<sub>2</sub> e 2% de CO<sub>2</sub>.

#### 5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à empresa Schio Agropecuária Ltda que disponibilizou os pomares de macieiras para a realização do experimento e à CAPES pela bolsa de doutorado e pós-doutorado pelo programa CAPES-Embrapa.

#### 6 REFERÊNCIAS

- ABPM – Brazilian Apple Growers and Exporters. Disponível em: <<http://www.brazilianappleexporters.com/>> Acesso em: 20 de mar. 2018.
- ALBERTI, A.; DOS SANTOS, T.M.; ZIELINSKI, A.A.F.; DOS SANTOS, C.M.E.; BRAGA, C.M.; DEMIATE, I.M.; NOGUEIRA, A. Impact on chemical profile in apple juice and cider made from unripe, ripe and senescent dessert varieties. **LWT-Food Science Technology**, v.65, p.436-443, 2016.
- BRACKMANN, A.; ANESE, RO.; PINTO, JAV.; BOTH, V.; VENTURINI, TL.; SCHORR, MRW. Application of 1-methylcyclopropene and ethylene absorption on 'Royal Gala' apple late harvested. **Ciência Rural**, v.40, n.10, p.2074-2080, 2010.
- CAO, Y.; TANG, X.; GIOVANNONI, J.; XIAO, F.; LIU, Y. Functional characterization of a tomato COBRA-like gene functioning in fruit development and ripening. **BMC Plant Biology**, v.12, n.1, p.211, 2012.
- GIRARDI, C.L.; NACHTIGALL, G.R., PARUSSOLO, A. **Fatores pré-colheita que interferem na qualidade da fruta**. C.L. Girardi (Ed.), Frutas do Brasil maçã pós-colheita, Embrapa Informação Tecnológica, Brasília (2004), pp. 24-34.
- GWANPUA, S.G.; VERLINDEN, B.E.; HERTOOG, M.L.A.T.M.; BULENS, I.; VAN DE POEL, B.; VAN IMPE, J.; NICOLAÏ, B.M.; GEERAERD, A.H. Kinetic modeling of firmness breakdown in 'Braeburn' apples stored under different controlled atmosphere conditions. **Postharvest Biology and Technology**, v.67, p.68-74, 2012.
- GWANPUA, S.G.; VAN B., S.; VERLINDEN, B.E.; CHRISTIAENS, S.; SHPIGELMAN, A.; VICENT, V.; KERMANI, Z.J.; NICOLAI, B.M.; HENDRICKX, M.; GEERAERD, A. Pectin modifications and the role of

pectin-degrading enzymes during postharvest softening of Jonagold apples. **Food Chemistry**. v.158, p.283-291, 2014.

GWANPUA, S.G.; MELLIDOU, I.; BOECKX, J.; KYOMUGASHO, C.; BESSEMANS, N.; VERLINDEN, B.E.; HERTOOG, MAARTEN L.A.T.M.; HENDRICKX, M.; NICOLAI, B.M.; GEERAERD, A.H. Expression analysis of candidate cell wall-related genes associated with changes in pectin biochemistry during postharvest apple softening. **Postharvest Biology and Technology**, v.112, p.176-185, 2016.

MAZZURANA, ER.; ARGENTA, LC.; DO AMARANTE, CASSANDRO VT.; STEFFENS, CA. Potential benefits of temperature increase during storage under controlled atmosphere of 'gala' apples treated with 1-MCP/Potenciais benefícios do aumento da temperatura de armazenagem em atmosfera controlada de macas 'gala' tratadas com 1-MCP1. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.38, n.1, p.43-53, 2016.

STORCH, TT.; FINATTO, T.; PEGORARO, C.; DAL CERO, J.; LAURENS, F.; ROMBALDI, CV.; QUECINI, V.; GIRARDI, CL. Ethylene-dependent regulation of an  $\alpha$ -l-arabinofuranosidase is associated to firmness loss in 'Gala' apples under long term cold storage. **Food Chemistry**, v.182, p.111-119, 2015.

THEWES, FR.; BOTH, V.; BRACKMANN, A.; WEBER, A.; DE OLIVEIRA ANESE, R. Dynamic controlled atmosphere and ultralow oxygen storage on 'Gala' mutants quality maintenance. **Food Chemistry**, v.188, p.62-70, 2015.