



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

THAIS ANDRADE GERMANO

**ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DE PEDÚNCULOS DE CAJU (*Anacardium
occidentale* L.) DURANTE O DESENVOLVIMENTO EM GENÓTIPOS
APRESENTANDO CORES E FIRMEZAS DIFERENTES**

FORTALEZA
2020

THAIS ANDRADE GERMANO

ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DE PEDÚNCULOS DE CAJU (*Anacardium occidentale*
L.) DURANTE O DESENVOLVIMENTO EM GENÓTIPOS APRESENTANDO CORES E
FIRMEZAS DIFERENTES

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial à
obtenção do título de doutor em Bioquímica.
Área de concentração: Bioquímica vegetal.

Orientador: Dr. José Hélio Costa

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- G323a Germano, Thais Andrade.
Análise transcriptômica de pedúnculos de caju (*Anacardium occidentale* L.) durante o desenvolvimento em genótipos apresentando cores e firmeza diferentes / Thais Andrade Germano. – 2020.
87 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Jose Helio Costa.
1. Pedúnculo. 2. Antocianinas. 3. Ontologia gênica. 4. Expressão diferencial. 5. Poligalacturonase. I. Título.

CDD 572

THAIS ANDRADE GERMANO

ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DE PEDÚNCULOS DE CAJU (*Anacardium occidentale*
L.) DURANTE O DESENVOLVIMENTO EM GENÓTIPOS APRESENTANDO CORES E
FIRMEZAS DIFERENTES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica vegetal.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Dr. José Hélio Costa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Maria Raquel Alcântara de Miranda
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Vânia Marilande Ceccatto
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dra. Mônica Maria Almeida Lopes
Instituto Centro de Ensino Tecnológico (Centec)

Dr. Mohibullhah Shah
Bahauddin Zakariya University

Dr. Vinicius Augusto Carvalho de Abreu
Universidade Federal do Pará (UFPA)

A Deus.

Aos meus pais, Simone e Ernani.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos durante o período do doutorado;

Ao CNPq, pelo suporte financeiro para realização do sequenciamento do transcriptoma de caju;

À Universidade Federal do Ceará, por toda minha formação acadêmica desde a graduação até o doutorado.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica, incluindo professores, funcionários e estudantes.

À EMBRAPA Agroindústria Tropical, por ter cedido os cajus para a realização do experimento, além de transporte para o campo experimental em Pacajus;

Ao Dr. José Hélio Costa, pela excelente orientação, apoio constante, incentivos e amizade. Sou muito grata por todos os conselhos e ensinamentos;

Ao Dr. Carlos Farley Herbster Moura, pelos relevantes ensinamentos sobre a fisiologia do caju, além da excelente orientação sobre a colheita dos mesmos;

À Dra. Maria Raquel Alcântara de Miranda, por ter me apresentado o mundo científico e contribuído na construção do alicerce para a minha caminhada durante o doutorado;

Aos participantes da banca examinadora, Dra. Vânia Marilande Ceccatto, Dra. Mônica Maria Almeida Lopes, Dr. Mohibullhah Shah e Dr. Vinicius Augusto Carvalho de Abreu pelas valiosas colaborações e sugestões;

Ao Matheus Finger Ramos de Oliveira, pelo apoio constante e dedicação durante a execução de todo o experimento, principalmente, nas análises de bioinformática;

Ao Clesivan Pereira dos Santos, por todas as orientações, contribuições e reflexões desde os primórdios até a conclusão do trabalho;

Ao Antonio Edson Rocha Oliveira, por todos conselhos, conversas e conhecimento compartilhado sobre bioinformática e escrita científica, principalmente;

À minha família, pelo apoio emocional e motivação que sempre me proporcionaram, não só ao longo deste doutorado como ao longo de toda a minha vida, além de serem exemplos de determinação, persistência e integridade;

Ao meu namorado e amigo Magnum Maciel, por toda compreensão, cumplicidade, motivação e paciência em todos os momentos;

Aos amigos do Laboratório de Genômica Funcional da UFC (André Luiz, Antônio Netto, Beatriz Lima, Dayane Manfrine, Karine Thiers, Lyndefânia Melo, Mathias

Coelho, Moacília Lemos, Rachel Alves, Susan Karen e Talita Batista) pela ótima convivência, presteza e disposição para ajudar sempre. Em especial, agradeço ao Shahid Aziz, pelo empenho na revisão do artigo científico, e à Kátia Daniella da Cruz Saraiva, pela disponibilidade e essencial orientação nas análises de PCR em tempo real. A todos eles, meu sincero obrigada pelo carinho que sempre demonstraram;

Aos amigos, pela troca de ideias, experiências, incentivo e compreensão;

À Dra. Maria Izabel Gallão, pela ótima recepção e confiança, além de permitir a execução de testes envolvendo a microscopia óptica em pedúnculos de caju. Eu me sinto sempre bem acolhida em seu laboratório;

Ao Marcos Aurélio Nunes da Silva Filho, pelo auxílio com a documentação necessária para o envio de amostras para sequenciamento do transcriptoma;

Aos colaboradores do campo experimental da EMBRAPA em Pacajus, em especial, ao Justino, pela atenção, paciência e auxílio durante a colheita dos cajus;

Aos integrantes do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia da UFC coordenado pela Dra. Vânia Maria Maciel Melo, especialmente às Dra. Mirella Leite Pereira e a Dra. Francisca Andrea da Silva Oliveira pela disponibilidade e presteza;

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Vegetal e do Laboratório de Pós-colheita dos Frutos da UFC, pela boa vontade em colaborar com a realização do experimento;

À todos que contribuíram de forma direta ou indireta para o desenvolvimento desse trabalho.

“A sabedoria começa na reflexão.”

Sócrates

RESUMO

O pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale* L.) apresenta grande importância econômica e social mundialmente, devido ao seu alto valor nutricional, além de sabor e aroma peculiares. Durante o seu amadurecimento, o pedúnculo apresenta rápida redução na firmeza e desenvolvimento de diferentes colorações da película, impactando na qualidade e aceitação dos pseudofrutos pelos consumidores. Embora muitos estudos discorram sobre a firmeza e coloração dos pedúnculos de caju, ainda são desconhecidos os mecanismos moleculares envolvidos nas alterações dessas características durante o desenvolvimento do fruto. Portanto, o objetivo desse estudo foi analisar o transcriptoma de pedúnculos de dois genótipos de caju (CCP 76 e BRS 265) com diferentes firmeza e coloração em dois estádios de desenvolvimento (imaturo e maduro), utilizando a técnica de RNA-Seq (sequenciamento do RNA). A partir dos resultados foi possível observar que a firmeza e o conteúdo de antocianinas dos pedúnculos reduziram durante o desenvolvimento de ambos os genótipos. Entretanto, os caju BRS 265 imaturo e maduro apresentaram maior firmeza e maior conteúdo de antocianinas do que o CCP 76 nos mesmos estádios de maturação. A análise de expressão diferencial revelou um total de 3.266 genes diferencialmente expressos (GDEs) entre caju BRS 265 imaturo e maduro, enquanto entre CCP 76 imaturo e maduro foram identificados 4.374 GDEs. Posteriormente, as análises de enriquecimento funcional dos GDEs demonstraram que os genótipos apresentaram respostas, principalmente, aos processos de redução de firmeza (catabolismo e biogênese de macromoléculas da parede celular) e desenvolvimento de coloração da película (biossíntese de flavonóides e fenilalanina) dos pedúnculos. Um total de 71 e 34 GDEs envolvidos no processo de amaciamento e na biossíntese de flavonóides foram identificados em caju, respectivamente. No geral, a diferença de firmeza entre os genótipos estudados poderia ser justificada pela regulação negativa de genes codificantes de expansina (EXP), bem como pela regulação positiva de genes codificantes de enzimas envolvidas na degradação da pectina [poligalacturonase (PG), pectatoliase (PL) e pectina acetiltransferase (PAE)] e na biossíntese da parede celular em caju CCP 76 (genótipo de pedúnculo mais macio). Já a coloração vermelha da película e o alto conteúdo de antocianinas em caju BRS 265 ainda imaturos poderiam ser associados a regulação positiva de genes codificantes de enzimas envolvidas na biossíntese de flavonóides [fenilalanina amônia liase (PAL), cinamato 4-hidroxilase (C4H) e chalcona sintase (CHS)] em relação aos caju CCP 76 no mesmo estágio de maturação. Por fim, seis GDEs envolvidos nos metabolismos de interesse desse estudo (firmeza e flavonóides) tiveram o seu padrão

transcricional validado pela reação em cadeia da polimerase via transcrição reversa quantitativa em tempo real (RT-qPCR). As informações oriundas desse estudo poderão fornecer subsídios para pesquisas futuras, visando a extensão da vida pós-colheita, bem como a qualidade de caju, agregando valor econômico a esse fruto.

Palavras-chave: Pedúnculo. Antocianinas. Ontologia gênica. Expressão diferencial. Poligalacturonase.

ABSTRACT

The cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) has great economic and social importance worldwide, due to its high nutritional value, in addition to its peculiar flavor and aroma. During its maturation, the peduncle shows a fast firmness reduction and development of different peel coloration, impacting the quality and acceptance of pseudofruit by consumers. Although many studies discuss about the firmness and color of the peduncles, the molecular mechanisms involved in the alterations of these characteristics during cashew development are still unknown. Therefore, the aim of this study was to analyze the peduncle transcriptome of two cashew apple genotypes (CCP 76 and BRS 265) with different firmness and color in two developmental stages (immature and mature), using the RNA-Seq technique (RNA sequencing). From the results, it was possible to observe reduced firmness and anthocyanin content in the peduncles during the development of both genotypes. However, the immature and mature BRS 265 cashew apples showed greater firmness and higher anthocyanin content than CCP 76 cashew apples at the same maturation stages. Differential expression analysis revealed a total of 3,266 differentially expressed genes (DEGs) between immature and mature BRS 265 cashew apples, while between immature and mature CCP 76 cashew apples, 4,374 DEGs were identified. Subsequently, the functional enrichment analysis of DEGs showed that the genotypes showed responses, mainly, to the softening process (catabolism and biogenesis of cell wall macromolecules) and development peel coloration (flavonoids and phenylalanine biosynthesis) of the peduncles. A total of 71 and 34 DEGs involved in the softening process and flavonoid biosynthesis were identified in cashew apple peduncle, respectively. In general, firmness difference between the studied genotypes could be justified by the down regulation of genes encoding expansin (EXP), as well as by the up regulation of genes encoding enzymes involved in the pectin degradation [polygalacturonase (PG), pectatoliase (PL) and pectin acetyltransferase (PAE)] and cell wall biosynthesis in CCP 76 cashew apple (softer peduncle). The red coloration peel and high anthocyanin content in immature BRS 265 cashew apple could be associated with the up regulation of genes encoding enzymes involved in the flavonoid biosynthesis [phenylalanine ammonia lyase (PAL), cinnamate-4-hydroxylase (C4H) and chalcone synthase (CHS)] compared to CCP 76 cashew apple at the same developmental stage. Finally, six DEGs involved in the metabolisms of interest in this study (firmness and flavonoids) had their transcriptional pattern validated by real time polymerase chain reaction (RT-qPCR). The information from this study may provide subsidies for future research, aiming at extending post-harvest life, as well as the quality of cashew apple

peduncle, adding economic value to this fruit.

Keywords: Peduncle. Anthocyanin. Gene ontology. Differential expression. Polygalacturonase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do caju	16
Figura 2 - Fases do desenvolvimento dos frutos: início da formação da polpa (1); término do crescimento em tamanho (2); início do período de consumo (3); período ótimo de consumo (4); predominância de reações catabólicas (5) e não utilizável para consumo (6)	19
Figura 3 - Escala subjetiva baseada na coloração externa do pedúnculo e da castanha para classificar os estádios de desenvolvimento do caju. Estádios: 1- castanha e pedúnculos verdes; 2- castanha madura e seca/ pedúnculo verde; 3- castanha madura e seca/ pedúnculo verde-claro; 4- castanha madura e seca, pedúnculo com início de coloração amarela (CCP 76) e laranja avermelhado (BRS 265); 5- castanha madura e seca/ pedúnculo amarelo com início de cor laranja (CCP 76) e laranja avermelhado com início de cor vermelha (BRS 265); 6- castanha madura e seca/pedúnculo laranja-claro (CCP 76) e vermelho-claro (BRS 265); 7- castanha madura e seca/ pedúnculo laranja-escuro (CCP 76) e vermelho-escuro (BRS 265)	22
Figura 4 - Estrutura da parede celular vegetal.....	23
Figura 5 - Mecanismo de ação das principais enzimas que atuam na degradação da pectina da parede celular. Pectinametilesterase (PME), pectina acetiltransferase (PAE), poligalacturonase (PG), pectatoliase (PL) ramnogalacturonanoliase (RGL) e β -galactosidase (β Gal)	24
Figura 6 - Estrutura química e representação das cores das principais antocianinas presentes na natureza.....	27
Figura 7 - Representação esquemática da via de biossíntese dos flavonóides	28
Figura 8 - Modelo da estrutura química do tanino condensado e de suas subunidades formadoras.....	30
Figura 9 - Número de sequências gênicas depositadas no <i>GenBank</i> e no <i>Whole Genome Sequencing</i> (WGS) desde 1982 até 2020.....	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	A cultura do cajueiro	16
2.1.1	<i>Importância socioeconômica</i>	16
2.1.2	<i>Desenvolvimento do pseudofruto</i>	18
2.1.2.1	<i>Firmeza</i>	22
2.1.2.2	<i>Coloração</i>	26
2.2	Abordagem transcriptômica aplicada a frutos	31
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo geral	34
3.2	Objetivos específicos	34
4	ARTIGO: TRANSCRIPTOME PROFILING OF CASHEW APPLES (<i>Anacardium occidentale</i> L.) GENOTYPES REVEALS SPECIFIC GENES LINKED TO FIRMNESS AND COLOR DURING PSEUDOFRUIT DEVELOPMENT	35
5	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS	79

1. INTRODUÇÃO

Fruto do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), o caju é constituído pela castanha (fruto verdadeiro) e pelo pseudofruto que é originado a partir do pedúnculo floral (MICHODJEHOUN-MESTRES *et al.*, 2009). A cultura do caju tem grande importância econômica e social para muitos países, principalmente, para o Brasil, mais especificamente para a região Nordeste, onde a cajucultura tornou-se atrativa e promissora devido às condições de clima e solo favoráveis do local (VIDAL, 2017; ICB, 2020). Além da importância comercial, o caju também tem se destacado devido aos avanços nas descobertas sobre as suas propriedades farmacológicas (CAVALCANTE *et al.*, 2003; KUBO *et al.*, 2003; BEEJMOHUN *et al.*, 2015; VASCONCELOS *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2020). Tal atividade biológica deve-se, principalmente, à capacidade antioxidante exercida pelos compostos bioativos presentes no mesmo, tais como vitamina C, polifenóis totais, flavonóides amarelos, carotenóides totais e antocianinas (LOPES *et al.*, 2012; SCHWEIGGERT *et al.*, 2016).

Os pedúnculos do caju podem ser utilizados na indústria, onde são processados para a fabricação de polpas, geléias, entre outros produtos; na alimentação animal e no consumo *in natura* (PROMMAJAK *et al.*, 2014). Embora, a maior parte da produção total de cajus seja destinada à comercialização *in natura*, os produtores de caju enfrentam grandes dificuldades ao enviar o pedúnculo a centros consumidores mais distantes (ASSUNÇÃO; MERCADANTE, 2003; MOURA *et al.*, 2010). A vida útil extremamente curta do pedúnculo, associada à rápida redução da firmeza resultam em perda a atratividade e da viabilidade para comercialização dos cajus.

Além da firmeza, a coloração da película possui fundamental importância na preferência do consumidor (CARIOCA *et al.*, 2003). Sua cor em cajus maduros pode variar do vermelho ao amarelo quando o caju está completamente desenvolvido. Recentemente SCHWEIGGERT *et al.* (2016) verificou que a coloração vermelha e alaranjada da película de alguns cajus tem sido atribuída, principalmente, ao conteúdo de antocianinas e carotenóides, respectivamente.

Durante o amadurecimento do caju, ocorre redução da firmeza e de adstringência, desenvolvimento de aroma e sabor típicos dos pedúnculos, além de mudança na cor da película (FIGUEIREDO *et al.*, 2002). Entretanto, o amaciamento do pedúnculo assim como o desenvolvimento da cor da película são processos influenciados pelo genótipo de caju. Pedúnculos do genótipo de caju BRS 265 apresentam película vermelha e polpa firme quando

maduros ao passo que pedúnculos de CCP 76 tornam-se mais macios e desenvolvem cor alaranjada na película (LOPES *et al.*, 2012).

No geral, a degradação da parede celular é considerada o principal fator responsável pelo amaciamento dos frutos (BRUMMELL, 2006). A despolimerização da matriz glicana e as modificações na pectina (solubilização e remoção de açúcares neutros das cadeias laterais) resultam na degradação da lamela média e, conseqüentemente, na reduzida adesão entre as células (PANIAGUA *et al.*, 2016). Já o acúmulo de antocianinas ocorre pela via de biossíntese dos flavonóides (JAAKOLA, 2013; LI, 2014). Além de cor, essa via produz alta quantidade de compostos antioxidantes (flavonóis) e relacionados com o sabor adstringente de caju (taninos condensados). Por fim, todas essas alterações decorrentes do amadurecimento envolvem a expressão coordenada de um grande conjunto de genes, justificando a necessidade de usar a abordagem transcriptômica para uma melhor compreensão desses metabolismos durante o desenvolvimento dos pedúnculos.

Apesar da importância socioeconômica e nutricional do caju, estudos moleculares com essa espécie ainda são escassos. E, embora muitos estudos discorram sobre a firmeza e o conteúdo de antocianinas em cajus (FIGUEIREDO *et al.*, 2001; LOPES *et al.*, 2011; SCHWEIGGERT *et al.*, 2016), ainda são desconhecidos os mecanismos moleculares que desencadeiam a redução da firmeza, além da transição para a coloração vermelha durante o amadurecimento desses frutos.

Portanto, neste estudo, a análise do transcriptoma associada à quantificação de antocianinas e firmeza objetiva fornecer a relação entre genótipo e fenótipo, destacando genes regulatórios envolvidos na cor e firmeza em pedúnculos durante o amadurecimento de caju. As informações oriundas desse estudo fornecerão uma base para estudos no campo da genômica funcional. Além disso, os genes selecionados serão importantes alvos de estudos posteriores para esclarecer sua real significância no controle dos metabolismos supracitados, resultando ao longo prazo, na melhoria da qualidade e na agregação de valor econômico aos frutos.

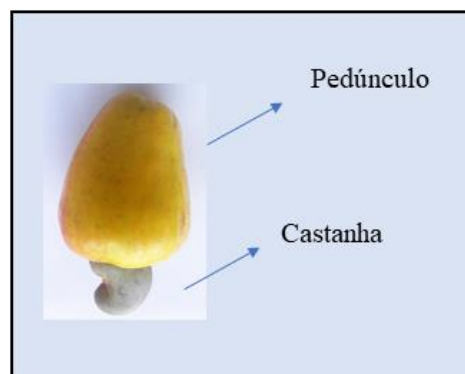
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura do cajueiro

2.1.1. Importância socioeconômica

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), planta nativa do Nordeste brasileiro, foi introduzido pelos portugueses na América (Central e Sul), no leste da África e mais tardiamente (século XV) na Índia, o que contribuiu para a dispersão dessa cultura (SAROJ *et al.*, 2014). O cajueiro pertence à ordem Sapindales e mais especificamente à família Anacardiaceae, a qual inclui a mangueira e o pistacheiro (SAVADI *et al.*, 2020). Seu verdadeiro fruto é a castanha, um aquênio seco e indeiscente, enquanto o pseudofruto é oriundo do desenvolvimento do pedúnculo floral, tecido fibroso coberto por uma fina epiderme que sustenta o fruto verdadeiro (figura 1) (MICHODJEHOUN-MESTRES *et al.*, 2009).

Figura 1 – Estrutura do caju.



Fonte: autor.

A cultura do cajueiro é a segunda mais importante na produção de castanhas mundialmente, apresentando crescente interesse econômico (SAVADI *et al.*, 2020). Em 2018, o Vietnã, a Índia e a Costa do Marfim foram os maiores produtores de castanha de caju, totalizando 4 milhões de toneladas. Atualmente, o Brasil é nono maior produtor de castanha com produção de 141 mil toneladas por ano (FAOSTAT, 2018). Esse fato pode ser justificado pela ocorrência da seca que castigou o semiárido brasileiro de 2012 a 2017, causando a redução no total de área colhida de caju no país (VIDAL, 2017).

No entanto, a cajucultura tem grande importância econômica para o Brasil. Em 2019, foram produzidas 139 mil toneladas de castanha em 428 mil hectares de área colhida no país (IBGE, 2019). Ainda em 2019, o Nordeste, somente, foi o responsável por 99,1 % da produção nacional, sendo os estados Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte os principais produtores, ocupando 99,7 % da área cultivada com caju no país (IBGE, 2019). Além disso, essa cultura possui alta importância socioeconômica, pois é uma fonte de renda e gera empregos diretos e indiretos principalmente no Nordeste brasileiro (VIDAL, 2017).

Apesar da castanha representar apenas 10 % do peso total do caju, ela é o principal produto explorado por esse cultivo, enquanto muitos pedúnculos são desperdiçados (ALBUQUERQUE, 2011). No campo, a maioria dos produtores considera o pedúnculo um subproduto da castanha, sendo grande quantidade descartada ou deixada no próprio solo depois da remoção da castanha. Estima-se que 10 a 15 toneladas de pedúnculos de caju são produzidas como coproduto para cada tonelada de castanha de caju (TALASILIA; SHAIK, 2015).

Mesmo com grandes perdas no aproveitamento do pedúnculo de caju, ele apresenta alto valor comercial, sendo vastamente utilizado na indústria e no consumo *in natura*. Na indústria, estima-se que 10 % da produção total de pedúnculos são processados para a fabricação de polpas, geleias, doces, sucos, cajuínas e outros alimentos, bem como aproveitados para a alimentação animal (PROMMAJAK *et al.*, 2014). Entretanto, a maior parte da produção total de pedúnculos (90 %) são destinados à comercialização *in natura* em feiras e supermercados, principalmente, aqueles próximos à região produtora (ASSUNÇÃO; MERCADANTE, 2003).

O consumo do pedúnculo de caju é bastante apreciado devido ao seu aroma e sabor peculiares, sendo vastamente aceito pelos consumidores. Além disso, o caju tem se destacado devido aos avanços nas descobertas sobre as propriedades farmacológicas, como atividade antimicrobiana e antimutagênica, ação anti-inflamatória e prevenção da obesidade e diabetes (CAVALCANTE *et al.*, 2003; KUBO *et al.*, 2003; BEEJMOHUN *et al.*, 2015; VASCONCELOS *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2020). Tal atividade biológica deve-se, principalmente, pela capacidade antioxidante exercida pelos compostos bioativos presentes no caju. Quando maduro, o pedúnculo é rico em vitamina C (279,37 mg.100 g⁻¹ de massa fresca - MF), polifenóis totais (69,51 mg.100 g⁻¹ MF) e flavonóides amarelos (50,75 mg.100 g⁻¹ MF), e em menor quantidade, carotenóides totais e antocianinas (5,27 e 21,16 mg.100 g⁻¹ MF, respectivamente) (LOPES *et al.*, 2012; SCHWEIGGERT *et al.*, 2016).

Entretanto, uma das grandes dificuldades enfrentadas pelos produtores de caju que

visam o envio do pedúnculo a centros consumidores mais distantes é a vida útil extremamente curta do mesmo (MOURA *et al.*, 2010). Após o período de 48 horas armazenado em temperatura ambiente, o pedúnculo do caju apresenta-se enrugado, fermenta e, conseqüentemente, perde sua atratividade e viabilidade para o comércio (FIGUEIREDO *et al.*, 2002). Essa curta vida útil deve-se, principalmente, à estrutura delicada associada à rápida perda de firmeza do pedúnculo (MOURA *et al.*, 2010). A película frágil e a reduzida firmeza fazem com que o pseudofruto seja sensível a danos mecânicos, exigindo estratégias especiais durante o transporte do mesmo (BARRETO *et al.*, 2007). Além disso, a ocorrência de injúrias físicas na película atrelada à umidade favorável (85 – 90 %) e ao alto conteúdo de açúcar (55 – 65 %) torna os pedúnculos propensos à rápida deterioração microbiana (SIVAGURUNATHAN *et al.*, 2010). Apesar dos cuidados, substanciais perdas econômicas têm ocorrido durante o transporte dos pseudofrutos, elevando os custos para os consumidores.

Tendo em vista que o pedúnculo de caju é rico em fitoquímicos e nutrientes essenciais para a saúde humana e possui um grande potencial na indústria de alimentos, faz-se necessária uma compreensão acerca do desenvolvimento desse fruto. Portanto, estudos sobre a regulação transcricional no caju poderão auxiliar no melhoramento genético de pedúnculos com maior vida útil e atratividade para consumo.

2.1.2. Desenvolvimento do pseudofruto

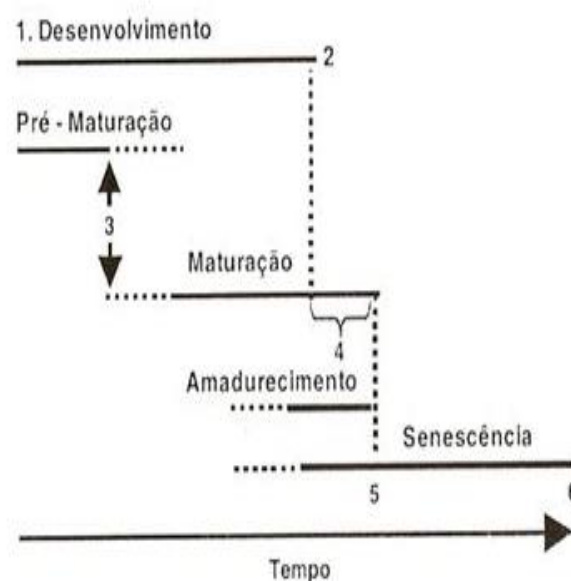
O cajueiro (genoma diploide $2n = 42$) é uma planta perene, de porte médio e ramificação baixa, sendo classificada como andromonóica, ou seja, o sistema reprodutivo é constituído por flores masculinas (estaminadas) e hermafroditas (ALIYU; AWOPETU, 2007; SOUSA *et al.*, 2007). Essa classificação somada a estrutura diferenciada da flor hermafrodita (com o estigma situando-se em posição superior aos estames) consistem em características que podem explicar muito do comportamento produtivo dessa planta (BARROS, 2011). Como o cajueiro é uma espécie de fecundação cruzada (alógama), os pomares apresentam alta heterogeneidade, tanto em relação aos aspectos vegetativos (altura, copa e folhas) quanto aos aspectos produtivos (características dos frutos e produção) (VIDAL *et al.*, 2013). A diversidade de plantas do cajueiro tem sido agrupada em dois tipos: o comum e o anão precoce, os quais diferem em estatura da planta, início do florescimento e produtividade de frutos.

O melhoramento genético do cajueiro na década de 1950 é considerado um marco na cajucultura, principalmente para pesquisas visando o aproveitamento do pedúnculo

(QUEIROZ *et al.*, 2012). Como um resultado do melhoramento, várias cultivares de cajueiro com maiores níveis de produção frutífera têm sido desenvolvidas (SAVADI *et al.*, 2020). Além disso, a baixa estatura dessa planta permite que o caju seja colhido manualmente, resultando em pedúnculos íntegros e de boa qualidade sanitária. Outro fator essencial para a obtenção de pedúnculos de qualidade é realizar a colheita dos caju no correto estágio de maturação/desenvolvimento dos mesmos.

No geral, o desenvolvimento de um fruto é dado por eventos que ocorrem desde o estabelecimento do mesmo até o amadurecimento, o qual é seguido pela senescência, processo predominantemente degradativo e irreversível que resulta na morte dos tecidos (figura 2) (RYALL; LIPTON, 1979). Durante o crescimento do fruto, ocorre a divisão e o alongamento/expansão celular, além da diferenciação dos tecidos. Quando o fruto atinge o seu tamanho máximo, ativa-se o processo de amadurecimento, caracterizado por uma sequência de mudanças bioquímicas, fisiológicas e estruturais dos frutos, conduzindo a um estado que os torna comestíveis (CHITARRA; CHITARRA, 2005). A senescência corresponde a um processo predominantemente degradativo e irreversível, resultando na morte dos tecidos (WATADA *et al.*, 1984).

Figura 2 – Fases do desenvolvimento dos frutos: início da formação da polpa (1); término do crescimento em tamanho (2); início do período de consumo (3); período ótimo de consumo (4); predominância de reações catabólicas (5) e não utilizável para consumo (6).



Fonte: Ryall; Lipton, 1979.

Em caju, o desenvolvimento da castanha e do pedúnculo começa após a fecundação da flor. Inicialmente, observa-se o crescimento rápido e uniforme do aquênio, até atingir seu tamanho máximo entre 30 e 36 dias após a antese (DAA). A partir desse ponto, a massa da castanha decresce (aproximadamente 15 %) e a casca endurece, ocorrendo simultaneamente ao processo de desenvolvimento e amadurecimento do pedúnculo que se encerra entre 56 e 60 DAA, sendo 52 DAA para o cajueiro do tipo anão precoce (BARROS, 2011). Inversamente a castanha, o crescimento do pedúnculo é muito lento nos estádios iniciais e rápido depois que a castanha atinge de 73 a 77 % do seu tamanho máximo. Nessa etapa, ocorre a obstrução do hilo (feixe vascular que conecta o aquênio ao pedicelo) e, conseqüentemente, os fotoassimilados produzidos, posteriormente, pela planta ficam retidos no pedúnculo, havendo o acúmulo dessas substâncias e o conseqüente aumento da massa do pedúnculo (MICHODJEHOUN-MESTRES *et al.*, 2009). É interessante observar que até a quarta semana de desenvolvimento do caju, a castanha torna-se maior do que o pseudofruto. Após a maturação, não obstante a grande variação da relação peso da castanha/pedúnculo, a castanha representa de 8 a 12 % do peso total do caju.

O processo de amadurecimento dos frutos é controlado por vários hormônios vegetais. Dentre eles, destaca-se o etileno, que desempenha papel central nas mudanças fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante o amadurecimento dos frutos climatéricos (PORAT *et al.*, 2009). Com base na biossíntese desse hormônio e no comportamento respiratório, os frutos são classificados como climatéricos ou não-climatéricos (TUCKER, 1993). Os frutos climatéricos apresentam um pico na produção de CO₂ e de etileno na fase climatérica, o que ativa o processo de amadurecimento (BIALE, 1964). De modo inverso, os frutos não-climatéricos apresentam um declínio gradual da respiração e baixa produção de etileno, permanecendo em níveis basais durante o amadurecimento (PORAT *et al.*, 2009). Em outras palavras, frutos climatéricos são capazes de amadurecer depois de colhidos ao passo que os não-climatéricos somente amadurecem na planta.

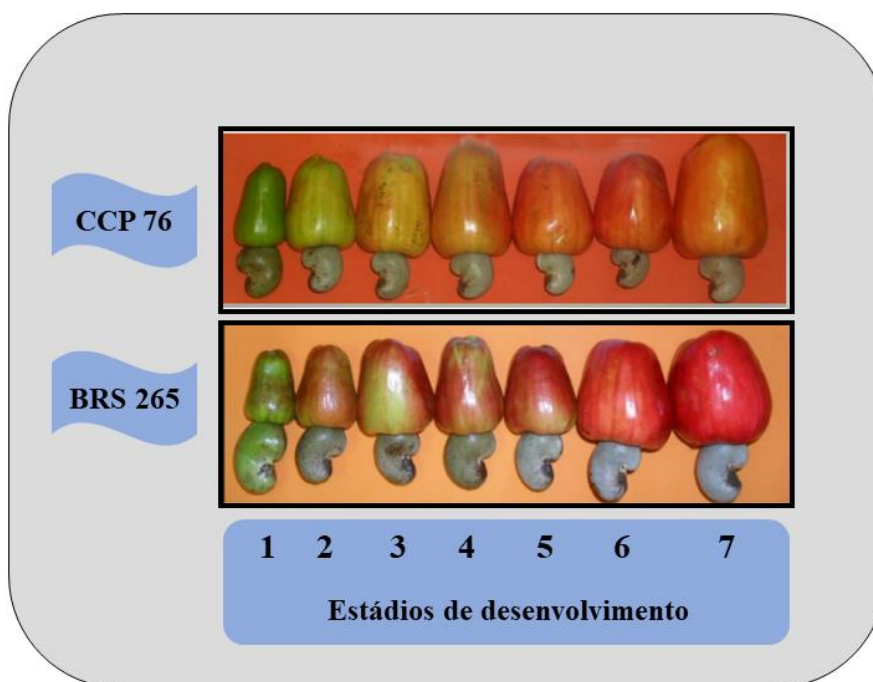
Apesar do caju apresentar uma alta taxa respiratória (62 a 72 mL Kg⁻¹ h⁻¹) a 20 °C, ele não é considerado um fruto climatérico (BIALE; BARCUS, 1967). De acordo com Pratt e Mendoza (1980), a produção de etileno é muito baixa e estável durante o amadurecimento desse fruto (200 a 400 ηL Kg⁻¹ h⁻¹). Por esse motivo, o caju necessita permanecer na planta até atingir completo amadurecimento, sendo a colheita realizada obrigatoriamente quando o pedúnculo estiver maduro, fase em que alcança a máxima qualidade para consumo (YAHIA, 2011).

No início do desenvolvimento, o pedúnculo do cajueiro apresenta coloração verde, muito adstringente (travo) e bastante firme, não atendendo às características organolépticas desejadas pelo consumidor. À medida que o pseudofruto amadurece, ocorre perda de firmeza e de adstringência; desenvolvimento de aroma e sabor típicos; aumento de peso e tamanho; além de mudança na coloração da película para vermelha, laranja ou amarela dependendo do genótipo (FILGUEIRAS *et al.*, 1999; YAHIA, 2011). Somado a essas alterações, o aumento gradual no teor de sólidos solúveis associado à redução da acidez no pedúnculo ao longo do seu desenvolvimento resulta em frutos com maior grau de doçura (FIGUEIREDO *et al.*, 2002).

O desenvolvimento do caju (usando os genótipos CCP 76 e o BRS 265) foi classificado em sete estádios de maturação de acordo com a coloração externa do pedúnculo e da castanha (figura 3) (LOPES *et al.*, 2012). No estágio 1, a castanha e o pedúnculo apresentam coloração verde. A partir do estágio 2, a castanha permanece madura e seca, apresentando pouca alteração, até o último estágio de maturação. Enquanto nesse mesmo período, as mudanças mais perceptíveis ocorrem com o pseudofruto, o qual sofre alterações físicas no seu tamanho e cor. O desenvolvimento da coloração do pedúnculo depende do genótipo, onde o caju CCP 76 e o BRS 265 apresentam cores laranja e vermelho quando maduros, respectivamente. Embora não descrito na escala, o pedúnculo do caju BRS 265 já apresenta traços de cor laranja avermelhado ainda no estágio 2 de maturação (figura 3). Tendo em vista esses fatores, o estudo comparando os pedúnculos colhidos nos estádios 2 e 7 (possuem características contrastantes) e de caju com diferentes cores de película (laranja e vermelho) fornecerá uma melhor visão sobre o desenvolvimento de cada genótipo.

A programação genética que conduz a divisão, diferenciação, expansão celular e amadurecimento dos frutos é controlada por um conjunto de genes, expressos em estádios específicos ou diferencialmente regulados ao longo do seu desenvolvimento (KNAPP; LITT, 2013). Além disso, todo esse complexo processo requer a síntese de novas proteínas e RNAs mensageiros (mRNAs) para atuarem nos diferentes metabolismos necessários à maturação dos frutos. Portanto, além de fornecer importantes informações sobre o desenvolvimento de pedúnculos de caju, o estudo transcriptômico desse pseudofruto pode auxiliar na compreensão acerca da regulação transcricional tanto em frutos não-verdadeiros como em frutos não-climatéricos durante o amadurecimento.

Figura 3 – Escala subjetiva baseada na coloração externa do pedúnculo e da castanha para classificar os estádios de desenvolvimento do caju. Estádios: 1- castanha e pedúnculos verdes; 2- castanha madura e seca/ pedúnculo verde; 3- castanha madura e seca/ pedúnculo verde-claro; 4- castanha madura e seca, pedúnculo com início de coloração amarela (CCP 76) e laranja avermelhado (BRS 265); 5- castanha madura e seca/ pedúnculo amarelo com início de cor laranja (CCP 76) e laranja avermelhado com início de cor vermelha (BRS 265); 6- castanha madura e seca/pedúnculo laranja-claro (CCP 76) e vermelho-claro (BRS 265); 7- castanha madura e seca/ pedúnculo laranja-escuro (CCP 76) e vermelho-escuro (BRS 265).



Fonte: Lopes *et al.*, 2012.

2.1.2.1. Firmeza

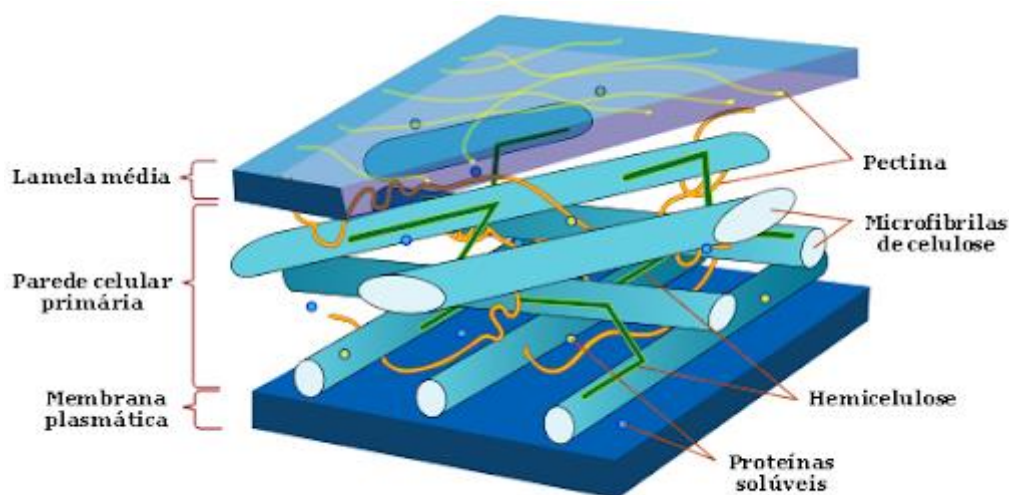
Entre todos os parâmetros de qualidade, a firmeza é o mais importante atributo, pois é utilizada como critério para determinação do valor comercial de frutos *in natura*, de maneira que ela se relaciona a qualidade nutritiva e sensorial, além de propiciar maior período de vida útil pós-colheita (FIGUEIREDO *et al.*, 2002). A firmeza também influencia a transportabilidade do fruto e a taxa de infecção por microrganismos (WANG *et al.*, 2019). Apesar de ser imprescindível que o fruto sofra redução na firmeza ao longo do amadurecimento para tornar-se mais palatável, o amaciamento excessivo traz prejuízo à qualidade.

Em caju, o amaciamento do pedúnculo ao longo do amadurecimento difere entre os genótipos. No caju CCP 76, foi verificada uma redução de aproximadamente 65 % na

firmeza dos pedúnculos (22,98 a 7,78 N) entre os estádios de maturação 2 (pseudofruto verde) e 7 (pseudofruto laranja) (LOPES *et al.*, 2011). Por outro lado, o caju BRS 265 apresenta um dos pedúnculos mais firmes ainda no estágio 2 (38,96 N) mantendo alta firmeza em pedúnculo maduro (14,48 N) quando comparado a outros genótipos (LOPES *et al.*, 2011).

No geral, a perda de firmeza durante o amadurecimento dos frutos tem sido atribuída, principalmente, às alterações nos componentes da parede celular que levam ao declínio da integridade do fruto (SEYMOUR *et al.*, 2013). Essa parede celular primária consiste em mistura complexa de polissacarídeos e derivados (celulose, hemicelulose e pectinas) e uma pequena quantidade de proteínas, secretados pela célula e reunidos em uma rede organizada por meio de ligações covalentes e não covalentes (figura 4) (TAIZ; ZEIGER, 2017). A lamela média é responsável pela adesão entre as células vegetais, e juntamente com a parede celular primária são ricas em substâncias pécicas (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Figura 4 – Estrutura da parede celular vegetal.



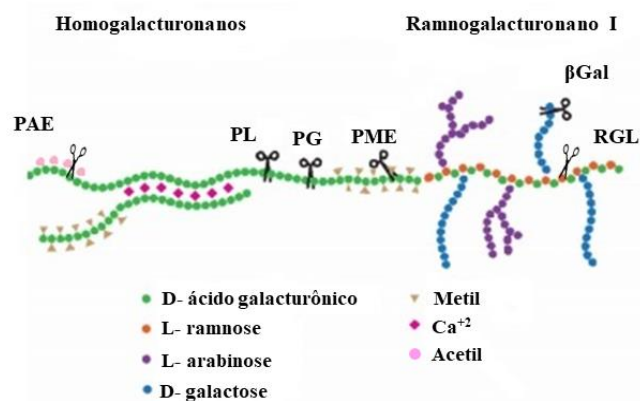
Fonte: Sticklen *et al.*, 2008.

A pectina é um polissacarídeo constituído, em grande parte, por unidades do ácido D-galacturônico, sendo classificada em três principais classes: homogalacturonano (HG), ramnogalacturonano I (RGI), ramnogalacturonano II (RGII) (WANG *et al.*, 2019). As pectinas podem apresentar cadeias laterais formadas por radicais metil e acetil, além de unidades de galactose, arabinose e outros monossacarídeos. Recentemente, pectinas de caju foram caracterizadas quimicamente como HG altamente metilada (76 %) e como RGI ramificada com arabinogalactanas do tipo II (TAMIELLO-ROSA *et al.*, 2019).

A perda da firmeza durante o amadurecimento dos frutos tem sido relacionada, principalmente, ao aumento na solubilidade da pectina (YANG *et al.*, 2017). Durante o desenvolvimento do caju, a redução no conteúdo de pectina total ocasionada devido ao aumento na solubilização de pectinas foi concomitante à redução na firmeza dos pedúnculos (FIGUEIREDO *et al.*, 2001). Além da solubilização da pectina, a perda de açúcares neutros presentes em suas cadeias laterais e a despolimerização da matriz glicana contribuem para o afrouxamento da parede celular e diminuição da interação célula-célula, reduzindo a firmeza do tecido (BRUMMELL, 2006; GOULAO; OLIVEIRA, 2008; MERCADO *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2018).

A degradação da pectina é o resultado da ação coletiva de várias enzimas hidrolíticas da parede celular (figura 5). A pectinametilesterase (PME) e a pectina acetiltransferase (PAE) hidrolisam os grupos metil e acetil, respectivamente, da cadeia de HG, produzindo uma pectina com baixo grau de metilação e acetilação (PRASANNA *et al.*, 2007). Desse modo, a cadeia principal de HG torna-se mais susceptível ao ataque enzimático da poligalacturonase (PG) e pectatoliase (PL), enzimas responsáveis pela hidrólise (WANG *et al.*, 2018). Já a cadeia de RGI é hidrolisada pela ramnogalacturonanoliase (RGL), liberando um grupo de ácido poligalacturônico insaturado, enquanto a β -galactosidase (β Gal) atua na remoção da galactose de suas cadeias laterais (VORAGEN *et al.*, 2009).

Figura 5 – Mecanismo de ação das principais enzimas que atuam na degradação da pectina da parede celular. Pectinametilesterase (PME), pectina acetiltransferase (PAE), poligalacturonase (PG), pectatoliase (PL), ramnogalacturonanoliase (RGL) e β -galactosidase (β Gal).



Fonte: Wang *et al.*, 2018.

Em caju, foi observado um pico na atividade da PME seguido pela elevação da atividade da PG, sugerindo que essas enzimas e a associação entre elas são as principais responsáveis pelo amaciamento de pedúnculos durante o seu amadurecimento (FIGUEIREDO

et al., 2001). De modo análogo, o gene *PG1* revelou ser crucial para o retardo da perda de firmeza em maçã (*Malus x domestica*) e morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) (ATKINSON *et al.*, 2012; POSÉ *et al.*, 2013). Recentemente, Xue *et al.* (2020) verificaram que o silenciamento de *FvPME38* ou *FvPME39* resultou em morangos mais firmes, enquanto a superexpressão desses genes produziu frutos mais macios.

Embora a PME e a PG sejam as enzimas mais completamente caracterizadas que modificam pectina, elas são incapazes de afetar significativamente a textura dos frutos (YANG *et al.*, 2017). Em tomate (*Solanum lycopersicum*), a inibição da atividade da PG não preveniu a solubilização da pectina (LANGLEY *et al.*, 1994; SMITH *et al.*, 1990), enquanto PME ou PG silenciados tiveram relativamente pouco efeito no amaciamento desse fruto (WEN *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2019). Por outro lado, o silenciamento de *S1PL* em tomate e dos *FaβGal4* ou *FaRGL* em morango acarretou o aumento da firmeza desses frutos, destacando a importância de uma visão geral dos genes envolvidos nesse processo (MOLINA-HIDALGO *et al.*, 2013; PANIAGUA *et al.*, 2016; ULUISIK *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2019).

Os demais polissacarídeos que compõem a parede celular também sofrem alterações, impactando na estrutura da parede e, conseqüentemente, na firmeza dos frutos. A celulose consiste em longas cadeias com unidades de β -(1,4)-D-glicose que associadas formam as microfibrilas (SEYMOUR *et al.*, 2013). O xiloglucano, um tipo de hemicelulose, consiste em uma cadeia principal com unidades de β -(1,4)-D-glicose unidas com ramificações de α -(1,6)-D-xilose (LAMPUGNANI *et al.*, 2018). Esses polissacarídeos formam ligações de hidrogênio entre si, proporcionando resistência mecânica e garantindo manutenção da estrutura durante a extensão da parede celular (AQUILA *et al.*, 2012).

Durante o amadurecimento em frutos, a expansina (EXP) e a xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase (XTH) promovem o relaxamento e a expansão da parede celular usando mecanismos diferentes. A EXP realiza a quebra das ligações de hidrogênio entre as microfibrilas (celulose) e a matriz glicana de hemicelulose, enquanto a XTH é responsável pela hidrólise e pela religação das cadeias de xiloglucano (SEYMOUR *et al.*, 2013). Além dessas enzimas, a xilosidase age removendo os resíduos de xilose da cadeia principal de xiloglucano, enquanto a celulase (endoglucanase; EG) catalisa a clivagem das ligações glicosídicas β -1,4 presentes na cadeia de celulose, contribuindo para a perda de firmeza dos frutos (JARA *et al.*, 2019).

Desse modo, o silenciamento do *S1Exp1* resultou em tomates mais firmes sem alterar a cor, o peso e o conteúdo de sólidos solúveis nesses frutos, sugerindo ser um gene

essencialmente envolvido na firmeza desses frutos (MINOIA *et al.*, 2016). Recentemente, Jara *et al.* (2019) verificaram que o gene *FaEGI* foi mais expresso em morangos macios do que em morangos firmes. Da mesma maneira, Dotto *et al.* (2005) identificaram maior expressão de *FaEXP* em morangos macios do que em firmes, ressaltando a importância de estudos com genótipos que apresentam firmezas contrastantes para a identificação de potenciais genes relacionados ao amaciamento de frutos.

Algumas dessas enzimas são codificadas por grandes famílias multigênicas. Por exemplo, a XTH é representada por 25 membros em tomate e 33 em *Arabidopsis thaliana* (YOKOYAMA; NISHITANI, 2000; SALADIÉ *et al.*, 2006). No entanto, cada membro desempenha uma função específica durante o amadurecimento do fruto, podendo o processo de amaciamento ser influenciado pela expressão de vários membros da mesma família multigênica. A superexpressão de *FvXTH9* ou *FvXTH6* foram capazes de acelerar o amadurecimento de morangos e, conseqüentemente, a produção de frutos mais macios (WITASARI *et al.*, 2019). Assim como a XTH, os níveis de expressão de três membros gênicos (*FcEXP1*, *FcEXP2* e *FcEXP5*) foram associados à redução da firmeza em morangos (FIGUEROA *et al.*, 2009). Portanto, um estudo transcriptômico pode auxiliar na identificação de membros associados com a perda de firmeza durante o amadurecimento.

O processo de amaciamento dos frutos é mediado pela expressão temporal de vários membros da mesma e de diferentes famílias multigênicas durante o amadurecimento, além de apresentar regulação altamente coordenada. Com isso, estudos moleculares são necessários para avançar na compreensão da regulação a nível transcricional envolvida na perda de firmeza de pedúnculos durante o amadurecimento de genótipos de cajus contrastantes. O uso de cajus contrastantes auxiliará na busca por genes-chaves relacionados a firmeza específica de cada genótipo.

2.1.2.2. Coloração

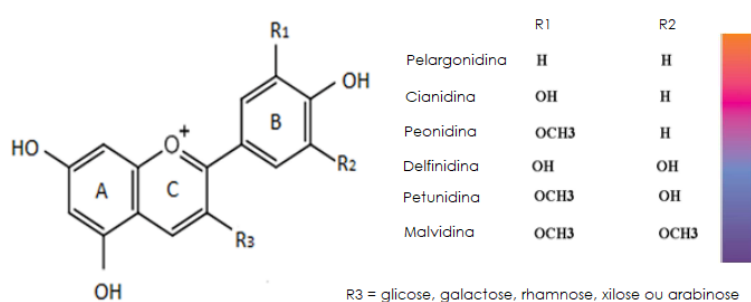
A coloração é um importante indício da maturidade e qualidade dos frutos de algumas espécies frutíferas. No caju, a escolha do consumidor depende do mercado importador, de modo que no mercado europeu, o consumidor francês prefere frutos vermelhos, enquanto, em outros países, a preferência é por frutos de cor amarela. O mercado brasileiro, por exemplo, prefere o caju de cor avermelhada, devido à associação com um fruto maduro, que alcançam os melhores preços no mercado (FILGUEIRAS; ALVES, 2002; CARIOCA *et al.*, 2003). A coloração vermelha de alguns genótipos de cajus tem sido atribuída,

principalmente, ao acúmulo de antocianinas, visto que esses compostos não foram detectados em caju amarelos ao longo desenvolvimento desses frutos (SCHWEIGGERT *et al.*, 2016).

As antocianinas pertencem a classe dos flavonóides, compostos que possuem uma estrutura básica, consistindo em dois anéis aromáticos ligados por um anel heterocíclico com três átomos de carbono (PANDEY *et al.*, 2016). Os flavonóides desempenham diversas e importantes funções na biologia das plantas: antioxidantes, sinalizadores na interação planta-bactéria, sinalização hormonal, absorção de raios UV, fertilização e germinação do pólen, além de pigmentar tecidos (STRACKE *et al.*, 2007).

Entre os flavonóides pigmentados mais abundantes nas plantas vasculares estão as antocianinas (WINKEL-SHIRLEY, 2001). As antocianinas, compostos resultantes a partir da glicosilação das antocianidinas, são as principais responsáveis pelas diferentes cores dos tecidos vegetais, variando entre vermelho e azul (figura 6). No mais, a cor final dos tecidos é determinada, principalmente, pela combinação da estrutura química das antocianinas e do pH do vacúolo, local no qual esses compostos estão localizados (WINKEL-SHIRLEY, 2001). Durante o amadurecimento, ocorre o aumento no conteúdo de antocianinas na película, principalmente, de caju vermelho (SCHWEIGGERT *et al.*, 2016).

Figura 6 – Estrutura química e representação das cores das principais antocianinas presentes na natureza.



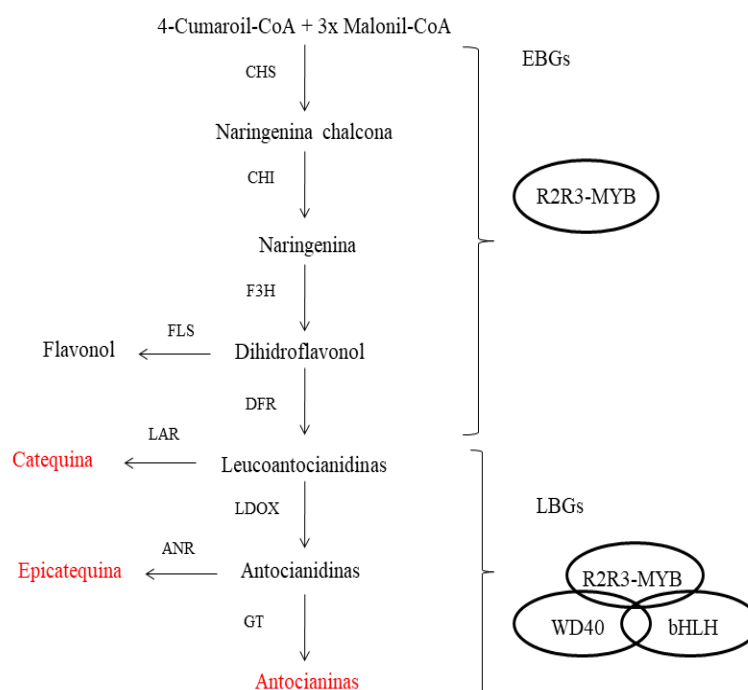
Fonte: adaptado de Su *et al.*, 2016 e Ananga *et al.*, 2013.

A via de biossíntese dos flavonóides tem sido muito estudada, sendo bioquimicamente e molecularmente caracterizada em várias espécies incluindo *Arabidopsis thaliana* e uva (*Vitis vinifera*) (SHIRLEY *et al.*, 1992; BOSS *et al.*, 1996; WINKEL-SHIRLEY, 2001). Inicialmente, os flavonóides são sintetizados pela rota dos fenilpropanóides, onde ocorre a conversão de fenilalanina em 4-cumaroil-CoA pela enzima fenilalanina amônia

liase (TANAKA *et al.*, 2010).

Entretanto, a via dos flavonóides, de fato, começa com a ação da chalcona sintase (CHS) produzindo chalconas (figura 7). Estas são isomerizadas espontaneamente ou pela ação da chalcona isomerase (CHI), resultando em flavonona (naringenina). No passo seguinte, a flavonona 3-hidroxilase (F3H) produz dihidroflavonol, podendo este ser catalisado pela dihidroflavonóide redutase (DFR) ou pela flavonol sintase (FLS) e resultar em leucoantocianidina (flavan-3,4-dióis) e flavonol, respectivamente (LI, 2014). A partir desse ponto, a leucoantocianidina pode ser convertida a catequina (2,3-*trans*-flavan-3-ol) pela enzima leucoantocianidina redutase (LAR) ou a antocianidina pela leucoantocianidina dioxigenase (LDOX) (figura 8). Por fim, as antocianidinas, então, servem como substrato para a síntese de epicatequina (2,3-*cis*-flavan-3-ol) pela antocianidina redutase (ANR) ou serem glicosiladas pela UDP flavonóide 3-*o*-glicosil transferase (GT), resultando em antocianinas (JAAKOLA, 2013).

Figura 7 – Representação esquemática da via de biossíntese dos flavonóides. Genes estruturais: chalcona sintase (CHS), chalcona isomerase (CHI), flavonona 3-hidroxilase (F3H), dihidroflavonóide redutase (DFR), flavonol sintase (FLS), leucoantocianidina redutase (LAR), leucoantocianidina dioxigenase (LDOX), antocianidina redutase (ANR) e UDP flavonóide 3-*o*-glicosil transferase (GT). Eles têm sido classificados em genes iniciais (EBGs) e tardios (LBGs), sendo regulados por fatores de transcrição da família R2R3-MYB e por proteínas basic helix–loop-helix (bHLH) e WD40 juntamente com os R2R3-MYB, respectivamente.



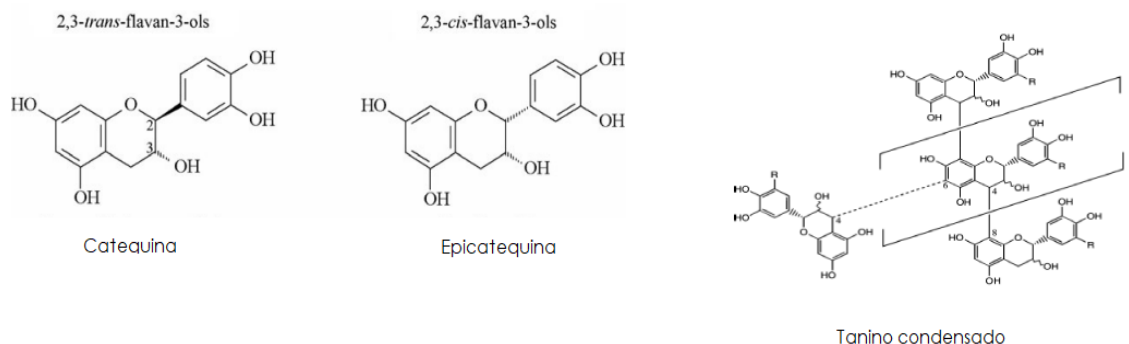
Fonte: adaptado de Liu *et al.* (2013).

Cada espécie apresenta uma expressão de genes estruturais específicos envolvidos na via dos flavonóides. A ausência de níveis detectáveis de transcritos para *MdGT* em maçã branca foi a responsável pela perda de antocianinas e conseqüentemente não-pigmentação (KOTEPONG *et al.* 2011). De maneira distinta, a ausência de antocianinas em romã branca (*Punica granatum*) foi relacionada com a supressão ou expressão limitada de *PgANS* (ZHAO *et al.*, 2015). Já em ameixas (*Prunus salicina* L.), o gene *PsLDOX* demonstrou um papel central para o acúmulo de pigmentos vermelhos em películas, apresentando correlação positiva entre sua expressão e o conteúdo de antocianinas (GONZÁLEZ *et al.*, 2016). Entretanto, um estudo comparativo entre genótipos de maçã vermelha e não-vermelha mostrou diferenças apenas na intensidade do nível de expressão de alguns genes (*MdCHS*, *MdF3H*, *MdDFR*, *MdANS* e *MdGT*), sendo estes mais expressos em maçã avermelhada (TAKOS *et al.*, 2006).

No geral, os taninos podem ser classificados como hidrolisáveis ou condensados, com base nas unidades que o compõem (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2003). Catequina e epicatequina têm sido apontados como as principais unidades monoméricas que compõem os taninos condensados (também chamados proantocianidinas) (figura 8), enquanto os taninos hidrolisáveis são compostos por ácidos fenólicos. Os taninos são compostos relacionados à adstringência em frutos devido a interação entre eles e as proteínas salivares, resultando na formação de um grande complexo precipitado que causa uma sensação de travo para o consumidor (QUEIROZ *et al.*, 2011; DAS; ARORA, 2017, BRITO *et al.*, 2020).

Durante o amadurecimento, ocorre redução no conteúdo de taninos (60-66%), minimizando a chance de interação com as proteínas da saliva do consumidor e, conseqüentemente, a sensação de adstringência dos pedúnculos (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2003). Entretanto, há uma grande controvérsia na literatura acerca do tipo de tanino predominante em caju. Agostini-Costa *et al.* (2003) verificaram a relação entre taninos condensados e a propriedade adstringente de caju. Posteriormente, Michodjehoun-Mestres *et al.* (2009) e Brito *et al.* (2007) não identificaram a presença de proantocianidinas em caju. Por fim, Cunha *et al.* (2017) observaram que a enzima LAR (responsável pela síntese de catequina) não apresentou atividade durante o amadurecimento de caju, sugerindo que os principais responsáveis pela adstringência desse fruto são os taninos hidrolisáveis.

Figura 8 – Modelo da estrutura química do tanino condensado e de suas subunidades formadoras.



Fonte: adaptado de Vital *et al.*, 2004.

Como visto anteriormente, as últimas reações da via dos flavonóides parecem ser decisivas para o acúmulo de taninos condensados e antocianinas em vegetais. Em morango, o silenciamento de *FaGT* resultou no redirecionamento da biossíntese de antocianinas para taninos em frutos maduros (GRIESSER *et al.*, 2008). Do mesmo modo, a alta expressão de *PcANR* e *PcLAR* em pêra verde (*Pyrus communis* L.) promoveu um maior conteúdo de taninos em relação às antocianinas, sugerindo que esses genes são essenciais para a definição da cor de pêras (YANG *et al.*, 2015). Inclusive, recentemente, Robinson *et al.* (2020) silenciaram *VvANR* em uvas e observaram frutos com menor concentração de taninos, reforçando a importância desse gene no acúmulo desses compostos.

Os genes estruturais envolvidos na biossíntese de flavonóides têm sido classificados em dois grupos: genes iniciais (*early biosynthetic genes* - EBGs) e tardios (*late biosynthetic genes* - LBGs) (PELLETIER *et al.*, 1997). Na família Rosaceae, os genes iniciais são assim chamados porque atingem seu pico de expressão ainda no primeiro estágio de desenvolvimento do fruto. Entre os genes iniciais têm-se aqueles que codificam as proteínas CHS, CHI, F3H e DFR. Já os genes tardios apresentam um pico de expressão no estágio de maturação, codificando as proteínas LDOX e GT (ESPLEY *et al.*, 2007; RAVAGLIA *et al.*, 2013; GONZÁLEZ *et al.*, 2016).

Além dos estruturais, os genes regulatórios desempenham função crucial na biossíntese de flavonóides. Estes genes codificam os fatores de transcrição da família R2R3-MYB, responsáveis por regular a expressão dos EBGs; e das famílias das proteínas *basic helix-loop-helix* (bHLH) e WD40, que através da formação de um complexo (denominado

MBW) com os R2R3-MYB, regula a expressão dos LBGs (XU *et al.*, 2015; GONZÁLEZ *et al.*, 2016). A expressão dos genes que codificam esses fatores de transcrição geralmente, é relacionada ao estágio de desenvolvimento do fruto (XU *et al.*, 2015; GONZÁLEZ *et al.*, 2016). Em pêra, o gene *MYB10* foi mais expresso no estágio inicial, enquanto os níveis de expressão dos genes *bHLH* e *WD40* foram mais altos no estágio final de desenvolvimento do fruto corroborando com o acúmulo de antocianinas (YANG *et al.*, 2013).

Os genes que codificam os fatores de transcrição pertencem a grandes famílias multigênicas, apresentando membros envolvidos tanto no metabolismo de antocianinas, quanto no das subunidades dos taninos. Em uva, os genes *VvMYBA1* e *VvMYBA2* funcionam como reguladores do conteúdo de antocianinas (KOBAYASHI *et al.*, 2002; KOBAYASHI *et al.*, 2004; WALKER *et al.*, 2007), enquanto os genes *VvMYBPA1*, *VvMYBPA2* e *VvMYBPAR* são responsáveis pelo acúmulo de taninos (BOGS *et al.*, 2007; TERRIER *et al.*, 2009; KOYAMA *et al.*, 2014). Em particular, *VvMYBPA1* e *VvMYBPA2* são capazes de ativar a região promotora de *VvLAR* e *VvANR* (genes envolvidos na biossíntese de taninos), além de outros genes estruturais da via dos flavonóides (TERRIER *et al.*, 2009; BOGS *et al.*, 2007).

Em vista do acúmulo de antocianinas e taninos depender da regulação da expressão de genes estruturais envolvidos na biossíntese de flavonóides, bem como de fatores de transcrição que atuam na modulação desses genes, estudos moleculares são necessários para melhor compreensão desse processo durante o amadurecimento de cajus.

2.2. Abordagem transcriptômica aplicada a frutos

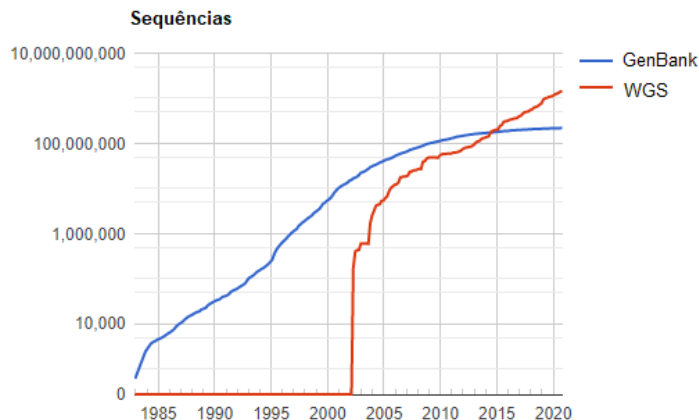
A domesticação e o melhoramento genético do cajueiro tiveram início por volta de 1950 no Brasil e na Índia (BHAT *et al.* 2010; QUEIROZ *et al.* 2012). Embora as técnicas convencionais de melhoramento vegetal tenham feito progressos consideráveis no desenvolvimento de espécies melhoradas, elas não têm sido capazes de acompanhar a crescente demanda por hortaliças e frutos nos países em desenvolvimento (SIMSEK *et al.*, 2017). Além disso, como em outras espécies de árvores perenes, o melhoramento genético do caju pela reprodução tradicional é lento e imprevisível devido à longa fase juvenil, alto grau de heteroziguidade, falta de correlações de traços juvenil-maduros e grande tamanho da planta madura (SAVADI *et al.*, 2020). Portanto, tecnologias moleculares devem acelerar os processos de seleção e melhoramento dos frutos.

Em 2005, o surgimento das tecnologias de sequenciamento de DNA conhecidas

como *Next Generation Sequencing* (NGS) revolucionou a pesquisa na área genômica (OZSOLAK; MILOS, 2011). Isso porque as tecnologias NGS permitem o sequenciamento de vários genes ao mesmo tempo, possibilitando uma larga escala produtiva de informações. O uso dessas tecnologias está evoluindo rapidamente (fato que pode ser observado pela quantidade crescente de publicações e sequências depositadas em bancos de dados públicos) devido ao custo financeiro para a realização de sequenciamento em larga escala está cada vez mais acessível (figura 9).

Recentemente, o genoma do cajueiro genótipo BRS 226 foi sequenciado por meio das tecnologias NGS, mais especificamente, através da plataforma PacBio RS II (capaz de sequenciar fragmentos com >10.000 pares de bases) e depositado no banco de dados público Phytozome (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Aoccidentale_er). No geral, o genoma do cajueiro apresenta 41.197 genes anotados e agrupados em 581 *scaffolds* e 1.150 *contigs*.

Figura 9 – Número de seqüências gênicas depositadas no *GenBank* e no *Whole Genome Sequencing* (WGS) desde 1982 até 2020.



Fonte: NCBI (2020).

Entre as tecnologias NGS, a técnica de sequenciamento de cDNA (RNA-Seq) tem sido amplamente utilizada com o intuito de quantificar e identificar os transcritos expressos em um organismo em determinado estágio de desenvolvimento ou condição de estresse (OZSOLAK; MILOS, 2011). Segundo Korpelainen et al. (2015), a técnica de RNA-seq integra as estratégias de extração, checagem da qualidade e integridade do RNA total, seguidas pela seleção do mRNA, preparação e sequenciamento da biblioteca de cDNA e, por fim, análises de bioinformática. Diferentemente de métodos baseados em hibridização

(microarranjo e *northern-blot*), a técnica de RNA-Seq não necessita de conhecimento prévio do transcriptoma (possibilita o estudo de organismos não-modelo) e não se limita a avaliação apenas de genes para os quais existam sondas. Desta forma, novos transcritos e variantes de *splicing* podem ser identificados. Além disso, é possível determinar polimorfismos em regiões transcritas com resolução de um nucleotídeo (WANG *et al.*, 2009).

A técnica de RNA-Seq ainda apresenta vantagens em relação aos métodos utilizados anteriormente para análise de expressão gênica devido a sua alta sensibilidade, rendimento e menor quantidade de RNA inicial requerido para análise. Com essa técnica também é possível realizar o sequenciamento massivo e paralelo de milhões a bilhões de moléculas de cDNA (HEATHER; CHAIN, 2016). Então, as sequências resultantes são alinhadas a um genoma de referência ou montadas (quando a espécie não tem genoma sequenciado), fornecendo a estrutura dos transcritos e o nível de expressão de cada gene (SIMSEK *et al.*, 2017).

Como os eventos decorrentes do amadurecimento dos frutos são mediados pela expressão de um grande conjunto de genes, o RNA-seq é capaz de permitir-nos entender melhor acerca dessa complexa regulação transcricional em diferentes frutíferas. Além disso, a técnica de RNA-Seq tem sido muito utilizada para fornecer a base para compreensão sobre os mecanismos moleculares e os principais genes controlando mudanças na qualidade dos frutos durante o amadurecimento (SIMSEK *et al.*, 2017). Recentemente, muitos artigos relacionados com a aplicação de RNA-seq em frutos têm sido publicados (SRIVASTAVA *et al.*, 2016; DESHPANDE *et al.*, 2017; SIMSEK *et al.*, 2017; PEI *et al.*, 2019). Por meio da análise comparativa de transcriptomas e de expressão diferencial é possível ter uma visão geral dos principais processos ativos durante o amadurecimento de frutos, bem como os genes envolvidos nesses processos. Além disso, a análise comparativa usando genótipos de uma mesma espécie revela prováveis genes associados com características específicas de cada genótipo.

Em vista da escassez de estudos moleculares em cajus, e das modificações desses metabolismos envolverem a expressão coordenada de diversos fatores de transcrição, genes envolvidos na biossíntese (flavonóides), assim como na degradação (parede celular), justifica-se a necessidade de usar a abordagem transcriptômica para uma investigação detalhada desses metabolismos em pedúnculos de caju durante o amadurecimento.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Relacionar o perfil transcriptômico de pedúnculos de caju CCP 76 e BRS 265 com as alterações na firmeza e no conteúdo de antocianinas.

3.2. Específicos

- Mensurar a firmeza e o conteúdo de antocianinas presentes em pedúnculos de caju;
- Identificar os genes diferencialmente expressos (GDEs), via análise transcriptômica (RNAseq), entre os estádios de desenvolvimento (imaturo e maduro) e os genótipos (CCP 76 e BRS 265) dos pedúnculos de caju;
- Realizar a anotação funcional do componente celular, processo biológico e função molecular por meio de ontologia gênica (GO) dos GDEs;
- Identificar as vias metabólicas atribuídas aos GDEs entre os estádios de desenvolvimento (imaturo e maduro) e os genótipos (CCP 76 e BRS 265) dos pedúnculos a fim de ajudar na identificação dos genes envolvidos nos metabolismos de interesse;
- Validar os resultados de expressão obtidos na análise transcriptômica, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR).

4. ARTIGO

Article submitted to *Plant Molecular Biology*

**TRANSCRIPTOME PROFILING OF CASHEW APPLES (*Anacardium occidentale* L.) GENOTYPES
REVEALS SPECIFIC GENES LINKED TO FIRMNES AND COLOR DURING PSEUDOFRUIT
DEVELOPMENT**

1 **Transcriptome profiling of cashew apples (*Anacardium occidentale*) genotypes reveals specific genes linked**
2 **to firmness and color during pseudofruit development**

3

4 Thais Andrade Germano^a, Matheus Finger Ramos de Oliveira^a, Shahid Aziz^a, Antonio Edson Rocha Oliveira^b,
5 Kátia Daniella da Cruz Saraiva^c, Clesivan Pereira dos Santos^d, Carlos Farley Herbster Moura^e, José Hélio Costa^{a*}.

6 ^a Universidade Federal do Ceará, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Campus do Pici, CEP
7 60440-554, Fortaleza, CE, Brazil; tandradeg@gmail.com; matheusfingerramos@gmail.com;
8 shahidaziz.cl@gmail.com.

9 ^b Universidade de São Paulo, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências
10 Farmacêuticas, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brazil; ant.edsonoliveira@outlook.com.

11 ^c Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba, Campus Princesa Isabel, CEP 58755-000,
12 Princesa Isabel, PB, Brazil; katiadaniellasaraiva@gmail.com.

13 ^d Universidade Estadual de Ponta Grossa, Departamento de Química, Campus Uvaranas, CEP 84030-900, Ponta
14 Grossa, PR, Brazil; clesivanpereira@gmail.com.

15 ^e Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Dra. Sara Mesquita, CEP 60511-110, Fortaleza, CE, Brazil;
16 farley.moura@embrapa.br.

17 *Corresponding author: Tel.: +55 85 33669825. E-mail address: helio.costa@ufc.br

18

19 **Acknowledgments**

20 TGA and SA are grateful to CAPES for the Doctoral fellowship. AERO is grateful to FAPESP for the
21 Postdoctoral fellowship (grant numbers 2019/22579-7 and 2013/08216-2). JHC is thankful to CNPq for the
22 Researcher fellowship (grant number 309795/2017-6). The authors are grateful to Embrapa Agroindústria
23 Tropical for providing the cashew apples. Genome sequence data of cashew trees used in this article was
24 produced by the US Department of Energy Joint Genome Institute <http://www.jgi.doe.gov/> in collaboration with
25 the user community.

26

27 **Abstract:**

28 Cashew apple (*Anacardium occidentale*) has a great economic worldwide due to its high nutritional value,
29 peculiar flavor and aroma. During ripening, the peduncle develops different peel color and becomes quickly
30 fragile due to its oversoftening, impacting its consumers' acceptance. In view of this, the understanding about its
31 transcriptional dynamics throughout ripening is imperative. In this study, we performed a transcriptome
32 sequencing of two cashew apple genotypes (CCP 76 and BRS 265), presenting different firmness and color peel,
33 in the immature and ripe stages. Comparative transcriptome analysis between immature and ripe cashew apple
34 revealed 4,374 and 3,266 differentially expressed genes (DEGs) to CCP 76 and BRS 265 genotypes, respectively.
35 These genes included 71 and 34 GDEs involved in the cell wall disassembly and flavonoid biosynthesis,
36 respectively, which could be associated with firmness loss and anthocyanin accumulation during cashew apple
37 development. Then, softer peduncle of CCP 76 could be justified by down-regulated *EXP* and up-regulated of
38 genes involved in pectin degradation (*PG*, *PL* and *PAE*) and in cell wall biosynthesis. Moreover, genes related to
39 flavonoid biosynthesis (*PAL*, *C4H* and *CHS*) could be associated with early high accumulation of anthocyanin in
40 red-peel peduncle of BRS 265. Finally, expression patterns of the selected genes were tested by real-time
41 quantitative PCR (qRT-PCR), and the qRT-PCR results were consistent with transcriptome data. The information
42 generated in this work will provide insights into transcriptome responses to cashew apple ripening and hence, it
43 will be helpful for cashew breeding programs aimed at developing genotypes with improved quality traits.

44 **Key-words: peduncle, flavonoid, anthocyanin, gene ontology, differential expression.**

45

46 **1. Introduction**

47 Cashew (*Anacardium occidentale* L) is a tropical evergreen tree that belongs to the *Anacardiaceae*
48 family (Savadi et al. 2020). Its fruit, popularly known as the cashew, consists in two parts: nut and peduncle.
49 Cashew nut, potentially used as source of foods and CNSL (cashew nut shell liquid), is the second most
50 important nut after almonds in worldwide (Oliveira et al. 2020). Vietnam, India and Cote d'Ivoire were the major
51 producers of cashew nut in 2018 with production of 4 million tons (FAOSTAT 2018). The peduncle, also called
52 cashew apple, represents more than 90 % of cashew, being widely consumed all over the world not only for its
53 taste but also for its health benefits (Vasconcelos et al. 2015; Carvalho et al. 2018; Oliveira et al. 2020). However,
54 the commercialization of cashew apple is extremely challenging and has been limited due to its high perishability,
55 astringent flavor and intense softening, which affects fruit quality and marketability. Its postharvest life is less
56 than two days when stored at room temperature (Moura et al. 2010; Queiroz et al. 2011). Thus, the proper
57 understanding of pseudofruit development using scientific methods might increase postharvest life, reducing
58 losses.

59 In cashew apple, some genotypes are better at retaining firmness than others, in addition to promoting
60 specific peel color. Cashew apple genotype CCP 76 is largely commercialized fruit due to attractive peel
61 coloration (orange), sweetness, size and fresh mass of peduncle but is not commerce-friendly due to reduced
62 firmness. On the other hand, genotype BRS 265 (red color) presents desirable traits for marketing such as greater
63 firmness, which probably promotes longer postharvest life (Lopes et al. 2011). The differences in the traits of
64 agronomic interest between these genotypes makes them attractive models for transcriptional studies. Advances
65 in knowledge regarding cashew apples transcriptome enables the manipulation of desirable characteristics with
66 economic interest to meet specific demands such as genotypes with higher nutritional quality and reduced
67 firmness loss.

68 In cashew, classical breeding programs have been widely exploited to select superior genotypes based
69 on traditional traits as, size and weight of nuts or yield of a cashew tree, also to prospect genotypes with
70 enhanced fruit quality and resistance to pests and diseases (Filho et al. 2019). However, these programs are long
71 and time-consuming, therefore expensive with high production costs. The development of next-generation
72 sequencing (NGS), and hence RNA sequencing (transcriptome sequencing), has revolutionized genomic research
73 and provided unprecedented insight into transcriptome level studies, mainly regarding transcriptional regulation
74 during fruit development (Yu et al. 2012; Srivastava et al. 2016; Deshpande et al 2017; Pei et al. 2019). So far,
75 no transcriptome-based information of cashew apple was available and availability of such data will accelerate

76 genomics-assisted breeding for recognition of novel genes of quality characters for sustainable fruit production
77 (Afzal et al. 2020).

78 Considering the economic importance of the cashew crop and its commercial exploitation, it is
79 necessary to find better ways to retain firmness and add nutritional value to peduncles during cashew nut
80 processing, making them more attractive for consumers. In view of this, transcriptomic studies involving
81 different genotypes can be interesting to understand about specific transcriptional regulation that results in
82 specific characteristics of each genotype. In the present work, transcriptomic changes of two cashew apple
83 genotypes (CCP 76 and BRS 265) contrasting in color and firmness during pseudofruit development were
84 investigated. Furthermore, this is the first report using transcriptomic analysis to characterize the cashew apple
85 development.

86

87 **2. Material and methods**

88 2.1. Plant material

89 In this study, cashew tree clones were cultivated in the same orchard at Experimental Station of
90 Embrapa Tropical Agroindustry in Pacajus-CE, Brazil (lat.4°11'26,62"S, lon. 38°29'50,78"W), with the same
91 climatic conditions. Cashew apples (*Anacardium occidentale* L.) from orange-colored peel, CCP 76 (Clone
92 Cashew Tree Pacajus), and red-colored peel, BRS 265 (Clone Brazil), were harvested at developmental stage 2
93 (green peduncle and mature nut) and at stage 7 (fully colored ripe peduncle with mature nut), based on the
94 peduncle peel color (Lopes et al. 2012). Pseudofruit were manually harvested from August to November 2018
95 and at the same time (9:00 to 10:00 a.m). From each CCP 76 and BRS 265 samples, three biological replicates
96 were prepared, where each replicate consisted of six cashew apples collected from three trees. After
97 determination of fruit firmness, the nuts were removed, and the peduncles were frozen, ground to a fine powder
98 in the presence of liquid nitrogen and stored at -80 °C for posterior analyses.

99

100 2.3. Firmness and anthocyanin content quantification

101 Fruit firmness was evaluated three times on opposite sides of each peduncle with a penetrometer
102 (Magness-Taylor model FT-011) used to measure the maximum force required to penetrate tissue to a depth of 5
103 mm using an 8 mm diameter cylindrical. Results were expressed in Newton (N). Total anthocyanins content was
104 extracted as described by Liu et al. (2012) and determined using the differential pH method described by Giusti
105 and Wrolstad (2001). The absorbance of extracts was measured at 510 and 700 nm, and the results were

106 expressed as mg kg⁻¹ on a fresh weight basis.

107

108 2.4. Total RNA extraction

109 Total RNA was extracted and purified from 0.1 g of ground samples using the ConcertSMPlant RNA
110 Reagent (Invitrogen, Darmstadt, Germany) and NucleoSpin[®] RNA Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany),
111 respectively. DNase digestion step was applied to remove genomic DNA contamination using RNase-Free
112 DNase Set (Qiagen, Hilden, Germany). Concentration and purity (260/280 ratio) of the isolated RNA was
113 determined with a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, USA). Then, the RNA
114 integrity was verified on a 1.5 % agarose gel stained with ethidium bromide under UV light and confirmed with
115 Bioanalyzer 2100 system (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) through the RNA integrity number (RIN).

116

117 2.5. Construction and sequencing of cDNA library

118 Library construction and high-throughput sequencing of samples were performed by a sequencing
119 facility (Macrogen, Inc. Seoul, South Korea). A total of 12 cDNA libraries were constructed and sequenced by
120 using three biological replicates for immature (CI and BI) and ripe (CR and BR) peduncle of CCP 76 and BRS
121 265 genotypes, which immature and ripe refers to developmental stage 2 and 7, respectively. A total amount of 1
122 µg of RNA (with RIN > 9) per sample was applied for strand-specific RNA-Seq libraries preparation using
123 Truseq Stranded mRNA library kit (Illumina, San Diego, CA, USA). Then, the libraries were sequenced on an
124 Illumina Hiseq2500 platform (Illumina, San Diego, CA, USA) in paired-end mode with a read length of 101 bp
125 using TruSeq SBS v.4 kit (Illumina, San Diego, CA, USA). The raw sequencing reads were deposited in the
126 NCBI Sequence Read Archive (SRA) under the following bioproject accession number PRJNA657300.

127

128 2.6. Reads quality check and mapping to the reference genome

129 The raw reads quality was evaluated using the FastQC v.0.11.7 software (Andrews 2010). The raw reads
130 containing adapter, low-quality bases (< Q20) and short size sequences (≤ 50 bp) were trimmed by Trimmomatic
131 v.0.36 tool (Bolger et al. 2014) and re-evaluated the data quality. After trimming, filter reads were mapped to
132 cashew tree genome BRS 226 available in Phytozome database
133 (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Aoccidentale_er) using default parameters of
134 TopHat2 (Kim et al. 2013) and Bowtie2 (Langmead and Salzberg 2012) softwares (Supplementary Table S1).

135

136 2.7. Differential expression analysis and functional annotation

137 The number of filter reads that mapped to each gene was calculated using HTSeq v. 0.9.1 (Anders et al.
138 2015) under the guidance of annotated genes from a GFF file (General Feature Format) available in the
139 Phytozome database. Then, the counts were normalized using edgeR package (Robinson et al. 2010). Only the
140 genes that presented count-per-million (CPM) ≥ 2 in n of the samples, where n is the size of the smallest group
141 of replicates (here $n = 2$) were selected for differential expression analysis. Differentially expressed genes (DEGs)
142 and principal component analysis (PCA) were performed from normalized filter reads using DESeq2 package v.
143 1.30.0 (Love et al. 2014). Only genes presenting a corrected p-value threshold of 0.05 and $|\log_2 \text{fold-change}| \geq 1$
144 were considered as DEGs (Benjamini and Hochberg 1995). DEGs were inferred from the following comparisons:
145 BR vs BI; CR vs CI; CI vs BI; CR vs BR. The annotation for DEGs related to color and firmness was obtained
146 by access a GFF file, while the transcription factors were identified using PlantTFDB v.5
147 (planttfdb.cbi.pku.edu.cn/prediction.php) with default parameters. Then, functional enrichment analysis of the
148 DEGs were performed using Goseq R package v. 1.30.0 (Young et al. 2010) and KOBAS software v. 3 (Xie et al.
149 2011).

150

151 2.8. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis

152 Six genes related to flavonoids biosynthesis and cell-wall disassembling, besides of highly stable genes
153 were selected for validation of the transcriptomic data generated by RNA-seq analysis. Specific primer pairs
154 were designed, whenever possible, in the exon/exon junctions, using Perl primer v. 1.1.21 (Marshall 2004)
155 (Supplementary Table S2). The cDNA was transcribed from 0.5 μg of total RNA and oligo dT18 using the
156 Improm II kit (Promega, Madison, USA). The PCR reaction was performed using a RealPlex 4S thermocycler
157 (Eppendorf, Germany) in 96-well optical reaction plates. Each PCR reaction was set up in total 20 μL volume
158 containing 4 μL of cDNA (25 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 1 μL of each primer (300 nM), 10 μL of GoTaq® qPCR Master Mix
159 (Promega, Madison, USA) and 4 μL of ultrapure water. All reactions were carried out in biological and technical
160 triplicates, including a no cDNA template as negative control. The PCR cycling conditions were as follows:
161 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, the optimal annealing temperature for each primer
162 pair for 15 s and 60 °C for 20 s. Primer-product specificity was verified by melt-curve analyses after each
163 experiment. The qBase^{PLUS} software v. 3.1 was used to measure the relative expression level of each gene and to
164 confirm the stability of candidate reference genes through GeNorm tool (Vandesompele et al. 2002; Hellemans et
165 al. 2007). Pearson's coefficient (r) between RNA-seq (FPKM - Fragments Per Kilobase Million) (Supplementary

166 Table S3) and qRT-PCR (relative expression) results was calculated.

167

168 2.9. Statistical analysis for firmness and metabolites

169 The data obtained for firmness and metabolites quantification were subjected to two-way analysis of
170 variance (ANOVA) using GraphPad Prism 9.0 software and averages were compared by Tukey test at 5 %
171 probability. The results were expressed as the mean \pm standard deviation (SD) of three biological replicates.

172

173 3. Results and discussion

174 3.1. Firmness and anthocyanin content in peduncles vary during developmental stages and between genotypes

175 Firmness and color peel are important attributes which determine the quality, besides of influence
176 consumers' attractiveness and acceptance of in natura cashew apples commercialization (Minoia et al. 2016).
177 Firmness and anthocyanin content for CCP 76 and BRS 265 cashew apples at two developmental stages are
178 presented in Fig. 1. The firmness of both genotypes decreased significantly during fruit development (Fig. 1B),
179 while the total anthocyanin content increased in the same period (Fig. 1C). Although the anthocyanin values in
180 mature CCP 76 was lower compared with mature BRS 265, the increase in anthocyanin content was more
181 accentuated (4.3 times) in orange-colored (CCP 76) than red-colored (BRS 265) cashew apple (1.9 times)
182 throughout fruit development. Overall, firmness and anthocyanins content were significantly higher in BRS 265
183 than in CCP 76 cashew apple at the same developmental stage. These differences result in cashew apple
184 genotypes with distinct visible characteristics, as shown in Fig. 1A.

185

186 3.2. Sequencing and mapping data of peduncles cashew apple

187 RNA-Seq libraries of peduncles cashew apple CCP 76 and BRS 265 harvested at two development
188 stage (green and mature) with three biological replicates generated approximately 541 million raw reads,
189 showing an average Q30 value and GC content of 92.61 and 44.67 %, respectively (Supplementary Table S4).
190 The removal of low quality sequences, adapters, and short reads resulted in a final number of approximately 485
191 million of filter reads (89.58 %) among which 418 million (~ 91 %) reads mapped to the high-quality cashew
192 tree reference genome, which contains 41,197 predicted genes (Supplementary Table S4). According to Pie et al.
193 (2019), when the reference genome is representative and the experiments are not contaminated, the percentage of
194 mapped reads is expected to be higher than 70 %. In the current study, the high rate of mapped reads evidences
195 the quality of so far results for further analyses.

196 The principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering of the 12 samples analyzed were
197 performed to verify the uniformity of the replicates in each sample and genotype (Fig. 2). In PCA plot was
198 observed the expected clustering of replicates of each sample (Fig. 2A). The first two principal components (PC1
199 and PC2) explained 94 % of the total transcriptional variance, with PC1 explaining 56 % and PC2 the remaining
200 38 %. PC1 discriminated the fruit at ripe stage (located on the left side) from those at immature stage (located on
201 the right side). Whereas PC2 distinguished both BRS 265 samples (located on the underside) from those of CCP
202 76 genotype (located on the top side). This indicates that the variance in gene expression is higher among
203 samples during development (stage 2 to 7) than between genotypes in the same maturation stage. The observed
204 PCA results, the hierarchical clustering (represented by heatmap graph) also showed the grouping of replicates of
205 each sample (Fig. 2B).

206 3.3. Analysis of differentially expressed genes (DEGs)

207 To reveal the related genes to cashew apple development and that responsible for specific trait of each
208 genotype, analysis of DEGs was carried out. From 41,197 predicted genes in the cashew apple genome, only
209 18,110 genes presenting $CPM \geq 2$ in at least two cDNA libraries were subjected to differential expression
210 analysis. Among these, 7,024 genes involved in different fruit ripening processes were inferred as DEGs ($|\log_2$
211 $fold-change| \geq 1$ and adjusted p -value < 0.05) (Supplementary Table S5). As shown in Fig. 3A, a total of 1,859
212 and 1,835 DEGs were detected in CI vs BI and CR vs BR, respectively. In addition, the comparative analysis
213 between CR and CI have been shown that 1,976 genes highly expressed in the CCP 76 ripe, while the expression
214 of 2,398 genes was down-regulated. Similarly, the comparison BR vs BI presented 1,337 and 1,929 up and
215 down-regulated genes to BRS 265 ripe, respectively (Fig. 3A).

216 The Venn diagram was constructed to summarize commonly and uniquely genes expressed between
217 established comparisons (CR vs CI and BR vs BI) (Fig. 3B). A total of 1,749 and 641 genes were exclusively
218 differentially expressed in CR vs CI and BR vs BI, respectively. Additionally, 2,625 DEGs were common during
219 fruit development of both genotypes. The comparison of transcriptional changes allowed us to observe that two
220 cashew apple genotypes share similar transcriptional dynamics (common DEGs) during development.
221 Undoubtedly, exclusive DEGs underlie the specific differences found in each studied genotype. Detailed
222 information on these common and exclusive DEGs are listed in Supplementary Table S6.

223 3.4. Functional enrichment analysis

224 Gene Ontology (GO) enrichment analysis of identified DEGs assigned to main biological process
225 involved in cashew apple development. Overall, DEGs were assigned to 73 and 74 functional groups

226 significantly enriched (p-value of < 0.05) in CR vs CI and BR vs BI, respectively (Supplementary Table S7). As
227 shown in Fig. 4, several significantly enriched DEGs could be associated to firmness-related processes,
228 corroborating with alterations in this trait. Likewise, many DEGs were mainly involved in biological processes
229 related to sugar and cell wall metabolism in watermelon (*Citrullus lanatus*) (Zhu et al. 2017). Interestingly,
230 several DEGs were assigned to the category of L-phenylalanine biosynthetic process (GO: 0009094) in CCP 76
231 genotype. It is an important highlight that phenylalanine is a precursor compound to anthocyanin biosynthesis
232 (Wu et al. 2018).

233 Additionally, to further explore the functions of DEGs, these were subjected to KEGG pathway
234 enrichment analysis. A total of 37 and 35 KEGG pathways were significantly enriched with a p-value of < 0.05
235 in CR vs CI and BR vs BI comparisons, respectively (Supplementary Table S8). The majority of metabolic
236 pathways were equally enriched during fruit development of both genotypes (Fig. 5). Notably, many firmness-
237 related pathways and flavonoid biosynthesis (ko00941) were significantly enriched in DEGs during cashew
238 apple ripening. Enrichment of related pathways such as “phenylalanine metabolism”, “galactose metabolism”
239 and “pentose and glucuronate interconversion” have been also described in previous studies of the fruit ripening
240 (Ma et al. 2020, Sun et al. 2020). In this study, we focused on cited metabolisms because they are important
241 pathways associated with fruit quality traits. The other metabolisms will be analyzed in more detail in the further
242 studies.

243 3.5. Genes related to cell wall disassembly in cashew apple

244 The cell wall disassembly is considered the main factor responsible for fruit softening. Pectin, the main
245 component present in the middle lamella, consists of polysaccharides enriched in galacturonic acid, classified in
246 three major groups: homogalacturonan (HG), rhamnogalacturonan-I (RG-I), and rhamnogalacturonan-II (RG-II)
247 (Wang et al. 2019). Pectin solubilization, depolymerization of matrix glycans and loss of natural sugar from
248 pectin side-chain promote middle lamella degradation and, hence the reduction of cell-to-cell adhesion,
249 contributing to fruit firmness loss (Brummell 2006; Goulao and Oliveira 2008; Mercado et al. 2011). Recently,
250 pectins from cashew apple fruit were characterized, where were found that about 76 % of its HG chain is methyl
251 esterified, the presence of few quantities of RG-I backbones and some arabinogalactan substitutions in its main
252 chain (Tamiello-Rosa et al. 2019). In the present study, a larger number of DEGs (71 genes) were importantly
253 linked to fruit softening in cashew apple (Fig 6).

254 Pectin methylesterase (PME) and pectin acetylerase (PAE) selectively remove the methyl-ester and
255 acetyl groups from homogalactouronic acids, respectively, making this polymer accessible to other cell wall

256 hydrolytic enzymes activities (Prasanna et al. 2007). Curiously, we found many *PME* and *PAE* more expressed in
257 immature than ripe cashew apple with exception of the one *PAE* (Anaoc.0635s0009), which was exclusively up-
258 regulated in CCP 76 ripe (Fig. 6A). Previous study also reported that many immature fruit are rich in *PME*, while
259 ripe fruit are rich in hydrolase enzymes (Prasanna et al. 2007). Additionally, we identified two pectin
260 methylesterase inhibitor (*PMEI*; Anaoc.0006s1481 and Anaoc.0020s0385) were highly more expressed in
261 immature than ripe cashew apple. Likewise, dos Santos et al. (2019) noticed the up-regulation of *PMEI* in
262 immature acerola (*Malpighia emarginata*), suggesting that the inhibition of pectin degradation by *PMEI* is one of
263 the attempts to maintain cell wall integrity of this fruit.

264 Among the cell wall hydrolases coding genes, we identified many polygalacturonase (*PG*) and pectate
265 lyase (*PL*) were up-regulated from immature to ripe in both genotypes (Fig. 1B). Notably, one *PG*
266 (Anaoc.0010s0426) showed the most up-regulation in these comparisons CR vs CI (12-fold), CR vs BR (18-fold)
267 and CI vs BI (10-fold). Moreover, two *PG* (Anaoc.0003s0794 and Anaoc.0005s1122) were exclusively up-
268 regulated in CR vs CI, corroborating with the high firmness loss (60 %) during CCP 76 development (Fig. 1B).
269 Interestingly, other two *PL* (Anaoc.0015s0315 and Anaoc.0004s1735) showed a 9-fold increase in BRS 265 ripe,
270 while in CCP 76 ripe was observed 6 and 5-fold increase, respectively, suggesting it could imply their role in
271 pulp softening.

272 *PL* and *PG* have different responses to fruit ripening because the degradation of HG chain by *PL* occurs
273 by a β -elimination reaction in contrast to the hydrolytic mechanism of *PG* (Jimenez-Bermúdez et al. 2002).
274 Although silencing of *PG* had no apparent effect on tomato fruit softening, the antisense downregulation of the
275 *FaPGI* in strawberry resulted in firmer ripe fruit (Garcia-Gago et al. 2009; Wang et al. 2019). However, the
276 silencing of *PL* has been successfully applied for the modulation of fruit firmness in tomato and strawberry
277 without altering color, mass and soluble solids content (Jimenez-Bermúdez et al. 2002; Uluisik et al. 2016; Yang
278 et al. 2017; Wang et al. 2019). In cashew apple, *PG* and *PME* activities have received attention due to their direct
279 relation to fruit firmness (Figueiredo et al. 2001; Souza et al. 2016).

280 Thus, our results suggested that genes coding enzymes involved in the metabolism of pectins are
281 expressed in a coordinated way during cashew apple development. In immature cashew apple, the *PME* and *PAE*
282 presented higher gene expression level, while the expression of *PG* and *PL* genes was prevalent in ripe cashew
283 apple. Besides this, the *PME* activity precedes the *PG* and *PL* activities, consequently, it might be required
284 during the early phase of fruit development and once that *PL* and *PG* become active, the *PME* expression goes
285 down (Srivastava et al. 2016). Furthermore, these data suggest that in CCP 76 cashew apple, *PG* and *PL* might be

286 the major pectin solubilizing enzymes, while in BRS 265 cashew apple, only PL could be associated with this
287 process.

288 In the current study, one rhamnogalacturonan lyase (RGL; Anaoc.0012s0556) was up-regulated in ripe
289 stage to both CCP 76 and BRS 265 cashew apples, showing 3.6 and 3.2-fold changes, respectively (Fig. 6B). For
290 many fruit, the RGL can contribute strongly to cell wall disassembly during ripening. For example, the silencing
291 of *FaRGL* resulted in firmer strawberry due to the maintenance of cell wall middle lamella, supporting the idea
292 that this gene plays a vital role in fruit softening (Molina-Hidalgo et al. 2013).

293 The loss of neutral sugars from side chains of pectins also seems to contribute for the cell wall
294 disassembly process and consequently fruit softening because neutral chains might anchor pectins to the wall
295 through binding to matrix glycans or cellulose (Popper and Fry 2005; Zykwinska et al. 2005). Therefore, the loss
296 of arabinan and galactan side chains from RG-I could induce pectin solubilization indirectly, by increasing wall
297 porosity, allowing access of other hydrolase enzymes to their substrate (Paniagua et al. 2014). Overall, the
298 galactosidase genes were down-regulated during cashew apple development, except one β -galactosidase gene
299 (Anaoc.0007s0563) showed relation to peduncle softening of BRS 265 (Fig. 6A). Supporting this idea, the
300 silencing of *Fa β Gal4* increased the galactose content in the cell wall of transgenic strawberry fruit, resulting in
301 fruit firmer (Paniagua et al. 2016). Similarly, Smith et al. (2002) observed an increase in firmness of transgenic
302 tomato fruit with a silenced β -galactosidase gene.

303 The hemicellulose is a common component of the cell wall. Its xyloglucan backbone is composed of
304 β (1,4)-linked glucose residues that have α (1,6)-linked xylosyl side chains (Lampugnani et al. 2018). In our study,
305 few hemicellulose related genes were differentially expressed during cashew apple development (Fig. 6C). Only
306 one β -xylosidase gene (XYL; Anaoc.0006s1525) showed higher expression in ripe genotypes, while other β -
307 xylosidase gene (Anaoc.0642s0001) was specifically up-regulated in CCP 76 ripe. Our data suggest these genes
308 may be associated with removal of xylosyl groups present in branching chains of hemicellulose, contributing to
309 softening of cashew apple. Figueiredo et al. (2002) found no significant reduction in hemicellulose content
310 during development of CCP 76 cashew apple.

311 The activity of some enzymes such as expansins (EXP) and xyloglucosyltransferase/endohydrolase
312 (XTH) allow the access of the cell wall hydrolases to the wall matrix glycan, playing important role in the fruit
313 softening. In general, a total of six *EXP* was more expressed in the immature than ripe CCP 76 (Fig. 6D). On the
314 other hand, the gene expression increase was noticed to two *EXP* (Anaoc.0011s0309 and Anaoc.0011s0308)
315 during cashew apple development, which may be closely related to firmness loss in this fruit. With regard to

316 *XTH*, two genes (Anaoc.0019s0860 and Anaoc.0013s1113) expression increased dramatically (> 8-fold) at the
317 ripe cashew apples (Fig. 6D). Additionally, the increased expression of two *XTH* (Anaoc.0008s1378 and
318 Anaoc.1311s0001) and one *XTH* (Anaoc.0003s1889) in ripe cashew apple was noticed in BR vs BI and CR vs CI,
319 respectively.

320 These enzymes work to fine-tune wall expansion and cell growth, while at the same time providing
321 structural support and mechanical stability (Lampugnani et al. 2018). The high expression of *EXP* in immature
322 fruit has been associated with the lignification process, suggesting there is a flux of water and nutrients from the
323 tree through immature cashew apple to the nut (Yang et al. 2008; Carvajal et al. 2015). Notably, the highest
324 number of up-regulated *EXP* in immature peduncle may be related to increased growth of CCP 76 in relation to
325 BRS 265 cashew apple during fruit development (Choi et al. 2006). Besides, the later ripening process requires
326 the presence of *EXP* and *XTH* to loosen the cell walls (Yu et al. 2012). The importance of these enzymes is due
327 to *EXP* modifying the interactions between hemicellulose and cellulose, resulting in wall relaxation. Whereas
328 *XTH* can cleave and re-ligate xyloglucan backbones, possibly incorporating new xyloglucan fragments into the
329 cell wall (Cosgrove 2005; Eklof and Brumer 2010).

330 In tomato, the down-regulation of *SIEXPI* delayed fruit softening (Minoia et al. 2016). Likewise, the
331 *EXP* seems to play an important role in mango softening since three *EXP* showed higher expression values (>
332 10-fold) from immature to ripe fruit (Srivastava et al. 2016). Moreover, the overexpression of the *FvXTH6* or
333 *FvXTH9* in strawberry resulted in accelerated color change, faster ripening and decreased firmness compared to
334 the control fruit (Witasari et al. 2019). On the other hand, the overexpression of the *SIXTH1* in tomato reduced
335 fruit softening, suggesting that this gene could be involved in the maintenance of cell wall structure rather than
336 cell wall disassembly (Miedes et al. 2010).

337 Cellulase is a complex enzyme formed by three different proteins: endoglucanase (*GH9*), exoglucanase
338 and β -glucosidase. *GH9* and exoglucanase transform cellulose into small cellooligosaccharides and then β -
339 glucosidase hydrolyzes the cellooligosaccharides into glucose (Sathya and Khan 2014; Sindhu et al. 2016). In
340 our study were identified two up-regulated *GH9* (Anaoc.0002s0304 and Anaoc.0004s2299), highlighting the
341 Anaoc.0004s2299 that showed approximately 12-fold increase in ripe cashew apples of both genotypes (Fig. 6E).
342 In view of this, we speculate that above gene might be the main responsive to the cellulose degradation in
343 cashew apples.

344 Besides cell wall disassembly, its biosynthesis also seems to affect its structure and then fruit softening.
345 In cashew apple, genes related to cell wall biosynthesis were up-regulated exclusively during CCP 76 ripening

346 (Supplementary Table S5). Among them, we observed cellulose synthase genes and pectin matrix biosynthesis
347 related genes (UDP-glucuronate 4-epimerase and polygalacturonate 4-alpha galacturonosyltransferase).

348 Simultaneous up-regulation of multiple genes of the same family during softening suggests the
349 complexity of the softening process. In addition, although the two genotypes evaluated here share many DEGs in
350 common, each genotype showed a specific firmness loss rate. BRS 265 cashew apples are firmer when immature
351 and maintain more firmness than CCP 76 during all development (Fig. 1). According to our results, this behavior
352 may be explained by some reasons. The high amount of *EXP* expressed in immature CCP 76 genotype can have
353 contributed to higher size expansion due to intense intercellular relaxation accompanied by the water
354 accumulation, resulting in lower firmness of this pseudofruit (Fig. 1 and 6). Throughout the development,
355 continuous cell wall loosening is observed together with up-regulation (*PG*, *PL* and *PAE*) and down-regulation
356 (*PMEI*) of many genes involved in the alteration in HG may contribute to softening of ripe CCP 76 cashew apple
357 (Fig. 6). Besides this, the positive regulation of many genes involved in cell wall biosynthesis could signal an
358 attempt to stop the excessive firmness loss in ripe CCP 76 (Fig. 6). Therefore, the differential expression changes
359 in various cell wall modifying enzymes-coding genes in CCP 76 and BRS 265 cashew apple suggest differences
360 in cell wall composition of these two genotypes.

361

362 3.6. Genes involved in the biosynthesis of anthocyanins in cashew apple

363 The mechanism of anthocyanins accumulation in cashew apple was estimated evaluating expression
364 patterns of structural genes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. Overall, 34 DEGs encoding proteins
365 related to these pathways were mainly more expressed in ripe cashew apples (Fig. 7).

366 Anthocyanins are generally synthesized via phenylpropanoid pathway, which constitutes the
367 biosynthetic route most studied in detail among others that integrates the secondary metabolism in plants
368 (Jaakola 2013). In this pathway, phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*), cinnamate-4-hydroxylase (*C4H*) and 4-
369 coumaroyl-CoA ligase (*4CL*) catalyze the conversion of phenylalanine to 4-coumaroyl-CoA. In the present study,
370 we identified that *PAL* was most expressed in ripe cashew apple, while *C4H* and *4CL* showed higher expression
371 level in immature peduncles (Fig. 7). The *PAL* up-regulation can be related to anthocyanin content augmented in
372 peduncles (Fig. 1C). Besides this, trans-cinnamic acid product of the *PAL* activity seems to be a precursor of
373 flavor volatiles of Brazilian cashew apples (Talasila and Shaik 2015).

374 On the other hand, the up-regulation of *C4H* and *4CL* in immature fruit can be associated with lignin
375 biosynthesis. Despite the lignin is not generally found in the pulp of fruit, pear (*Pyrus communis* L) and cashew

376 apple are exceptions because they are botanically considered as accessory being originated from floral receptacle
377 and peduncle, respectively (Seymour et al. 2013). Consistent with this, some genes involved in monolignol
378 biosynthesis were differentially expressed during cashew apple development (Supplementary Table S5).

379 The flavonoid pathway begins with the action of chalcone synthase (CHS), which is responsible by the
380 condensation of one molecule of 4-coumaroyl-CoA and three molecules of malonyl-CoA, producing a chalcone
381 (Jaakola 2013). Then, chalcone isomerase (CHI) subsequently catalyzes the stereo-specific cyclization of
382 chalcones into flavanones. Regarding the *CHS*, five genes were more expressed in ripe cashew apple (Fig. 7).
383 Interestingly, two *CHS* (Anaoc.0620s0006 and Anaoc.0620s0008) were abundantly expressed in BRS 265
384 compared to CCP 76 cashew apple, showing high log₂FC values between immature and ripe fruit, respectively.
385 On the other hand, one *CHS* (Anaoc.0008s0742) and three *CHI* (Anaoc.0019s0714, Anaoc.0909s0007 and
386 Anaoc.0011s0700) exhibited up-regulation only during CCP 76 development. Therefore, the results presented
387 here suggest that *CHS* is associated with anthocyanin accumulation in BRS 265 genotype, while *CHS* and *CHI*
388 could be related to increased anthocyanin in CCP 76 cashew apple. (Fig. 7).

389 In this point, the flavonoid pathway gain branches, where flavanones can be converted to isoflavones,
390 flavones and dihydroflavonols due to the action of enzymes: isoflavone synthase (IFS), flavone synthase (FNS)
391 and flavonoid 3'-monooxygenase (F3'H) or flavanone 3-hydroxylase (F3H), respectively (Grotewold 2006). In
392 our study, four *F3'H* were up-regulated in ripe cashew apples, while *FNS* (Anaoc.0012s0035) showed a sharply
393 increase (24-fold) mainly during CCP 76 development. In particular, F3H converts flavanone into the
394 dihydrokaempferol (precursor of orange pelargonidin), which can be used by F3'H to produce dihydroquercetin
395 (precursor of red cyanidin) (Chaves-Silva et al. 2018). These results suggest that flavones and dihydroflavanones
396 biosynthesis are more active pathways inside flavonoids metabolism in cashew apples.

397 Dihydroflavonols can be oxidized either by flavonol synthase (FLS) to form flavonols or reduced by
398 dihydroflavonol 4-reductase (DFR) to produce leucoanthocyanidins in the first dedicated step for anthocyanin
399 biosynthesis (Li 2014). In our study, many *FLS* and *DFR* were more expressed in ripe cashew apple (Fig. 7).
400 Interestingly, high *DFR* (Anaoc.0009s0342) expression was associated to high anthocyanin content in immature
401 and ripe BRS 265 (red-peel genotype). In addition, one *FLS* (Anaoc.0017s0663) increased considerably in BR vs
402 BI (12-fold) and CR vs CI (12.2-fold). Consistent with this, the FLS activity increased abruptly from immature
403 to ripe cashew apple of CCP 76 genotype (Cunha et al. 2017). Cashew apples are known due to their high
404 flavonol levels, which the flavonol myricetin was found as the main phenolic constituent, followed by quercetin
405 and kaempferol (Bataglion et al. 2015). The increase in *FLS* expression correlated with flavonol accumulation

406 was reported in satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.), species that belong to Sapindales (the same order of
407 cashew apple) (Moriguchia et al. 2002).

408 The expression imbalance of *DFR* and *FLS* may represent a key mechanism for regulating color tissue
409 in plants. In this context, transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) overexpressing *PtDFR* displayed down-
410 regulation of the endogenous *FLS*, and hence the anthocyanin synthesis, resulting in red flowers (Luo et al.
411 2016). Conversely, the abundance of flavonols increased when *FLS* was overexpressed or *DFR* was silenced in
412 transgenic crabapple leaves (*Malus* spp.) (Tian et al. 2015). Thus, it is probable that the overexpression of *DFR*
413 and *FLS* could repress each other (Luo et al. 2016).

414 Alternatively, leucoanthocyanidins, the products of *DFR* action, can follow two different pathways: (1)
415 they can be converted into catechin (2,3-trans-flavan-3-ol) due to activity of the leucoanthocyanidin reductase
416 (*LAR*) or (2) generate anthocyanidin by leucoanthocyanidin dioxygenase (*LDOX*) (Grotewold 2006). Curiously,
417 we observed high *LAR* (Anaoc.0002s0626) and low *LDOX* (Anaoc.0015s0462) expression in ripe cashew apples
418 (Fig. 7). In other words, the flow of leucoanthocyanidins seems to be more active to the production of catechin
419 than anthocyanidin in ripe fruit. Similarly, transgenic tobacco overexpressing *TcLAR* had decreased
420 anthocyanidin levels and increased catechin content, build unit of proanthocyanidin (PAs; also called condensed
421 tannins) (Liu et al. 2013). Meanwhile, *LAR* was more highly expressed in green than red peel pear, which
422 promoted the process of PAs pathway and contributed to the formation of green peel pear (Yang et al. 2015).

423 PAs have been of considerable interest in cashew apple because of their importance for the astringent
424 flavor of this fruit (Das and Arora 2017). In cashew apple, a trace amount of delphinidin (type of anthocyanidin)
425 was detected, whereas it was found the 927 mg kg⁻¹ of PAs constituted mainly of epigallocatechin associated
426 with epicatechin units (Michodjehoun-Mestres et al. 2009b; Queiroz et al. 2011). Intriguingly, Cunha et al. (2017)
427 did not detect *LAR* activity in cashew apples, while we observed the *LAR* up-regulation. This could be because
428 increase in transcription were not being translated into proteins. Besides this, many authors did not notice
429 leucoanthocyanidins, catechin or PAs in cashew apples, suggesting that characteristic bitter and astringent flavor
430 of this fruit can be related to presence of the hydrolysable tannins as monogalloyl diglucoside and digalloyl
431 glucoside (Brito et al. 2007; Marc et al. 2012).

432 Regarding flavonoid glucosylation, flavonols are almost exclusively glycosylated preferentially in 3-
433 position of the hydroxyl group in fruit (Seymour et al. 2013). For instance, peduncles of cashew apple exhibited
434 the tendency to having relatively high amounts of the glycosylated flavonols such as myricetin 3-o-glucoside,
435 myricetin 3-o-rhamnoside, quercetin 3-o-rhamnoside and quercetin 3-o-galactoside (Gordon et al. 2012; Filho et

436 al. 2019). Meanwhile, anthocyanins are produced from anthocyanidin glucosylation, reaction that plays an
437 important role in their stability and water solubility (Fang et al. 2019). In this study, we observed that flavonol 3-
438 o-glucosyltransferase (UGT71C4; Anaoc.0001s1795) was down-regulated from immature to ripe cashew apple
439 (Fig. 7). On the other hand, the up-regulation of anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase (UGT78D2;
440 Anaoc.0008s1150) can be associated to increased anthocyanin content noticed during cashew apple development.

441 Overall, we attributed the limited number of DEGs related to anthocyanin biosynthesis found in this
442 study to the sample composition since it consisted of a mixture of peel and pulp (made up mainly of pulp) of
443 cashew apple. This might have mitigated the observation of genes related to color expressed mainly in the peel.
444 Undoubtedly, peel is the richest tissue in pigments, since during fruit ripening occurs the alteration of its color
445 due probably to an increase in the expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis (Schweiggert et al.
446 2016). For instance, the *LDOX* and *UGT* expressions were positively correlated with anthocyanin content in peel
447 of pear and pulp of blood orange, both exhibit red tissues (Cotroneo et al. 2006; Yang et al. 2015). In accordance
448 with this, the low expression of *UGT* in ripe strawberry was associated with the redirection of anthocyanin to
449 PAs (Griesser et al. 2008).

450 Flavonoid biosynthesis is modulated mainly at the transcriptional level by transcription factors such as
451 MYB, basic helix–loop–helix (bHLH) and WD40 families (Xu et al. 2015). Hence, MYB regulates flavonol
452 biosynthesis, while MYB-bHLH-WD40 (MBW) ternary transcriptional complex activates the production of
453 anthocyanin and PAs plants (Li 2014; Xu et al. 2015; Gonzalez et al. 2016). In our study, numerous *MYB* and
454 *bHLH* transcription factors genes were identified as differentially expressed during cashew apple development
455 (Supplementary Table S9). Interestingly, only one predicted *WD40* transcription factor (Anaoc.0002s2092)
456 displayed increased expression in both ripe cashew apple genotypes.

457 It is known that different MYB family members can control separately the biosynthesis of different
458 flavonoids. For instance, *MYB4* and *MYB32* were discovered by inducing lignin biosynthesis, acting as
459 repressors of the anthocyanin pathway. Whereas *MYB7* and *MYB4* were found to repress the flavonoid
460 biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* (Preston et al. 2004; Fornalé et al. 2014). However, a recent study revealed
461 that *MYB10* is a primary MYB candidate that activates anthocyanin accumulation in the peel pear, probably
462 forming a functional complex with bHLH (Qian et al. 2017). Indeed, the *PgWD40* was induced up to 60-fold in
463 black peel compared to acyanic peel of pomegranate fruit (*Punica granatum*), thus considered the main factor
464 responsible for activating the expression of *PgDFR* and anthocyanin accumulation (Rouholamin et al. 2015).

465 The greatest transcriptomic differences related to flavonoid biosynthesis occurred during cashew apple

466 development. Supporting this idea, the up-regulation of the PAL, CHS, CHI, F3H/F3'H, DFR and UGT genes
467 might be the reason for the anthocyanin accumulation in ripe fruit, while C4H and 4CL genes may be
468 responsible by lignin biosynthesis in immature fruit (Fig. 1 and 7). Additionally, the differential expression of
469 different genes involved in the flavonoid pathway suggests that cashew apples have different flavonoids
470 accumulation (flavone, flavonol, flavanone and chalcone) during ripening. For instance, the lower expression of
471 *LDOX* and the higher expression of *LAR* suggest that ripe cashew apple has more condensed tannins than
472 anthocyanins.

473 Curiously, major transcriptomic differences between the orange-peel and red-peel cashew apple
474 genotypes were not clearly shown for the anthocyanin accumulation. Although the BRS 265 cashew apple
475 showed higher anthocyanin content than CCP 76 cashew apple, it was possible to observe genes related to this
476 process just when comparing these fruit in immature stage (Fig. 1 and 7). Therefore, the differential expression
477 of PAL, C4H and CHS genes can be associated with higher anthocyanin in immature BRS 265 cashew apple
478 compared to immature CCP 76 cashew apple. Hence, these genes may be responsible for early high
479 accumulation of anthocyanin in BRS 265 genotype. Regarding ripe stage, few anthocyanin related DEGs in
480 pericarp of cashew apple happened because the pigment biosynthesis occurs mainly in peel of fruit, tissue where
481 probably have a high gene expression of these genes. It could be interesting to study using just the peel of
482 cashew apple to know more about the pigmentation process at its molecular level.

483

484 **3.7. qRT-PCR and RNA-seq results show good correlation**

485 The reliability of our RNA-seq data was validated by qRT-PCR (Fig. 8). In this regard, six candidate
486 reference genes selected from RNA-seq results (*ACT*, *EIF*, *FBOX*, *RPOL*, *SAND* and *URK*) revealed average
487 expression stability (M) value of 0.69 calculated by geNorm (Supplementary Figure S1). Thus, genes presenting
488 M-values lower than the default limit of 1.5 were considered stable, as proposed by Vandesompele et al. (2002)
489 suggesting that these six candidate genes are stable in both stages and genotypes. GeNorm also calculated the
490 optimal number of genes suitable for normalization and returned the V_n/V_{n+1} value of sequential combinations
491 (Hellemans et al. 2007). Among the six stable genes, just three reference genes were enough to data
492 normalization, since $V_{3/4}$ value was 0.13, below the adopted threshold value of 0.15 (Vandesompele et al. 2002).
493 The best combination of genes for total samples of cashew apple development was *RPOL*, *SAND* and *ACT*
494 (Supplementary Figure S1).

495 After, the expression of six genes related to flavonoids biosynthesis (*FLS*, *LAR* and *PAL*) and cell-wall

496 disassembling (*PG*, *PL* and *XTH*) during cashew apple development were evaluated using qRT-PCR (Fig. 8).
497 Five target genes revealed positive and high Pearson's correlation coefficient ($r > 0.975$) between RNA-seq and
498 qRT-PCR results, with exception of *XTH* that showed lower correlation ($r = 0.369$). Anyway, the *XTH* presented
499 a positive correlation coefficient, indicating that the expression of this gene in both techniques showed the same
500 direction. Thus, these results corroborate the reliability of results originated with RNA-seq technique.

501

502 **4. Conclusion**

503 In summary, the present study shows a comparative transcriptome analysis of two contrasting cashew
504 apple genotypes (CCP 76 and BRS 265) in order to explore key genes involved in specific traits (firmness and
505 flavonoid content). To our best knowledge, the present study is the first to report the transcriptomic sequencing
506 of peduncle of cashew apples. Through transcriptome analyses, we provided a comprehensive understanding of
507 the major pathway involved in development of cashew apple, and hence responsible by fruit changes. In
508 flavonoid biosynthesis and cell wall disassembly specifically, we identified genes that can potentially contribute
509 to improvement of these metabolisms during cashew apple ripening. In addition, our results contribute to the
510 elucidation of molecular mechanisms involved in the regulation of these metabolisms in fruit. Furthermore, we
511 showed key genes that can be interesting to highlight the uniqueness of each studied genotype and can provide a
512 knowledge guide for improving quality traits. Therefore, our findings provide a handout in developing genotypes
513 by genetic manipulation of the desired trait, reducing the risk of sharp softening and valorization in commercial
514 cashew production.

515

516 **Data availability**

517 The sequencing project has been deposited at the SRA database under the accession number PRJNA657300.

518

519 **Declarations of interest**

520 All authors read the manuscript and declare no conflict of interest.

521

522 **Funding**

523 This research was supported by INCT, CNPq, FAPESP and CAPES.

524

525 **References**

- 526 Afzal M, Alghamdi SS, Migdadi HH, Khan MA, Mirza SB, El-Harty E (2020) Legume genomics and
527 transcriptomics: From classic breeding to modern technologies. *Saudi J Biol Sci* 27:543-555.
- 528 Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped blast and psi-
529 blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402.
- 530 Anders S, Pyl PT, Huber W (2015) HTSeq: a Python framework to work with high throughput sequencing data.
531 *Bioinformatics* 31:166-169.
- 532 Andrews S (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available in: <
533 <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>>.
- 534 Bataglioni GA, Silva FM, Eberlin MN, Koolen HH (2015) Determination of the phenolic composition from
535 Brazilian tropical fruits by UHPLC–MS/MS. *Food Chem* 180: 280-287.
- 536 Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to
537 multiple testing. *J R Stat Soc* 57:289–300.
- 538 Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data.
539 *Bioinformatics* 30: 2114–2120.
- 540 Brito ES, Araújo MCP, Lin L, Harnly J (2007) Determination of the flavonoid components of cashew apple
541 (*Anacardium occidentale* L.) by LC-DAD-ESI/MS. *Food Chem* 105:1112-1118.
- 542 Brummell DA (2006) Cell wall disassembly in ripening fruit. *Funct Plant Biol* 33:103–119.
- 543 Carvajal F, Palma F, JAMILINA M, Garrido D (2015) Cell wall metabolism and chilling injury during postharvest
544 cold storage in zucchini fruit. *Postharvest Biol Technol* 108:68-77.
- 545 Carvalho DV, Santos FA, Lima RP, Viana AFSC, Fonseca SGC, Nunes PIG, Melo TS, Gallão MI, Brito ES
546 (2018) Influence of low molecular weight compounds associated to cashew (*Anacardium occidentale* L.) fiber
547 on lipid metabolism, glycemia and insulinemia of normal mice. *Bioact Carbohydr Diet Fibre* 13:1-6.
- 548 Chaves-Silva S, Santos AL, Chalfun-Júnior A, Zhao J, Peres LEP, Benedito VA (2018) Understanding the genetic
549 regulation of anthocyanin biosynthesis in plants – Tools for breeding purple varieties of fruits and vegetables.
550 *Phytochemistry* 153:11-27.
- 551 Choi D, Cho H, Lee Y (2006) Expansins: expanding importance in plant growth and development. *Physiol Plant*
552 126:511-518.
- 553 Cosgrove DJ (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:850-861.
- 554 Cotroneo PS, Russo MP, Ciuni M, Recupero GR, Piero ARL (2006) Quantitative real-time reverse transcriptase-
555 PCR profiling of anthocyanin biosynthetic genes during orange fruit ripening. *J Am Soc Hortic Sci* 131:537-543.

- 556 Cunha AG, Brito ES, Moura CFH, Ribeiro PRV, Miranda MRA (2017) UPLC-qTOF-MS/MS-based phenolic
557 profile and their biosynthetic enzyme activity used to discriminate between cashew apple (*Anacardium*
558 *occidentale* L.) maturation stages. J Chromatogr B 1051:24-32.
- 559 Das I, Arora A (2017) Post-harvest processing technology for cashew apple – A review. J Food Eng 194:87-98.
- 560 Deshpande AB, Anamika K, Jha V, Chidley HG, Oak PS, Kadoo NY, Pujari KH, Giri AP, Gupta VS. (2017)
561 Transcriptional transitions in Alphonso mango (*Mangifera indica* L.) during fruit development and ripening
562 explain its distinct aroma and shelf life characteristics. Sci Rep 7:1-19.
- 563 Dos Santos CP, Batista MC, da Cruz Saraiva KD, Roque ALM, Miranda, RS, Silva LMA, Moura CFH, Filho
564 EGA, Canuto KM, Costa JH (2019) Transcriptome analysis of acerola fruit ripening: insights into ascorbate,
565 ethylene, respiration, and softening metabolisms. Plant Mol Biol 101: 269-296.
- 566 Eklof JM, Brumer H (2010) The XTH gene family: an update on enzyme structure, function, and phylogeny in
567 xyloglucan remodeling. Plant Physiol 153:456-466.
- 568 Fang Z, Hou Z, Wang S, Liu Z, Wei S, Zhang Y, Song J, Yin J (2019) Transcriptome analysis reveals the
569 accumulation mechanism of anthocyanins in buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench*) cotyledons and
570 flowers. Int J Mol Sci 20:1493, 2019.
- 571 FAOSTAT (2018) Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome, Italy.
- 572 Figueiredo RW, Lajolo FM, Alves RE, Filgueiras HAC, Araújo NCC (2001) Alterações de firmeza, pectinas e
573 enzimas pectinolíticas durante o desenvolvimento e maturação de pedúnculos de cajueiro anão precoce
574 (*Anacardium occidentale* L. var *nanum*) CCP 76. Proc Am Soc Hortic Sci Trop 43:82-86.
- 575 Filho EA, Silva LM, Lima Y, Ribeiro P, Silva E, Zocolo G, Canuto K, Morais S, Castro AC, Brito E (2019)
576 Metabolomic Variability of Different Genotypes of Cashew by LC-Ms and Correlation with Near-Infrared
577 Spectroscopy as a Tool for Fast Phenotyping. Metabolites, 9:121.
- 578 Fornalé S, Lopez E, Salazar-Henao JE, Fernández-Nohales P, Rigau J, Caparros-Ruiz D (2014) AtMYB7, a new
579 player in the regulation of UV-sunscreens in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol 55:507-516.
- 580 Garcia-Gago JA, Posé S, Muñoz-Blanco J, Quesada MA, Mercado JA (2009) The polygalacturonase FaPG1
581 gene plays a key role in strawberry fruit softening. Plant Signal Behav 4:766-768.
- 582 Giusti MM, Wrolstad RE (2001) Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible
583 Spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry 1:F1. 2.1-F1. 2.13.
- 584 Gonzalez M, Salazar E, Cabrera S, Olea P, Carrasco B (2016) Analysis of anthocyanin biosynthesis genes
585 expression profiles in contrasting cultivars of Japanese plum (*Prunus salicina* L.) during fruit development.
586 Gene Expr Patterns 21:54-62.

- 587 Gordon A, Friedrich M, Matta VM, Moura CFH, Marx F (2012) Changes in phenolic composition, ascorbic acid
588 and antioxidant capacity in cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) during ripening. *Fruits* 67:267-276.
- 589 Goulao LF, Oliveira CM (2008) Cell wall modification during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends*
590 *Food Sci Technol* 19:4–25.
- 591 Griesser M, Vitzthum F, Fink B, Bellido ML, Raasch C, Munoz-Blanco J, Schwab W (2008) Multi-substrate
592 flavonol O-glucosyltransferases from strawberry (*Fragaria x ananassa*) achene and receptacle. *J Exp Bot*
593 59:2611-2625.
- 594 Grotewold E (2006) *The science of flavonoids*. New York: Springer, 274 p.
- 595 Hellemans J, Mortier G, Paeppe A, Speleman F, Vandesompele J (2007) qBase relative quantification framework
596 and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 8:R19.
- 597 Ibrahim RK, Muzac I (2000) The methyltransferase gene superfamily: a tree with multiple branches. *Recent Adv*
598 *Phytochem* 34:349-384.
- 599 Jaakola L (2013) New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trends Plant Sci* 18:477-
600 483.
- 601 Jiménez-Bermúdez S, Redondo-Nevado J, Muñoz-Blanco J, Caballero JL, López-Aranda JM, Valpuesta V,
602 Pliego-Alfaro F, Quesada MA, Mercado JA (2002) Manipulation of strawberry fruit softening by antisense
603 expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiol* 128:751–759.
- 604 Kanehisa M, Goto S (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 28:27-30.
- 605 Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL (2013) TopHat2: accurate alignment of
606 transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* 14:R36.
- 607 Lampugnani ER, Khan GA, Somssich M, Persson S (2018) Building a plant cell wall at a glance. *J Cell Sci*
608 131:jcs207373.
- 609 Langmead B, Salzberg SL (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9:357-359.
- 610 Li S (2014) Transcriptional control of flavonoid biosynthesis. Fine-tuning of the MYB-bHLH-WD40 (MBW)
611 complex. *Plant Signal Behav* 9:e27522.
- 612 Liu GL, Guo HH, Sun YM (2012) Optimization of the Extraction of Anthocyanins from the Fruit Skin
613 of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk and Identification of Anthocyanins in the Extract Using High-
614 Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (HPLC-ESI-MS). *Int J Mol*
615 *Sci* 13:6292-6302.
- 616 Liu Y, Shi Z, Maximova S, Payne MJ, Guiltinan MJ (2013) Proanthocyanidin synthesis in *Theobroma cacao*:
617 genes encoding anthocyanidin synthase, anthocyanidin reductase and leucoanthocyanidin reductase. *BMC Plant*

- 618 Biol 13:202.
- 619 Lopes MMA, Moura CFH, Aragão FAZ, Cardoso TG, Filho JE (2011) Caracterização física de pedúnculos de
620 clones de cajueiro anão precoce em diferentes estádios de maturação. Rev Ciênc Agron 42.
- 621 Lopes MMA, Miranda MRA, Moura CFH, Filho JE (2012) Bioactive compounds and total antioxidant capacity
622 of cashew apples (*Anacardium occidentale* L.) during the ripening of early dwarf cashew clones. Cienc Agrot 36.
- 623 Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with
624 DESeq2. Genome Biol 15:550.
- 625 Luo P, Ning G, Wang Z, Shen Y, Jin H, Li P, Huang S, Zhao J, Bao M (2016) Disequilibrium of Flavonol
626 Synthase and Dihydroflavonol-4-Reductase Expression Associated Tightly to White vs. Red Color Flower
627 Formation in Plants. Front Plant Sci 13:1257.
- 628 Ma L, Sun L, Guo Y, Lin H, Liu Z, Li K, Guo X (2020) Transcriptome analysis of table grapes (*Vitis vinifera* L.)
629 identified a gene network module associated with berry firmness. PloS one 15:e0237526.
- 630 Marc A, Ange KD, Achille TF, Georges AN (2012) Phenolic profile of cashew apple juice (*Anacardium*
631 *occidentale* L.) from Yamoussoukro and Korhogo (Côte d’Ivoire). J Appl Biosci 49:3331-3338.
- 632 Marshall OJ (2004) PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time
633 PCR. Bioinformatics 20:2471-2472.
- 634 Mercado JA, Pliego-Alfaro F, Quesada MA (2011) Fruit shelf life and potential for its genetic improvement.
635 Breeding for Fruit Quality, p. 81–104.
- 636 Michodjehoun-Mestres L, Amraoui W, Brillouet JM (2009a) Isolation, characterization, and determination of 1-
637 O-trans-cinnamoyl- β -D-glucopyranose in the epidermis and flesh of developing cashew apple (*Anacardium*
638 *occidentale* L.) and four of its genotypes. J Agric Food Chem 57:1377-1382.
- 639 Michodjehoun-Mestres L, Souquet J, Fulcrand H, Bouchut C, Reynes M, Brillouet J (2009b) Monomeric
640 phenols of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). Food Chem 112:851-857.
- 641 Miedes E, Herbers K, Sonnewald U, Lorences EP (2010) Overexpression of a cell wall enzyme reduces
642 xyloglucan depolymerization and softening of transgenic tomato fruits. J Agric Food Chem 58:5708-5713.
- 643 Minoia S, Boualem A, Marcel F, Troadec C, Quemener B, Cellini F, Petrozza A, Vigouroux J, Lahaye M,
644 Carriero F, Bendahmane A (2016) Induced mutations in tomato S1Exp1 alter cell wall metabolism and delay fruit
645 softening. Plant Sci 242:195-202.
- 646 Molina-Hidalgo FJ, Franco AR, Villatoro C, Medina-Puche L, Mercado JA, Hidalgo MA, Monfort A, Caballero
647 JL, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R (2013) The strawberry (*Fragaria* \times *ananassa*) fruit-specific
648 rhamnogalacturonate lyase 1 (*FaRGLyase1*) gene encodes an enzyme involved in the degradation of cell-wall

- 649 middle lamellae. *J Exp Bot* 64:1471-1483.
- 650 Moo-Huchin VM, Estrada-Mota I, Estrada-Léon R, Cuevas-Glory L, Ortiz-Vázquez E, Vargas MLV, Betancur-
651 Ancona D, Sauri-Duch E (2014) Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds
652 and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chem* 152:508-515.
- 653 Moriguchia T, Kita M, Ogawa K, Tomono Y, Endo T, Omura M (2002) Flavonol synthase gene expression
654 during citrus fruit development. *Physiol Plant* 114:251-258.
- 655 Moura CFH, Figueiredo RW, Alves RE, Silva ED, Araujo PGL, Maciel VT (2010) Increasing shelf life of early
656 dwarf cashew tree peduncle through reduction of storage temperature. *Cienc Agrotec* 34:140-145.
- 657 Obanda M, Owuor PO, Taylor SJ (1997) Flavanol composition and caffeine content of green leaf as quality
658 potential indicators of Kenyan black teas. *J Sci Food Agric* 74:209-215.
- 659 Oliveira NN, Mothé CG, Mothé MG, Oliveira LG (2020) Cashew nut and cashew apple: a scientific and
660 technological monitoring worldwide review. *J Food Sci Technol* 57:12-21.
- 661 Paniagua C, Posé S, Morris VJ, Kirby AR, Quesada MA, Mercado JA (2014) Fruit softening and pectin
662 disassembly: an overview of nanostructural pectin modifications assessed by atomic force microscopy. *Ann Bot*
663 114:1375–1383.
- 664 Paniagua C, Blanco-Portales R, Barceló-Muñoz M, García-Gago JA, Waldron KW, Quesada MA, Muñoz-Blanco
665 J, Mercado JA (2016) Antisense down-regulation of the strawberry β -galactosidase gene Fa β Gal4 increases cell
666 wall galactose levels and reduces fruit softening. *J Exp Bot* 67:619-631.
- 667 Pei M, Gu C, Zhang S (2019) Genome-wide identification and expression analysis of genes associated with
668 peach (*Prunus persica*) fruit ripening. *Sci Hortic* 246:317-327.
- 669 Popper ZA, Fry SC (2005) Widespread occurrence of a covalent linkage between xyloglucan and acidic
670 polysaccharides in suspension-cultured angiosperm cells. *Ann Bot* 96:91-99.
- 671 Prasanna V, Prabha TN, Tharanathan RN (2007) Fruit ripening phenomena – an overview. *Crit Rev Food Sci*
672 47:1-19.
- 673 Preston J, Wheeler J, Heazlewood J, Li SF, Parish RW (2004) AtMYB32 is required for normal pollen
674 development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 40:979-995.
- 675 Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR (2007) NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant
676 sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res* 35:501– 504.
- 677 Qian M, Ni J, Niu Q, Bai S, Bao L, Li J, Sun Y, Zhang D, Teng Y (2017) Response of miR156-SPL module
678 during the red peel coloration of bagging-treated Chinese sand pear (*Pyrus pyrifolia Nakai*). *Front Physiol* 8:550.
- 679 Queiroz C, Silva AJR, Lopes MLM, Fialho E, Valente-Mesquita VL (2011) Polyphenol oxidase activity, phenolic

- 680 acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) after processing. Food Chem
681 125:128-132.
- 682 Robinson MD, Mccarthy DJ, Smyth GK (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression
683 analysis of digital gene expression data. Bioinformatics 26:139-140.
- 684 Rouholamin S, Zahedi B, Nazarian-Firouzabadi F, Saei A (2015) Expression analysis of anthocyanin
685 biosynthesis key regulatory genes involved in pomegranate (*Punica granatum* L.). Sci Hortic 186:84-88.
- 686 Sathya TA, Khan M (2014) Diversity of glycosyl hydrolase enzymes from metagenome and their application in
687 food industry. J. Food Sci 79:2149-2156.
- 688 Savadi S, Muralidhara BM, Preethi P (2020) Advances in genomics of cashew tree: molecular tools and
689 strategies for accelerated breeding. Tree Genet 16:1-15.
- 690 Schweiggert RM, Vargas E, Conrad J, Hempel J, Gras CC, Ziegler JU, Mayer A, Jiménez V, Esquivel P, Carle R
691 (2016) Carotenoids, carotenoid esters, and anthocyanins of yellow-, orange-, and red-peeled cashew apples
692 (*Anacardium occidentale* L.). Food Chem 200:274-282.
- 693 Seymour G, Tucker GA, Poole M, Giovannoni J (2013) The molecular biology and biochemistry of fruit
694 ripening. John Wiley & Sons, 177-179.
- 695 Sindhu R, Binod P, Pandey A (2016) Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—An overview. Bioresour
696 Technol 199:76-82.
- 697 Smith DL, Abbott JA, Gross KC (2002) Down-regulation of tomato β -galactosidase 4 results in decreased fruit
698 softening. Plant physiol 129:1755-1762.
- 699 Souza KO, Viana RM, Oliveira LS, Moura CFH, Miranda MRA (2016) Preharvest treatment of growth
700 regulators influences postharvest quality and storage life of cashew apples. Sci Hortic 209:53-60.
- 701 Srivastava S, Singh RK, Pathak G, Goel R, Asif MH, Sane AP, Sane VA (2016) Comparative transcriptome
702 analysis of unripe and mid-ripe fruit of *Mangifera indica* (var. “Dashehari”) unravels ripening associated
703 genes. Sci Rep 6:1-13.
- 704 Sun L, Zhang Y, Cui H, Zhang L, Sha T, Wang C, Fan C, Luan F, Wang X (2020) Linkage Mapping and
705 Comparative Transcriptome Analysis of Firmness in Watermelon (*Citrullus lanatus*). Front Plant Sci 11:831.
- 706 Swain T, Hillis WE (1959) Phenolic constituents of *Prunus domestica* in quantitative analysis of phenolic
707 constituents. J Sci Food Agric 10:63–68.
- 708 Talasila U, Shaik KB (2015) Quality, spoilage and preservation of cashew apple juice: A review. J Food Sci
709 Technol 52:54-62.
- 710 Tamiello-Rosa CS, Cantu-Jungles TM, Iacomini M, Cordeiro LM (2019) Pectins from cashew apple fruit

- 711 (*Anacardium occidentale*): Extraction and chemical characterization. *Carbohydr Res* 483:107752.
- 712 Tian J, Han Z, Zhang J, Hu Y, Song T, Yao Y (2015) The Balance of Expression of Dihydroflavonol 4-reductase
713 and Flavonol Synthase Regulates Flavonoid Biosynthesis and Red Foliage Coloration in Crabapples. *Sci Rep*
714 5:12228.
- 715 Uluisik S, Chapman NH, Smith R, Poole M, Adams G, Gillis RB, Besong TMD, Sheldon J, Stieglmeier S,
716 Perez L et al. (2016) Genetic improvement of tomato by targeted control of fruit softening. *Nat. Biotechnol*
717 34:950-952.
- 718 Vandesompele J, Preter K, Pattyn F, Poppe B, Vanroy N, Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of
719 real-time quantitative RT-PCR by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3.
- 720 Vasconcelos MS, Gomes-Rochette NF, Oliveira MLM, Nunes-Pinheiro DCS, Tomé AR, Sousa FYM, Pinheiro
721 FGM, Moura CFH, Miranda MRA, Mota EF, Melo DF (2015) Anti-inflammatory and wound healing potential
722 of cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.) in mice. *Exp Biol Med* 240:1648-1655.
- 723 Wang D, Samsulrizal NH, Yan C, Allcock NS, Craigon J, Blanco-Ulate B, Ortega-Salazar I, Marcus SE, Bagheri
724 HM, Perez-Fons L, Fraser PD, Foster T, Fray R, Knox JP, Seymour GB (2019) Characterization of CRISPR
725 mutants targeting genes modulating pectin degradation in ripening tomato. *Plant Physiol* 179:544-557.
- 726 Witasari LD, Huang F, Hoffmann T, Rozhon W, Fry SC, Schwab W (2019) Higher expression of the strawberry
727 xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase genes Fv XTH 9 and Fv XTH 6 accelerates fruit ripening. *Plant J*
728 100:1237-1253.
- 729 Wu Y, Guo J, Zhou Q, Xin Y, Wang G, Xu L (2018) De novo transcriptome analysis revealed genes involved in
730 flavonoid biosynthesis, transport and regulation in *Ginkgo biloba*. *Ind Crops Prod* 124:226-235.
- 731 Xie C, Mao X, Huang J, Ding Y, Wu J, Dong S, Kong L, Gao G, Li C, Wei L (2011) KOBAS 2.0: a web server
732 for annotation and identification of enriched pathways and diseases. *Nucleic Acids Res* 39:W316–W322.
- 733 Xu W, Dubos C, Lepiniec L (2015) Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR
734 complexes. *Trends Plant Sci* 20:176-185.
- 735 Yang S, Sun C, Wang P, Shan L, Cai C, Zhang B, Zhang W, Li X, Ferguson I, Chen K (2008) Expression of
736 expansin genes during postharvest lignification and softening of ‘Luoyangqing’ and ‘Baisha’ loquat fruit under
737 different storage conditions. *Postharvest Biol Technol* 49:46-53.
- 738 Yang Y, Yao G, Yue W, Zhang S, Wu J (2015) Transcriptome profiling reveals differential gene expression in
739 proanthocyanidin biosynthesis associated with red/green skin color mutant of pear (*Pyrus communis* L.). *Front*
740 *Plant Sci* 6:795.
- 741 Yang L, Huang W, Xiong F, Xian Z, Su D, Ren M, Li Z (2017) Silencing of *S1PL*, which encodes a pectate lyase
742 in tomato, confers enhanced fruit firmness, prolonged shelf-life and reduced susceptibility to grey mould. *Plant*

-
- 743 Biotechnol J 15:1544-1555.
- 744 Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A (2010) Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for
745 selection bias. Genome Biol 11:R14.
- 746 Yu K, Xu Q, Da X, Guo F, Ding Y, Deng X (2012) Transcriptome changes during fruit development and ripening
747 of sweet orange (*Citrus sinensis*). BMC genomics 13:10.
- 748 Zykwinska AW, Ralet MCJ, Garnier CD, Thibault JFJ (2005) Evidence for *in vitro* binding of pectin side chains
749 to cellulose. Plant Physiol 139:397-407.
- 750

751 **Figure caption:**

752 **Fig. 1** The morphology of fruit, firmness and anthocyanin content in two cashew apples genotypes. (A) BRS 265
753 and CCP 76 cashew apples at two development stages (2 and 7). Scale bar = 2 cm. (B) Firmness and (C) total
754 anthocyanin contents of cashew apples. For each genotype and developmental stage, different capital letters
755 indicate significant differences between developmental stages, while different lowercase letters indicate
756 significant differences between genotypes, at $P < 0.05$. Vertical bars represent standard errors of the means (n=3).

757

758 **Fig. 2** Principal component analysis (PCA) and heatmap of gene expression analysis. (A) PCA plot based on the
759 normalized counts. Colored points inside the clusters represent biological replicates from different genotypes.
760 Values indicated on the axis of the factor map correspond to the percentage of total variance explained by each
761 axis (PC1 and PC2). (B) Heatmap showing the Euclidean distances between the samples calculated from the
762 regularized log transformation. Color from white to dark blue indicates increasing similarity between biological
763 replicates. BI: BRS 265 immature; BR: BRS 265 ripe; CI: CCP 76 immature; CR: CCP 76 ripe.

764

765 **Fig. 3** The numbers of differentially expressed genes (DEGs) during the cashew apple development. (A)
766 Numbers of DEGs in pairwise comparisons in immature and ripe of two different genotypes of cashew apple.
767 Blue and red bars represent down and up-regulated DEGs, respectively. (B) Venn diagram showing the number
768 of commonly and uniquely DEGs during CCP 76 and BRS 265 cashew apple development. Blue and red
769 numbers into graph represent down and up-regulated DEGs, respectively. BI: BRS 265 immature; BR: BRS 265
770 ripe; CI: CCP 76 immature; CR: CCP 76 ripe.

771

772 **Fig. 4** GO enrichment circle plots for the top 10 most significant GO categories for each comparison. (A) GO
773 analysis of DEGs between BR vs BI. (B) GO analysis of DEGs between CR vs CI. (C) The associated tables
774 present the GO term ID and function. Similar GO categories for two genotypes are bold. The outer circle shows
775 the relative log₂ fold change values for each gene: red and blue points showing up and down-regulated genes.
776 The inner quadrants are colored based on the z-score (relation between the number of up and down-regulated
777 genes) and their size based on the enrichment p-value: larger surface, lower the p-value and vice versa.

778

779 **Fig. 5** Top 19 metabolic pathways most represented during the cashew apple development according to the
780 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Black and gray bars represent the percentage of DEGs

781 calculated in relation to the number of enzyme families of each pathway (indicated by the Enzyme Commission
 782 number) to BRS 265 ripe (BR) vs BRS 265 immature (BI) and CCP 76 ripe (CR) vs CCP 76 immature (CI)
 783 comparisons, respectively. Only those pathways with corrected $P < 0.05$ are shown.

784

785 **Fig. 6** Modulation of genes related to cell wall disassembly during cashew apple development. These genes code
 786 enzymes responsible for (A) inhibition/degradation of side and (B) main chain of homogalacturonan; (C)
 787 degradation of hemicellulose chain, (D) cell wall relaxation and (E) degradation of cellulose chain. A color scale
 788 bar is shown at the top-right of the figure and corresponds to log₂ fold change values. Blue indicates the lowest
 789 expression and red indicates the highest expression. Asterisks indicate DEGs (genes that present |log₂ fold-
 790 change|>1 and corrected p-value threshold of 0.05) between stages and genotypes. Log₂ fold change values were
 791 used to compare libraries: BI (BRS 265 immature), BR (BRS 265 ripe), CI (CCP 76 immature) and CR (CCP 76
 792 ripe).

793

794 **Fig. 7** Modulation of flavonoid pathway during cashew apple development. A color scale bar is shown at the top-
 795 right of the figure and corresponds to log₂ fold change values. Blue indicates the lowest expression and red
 796 indicates the highest expression. Asterisks indicate DEGs (genes that present |log₂ fold-change|>1 and corrected
 797 p-value threshold of 0.05) between stages and genotypes. Log₂ fold change values were used to compare
 798 libraries: BI (BRS 265 immature), BR (BRS 265 ripe), CI (CCP 76 immature) and CR (CCP 76 ripe). PAL:
 799 phenylalanine ammonia-lyase; C4H: cinnamate-4-hydroxylase; 4CL: 4-coumaroyl-CoA ligase; CHS: chalcone
 800 synthase; CHI: chalcone isomerase; IFS: isoflavone synthase; FNS: flavone synthase; F3'H: flavonoid 3'-
 801 monooxygenase; F3H: flavanone 3-hydroxylase; DFR: dihydroflavonol 4-reductase; FLS: flavonol synthase;
 802 FLG: flavonol 3-o-glucosyltransferase; LDOX: leucoanthocyanidin dioxygenase; GT: anthocyanidin 3-O-
 803 glucosyltransferase; ANR: anthocyanidin reductase; LAR: leucoanthocyanidin reductase.

804

805 **Fig. 8** Expression of genes related to anthocyanin biosynthesis and cell wall disassembling quantified by RNA-
 806 seq (RNA sequencing) and qRT-PCR (Quantitative real-time PCR) analysis. The left y axis represents the
 807 relative gene expression levels analyzed by qRT-PCR (black columns) and the right y axis indicates the FPKM
 808 value from RNA sequencing (RNA-seq) data (white columns). The results were represented as mean ± standard
 809 deviation (n=3). The r letter indicates the Pearson's correlation coefficient. FLS: flavonol synthase; LAR:
 810 leucoanthocyanidin reductase; PAL: phenylalanine ammonia-lyase; PG: polygalacturonase; PL: pectate lyase;

811 XTH: xyloglucosyltransferase/endohydrolase.

812

813 **Supplementary Figure 1** Supplementary. geNorm analyses. **(A)** Average expression stability values of
814 candidate reference genes and **(B)** determination of the optimal number of candidate reference genes for
815 normalization.

816

817 **Supplementary Table 1** Number of filters reads mapped to cashew tree genome.

818

819 **Supplementary Table 2** Primer sequence, optimal annealing temperature and amplicon size of each evaluated
820 gene in this study.

821

822 **Supplementary Table 3** Normalized counts in Fragments Per Kilobase Million (FPKM).

823

824 **Supplementary Table 4** Summary of sequencing and data mapping. Total raw reads; total filter reads; Q30
825 percentage: proportion of nucleotides with quality value > 30; GC content percentage: GC content of total
826 nucleotides; Mapped reads (%).

827

828 **Supplementary Table 5** Identified differentially expressed genes (DEGs) to each studied comparison in this
829 study. The first column of table shows gene ID followed by its base mean, log2 fold change value, *P*-value,
830 adjusted *P*-value and differential expression (up or downregulated). BI: BRS 265 immature; BR: BRS 265 ripe;
831 CI: CCP 76 immature; CR: CCP 76 ripe.

832

833 **Supplementary Table 6** Common and exclusive differentially expressed genes (DEGs) during CCP 76 and BRS
834 265 cashew apple development. The table consists of gene ID and its identification in relation to *Arabidopsis*
835 *thaliana* to each studied comparison. BI: BRS 265 immature; BR: BRS 265 ripe; CI: CCP 76 immature; CR:
836 CCP 76 ripe.

837

838 **Supplementary Table 7** GO enrichment analysis during the cashew apple development. The table consists of
839 name and ID of GO term, besides its gene ontology classes: biological process (BP), cellular component (CC)
840 and molecular function (MF). Over and under represented *P*-value calculated to each GO term based on

841 information present in fourth and fifth columns. Only those GO terms with over represented P -value < 0.05 are
842 shown. The fourth column lists the number of up and downregulated genes to the studied comparisons assigned
843 to each GO term. The fifth column lists the number of background genes mapped to each GO term. The last
844 column shows the ID of DEGs enriched each GO term.

845

846 **Supplementary Table 8** Enriched metabolic pathways represented during the cashew apple development
847 according to the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). The first three columns show the name,
848 database and ID of pathways. The fourth column lists the number of up or downregulated genes to the studied
849 comparisons assigned to each pathway. The fifth column lists the number of background genes mapped to each
850 pathway. The last columns list the P -value and corrected P -value of the statistical test, genes names and
851 hyperlink to visualization of genes pathway in website. BI: BRS 265 immature; BR: BRS 265 ripe; CI: CCP 76
852 immature; CR: CCP 76 ripe.

853

854 **Supplementary Table 9** Gene ID, transcription factor family, best hit in *Arabidopsis thaliana*, e-value and
855 description for the best hit in each studied comparison in this study.

Fig1.

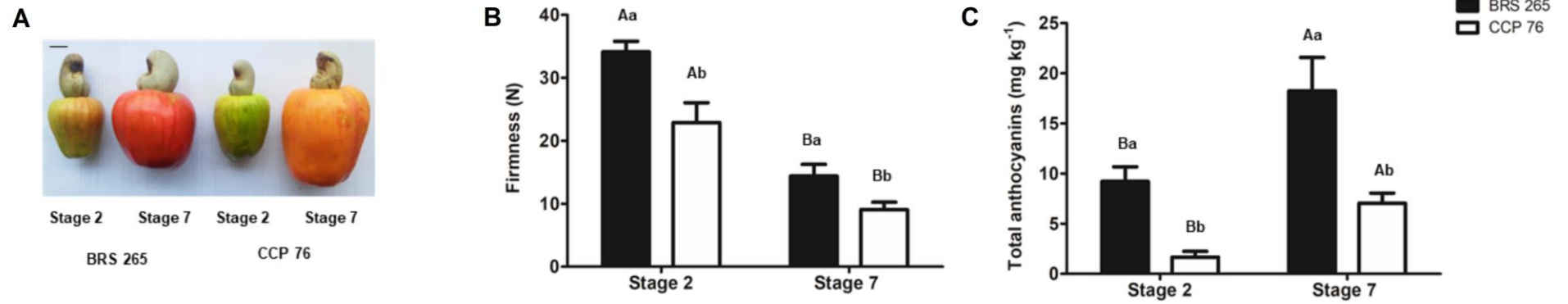


Fig2.

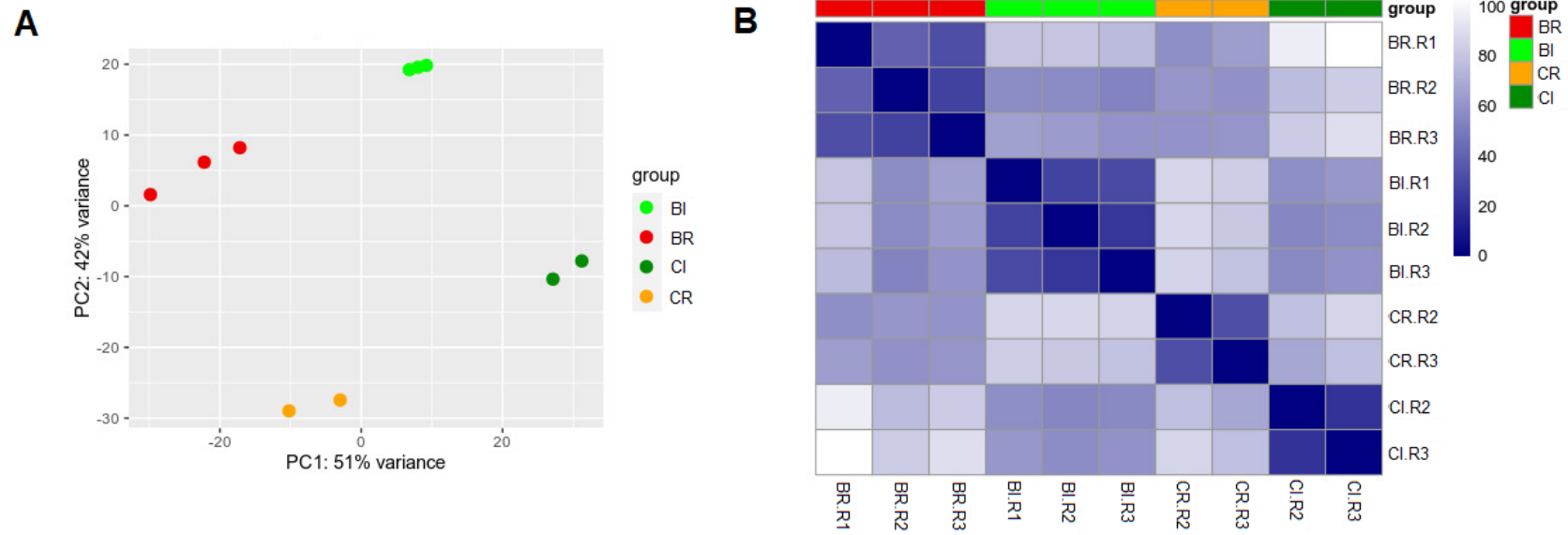


Fig3.

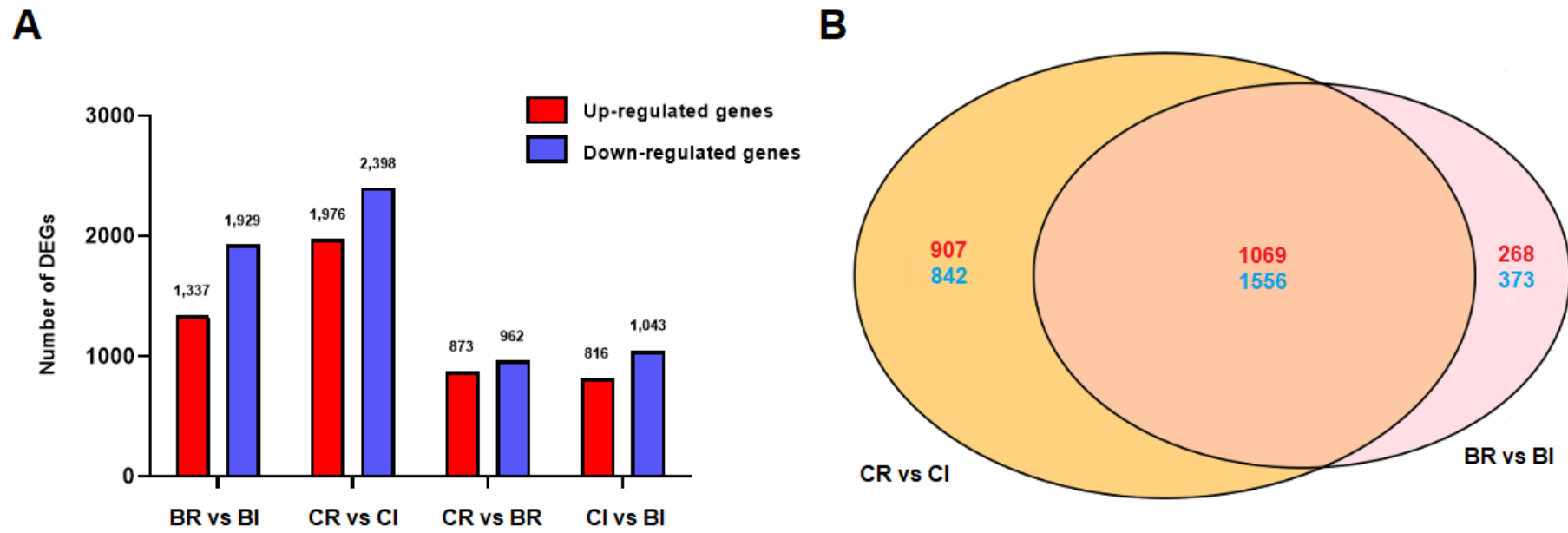


Fig4.

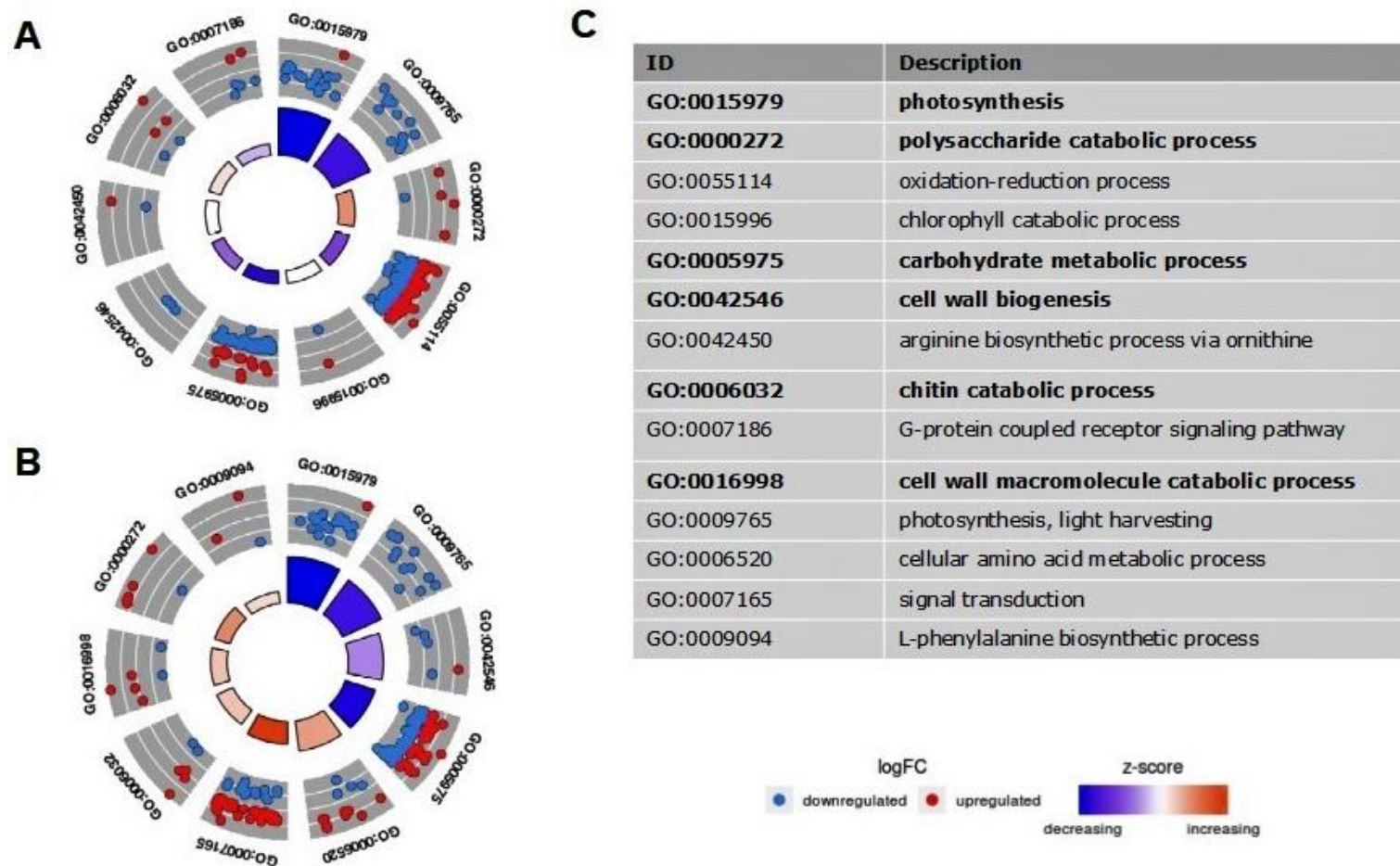


Fig5.

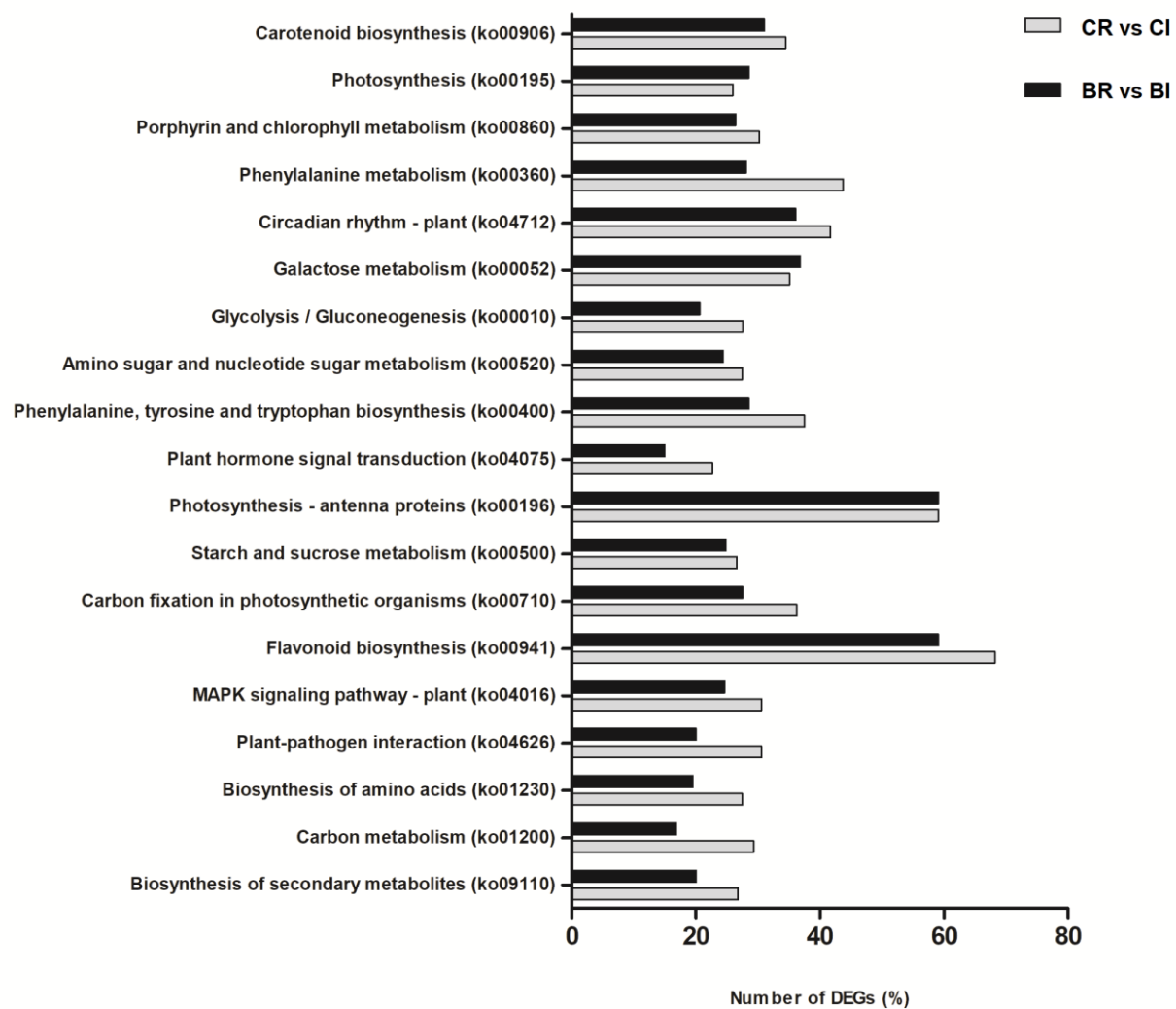


Fig6.

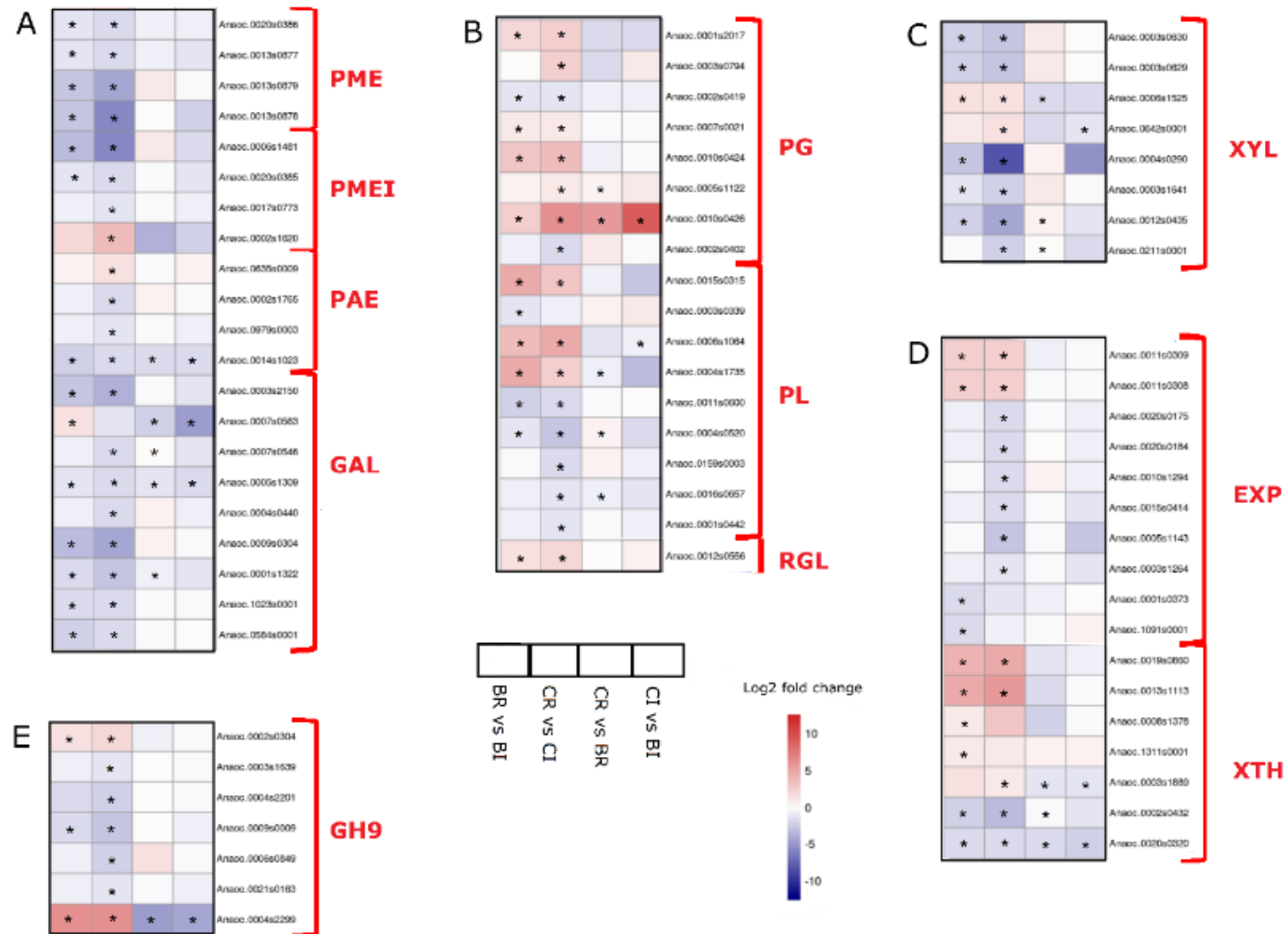


Fig7.

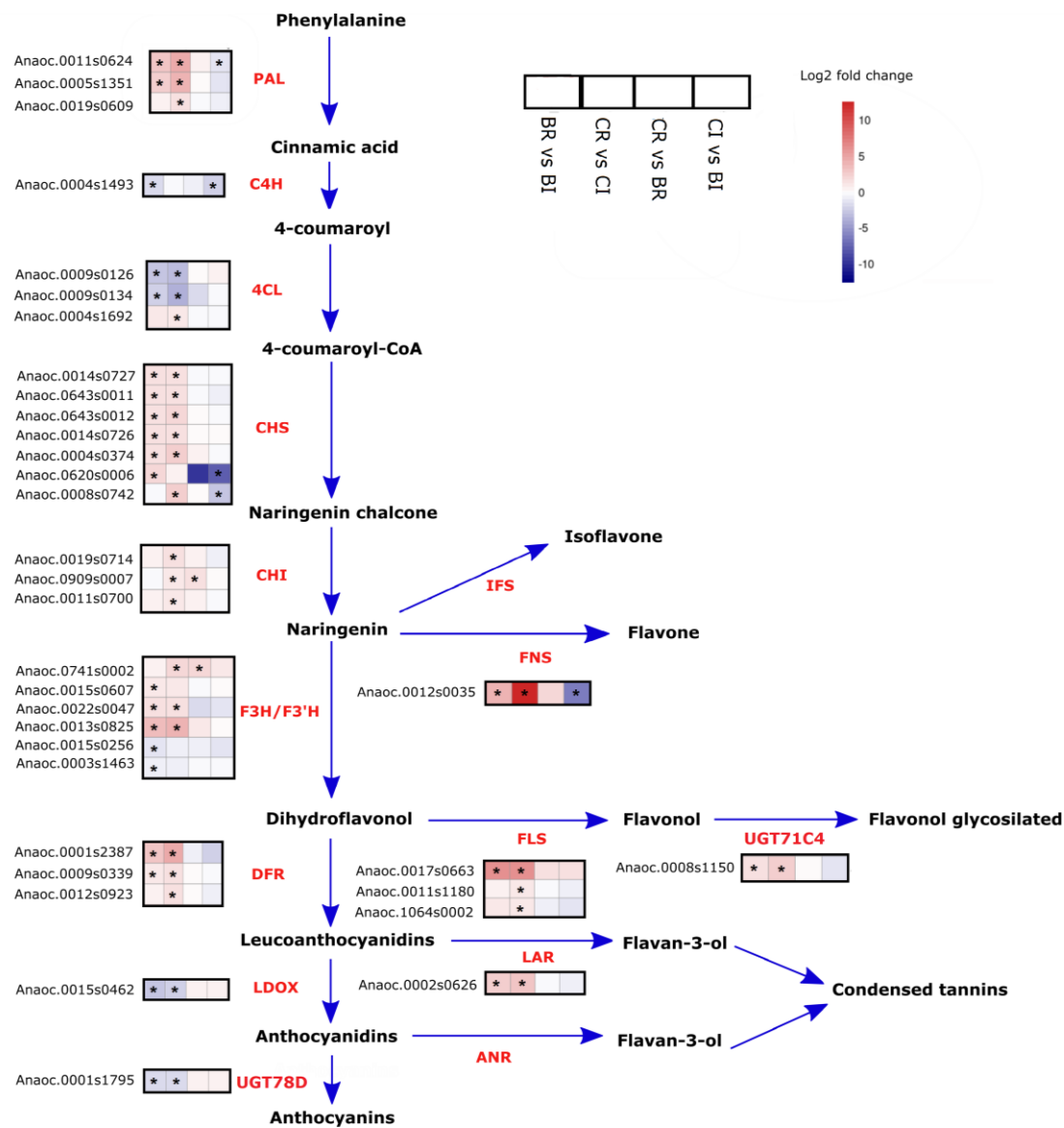
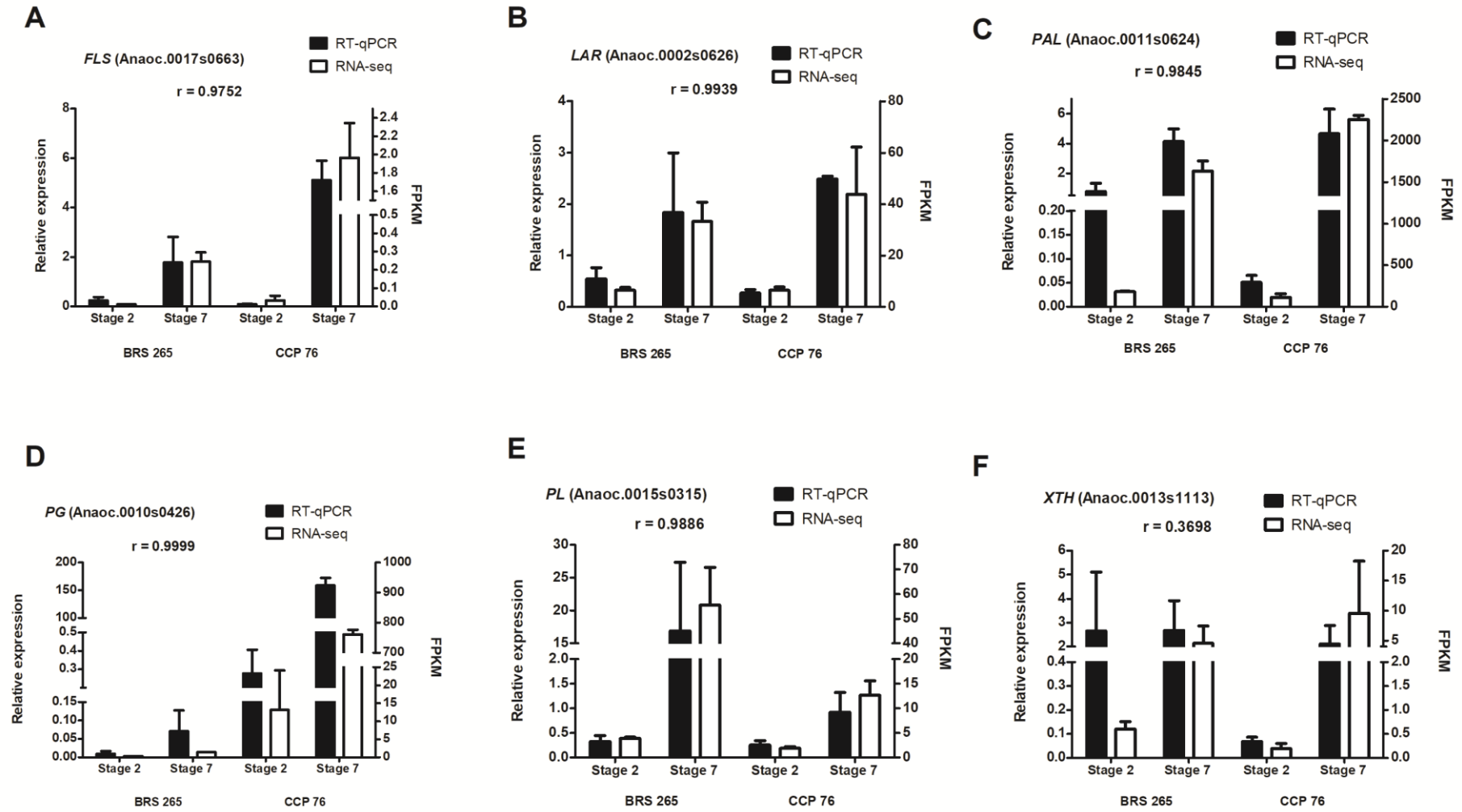
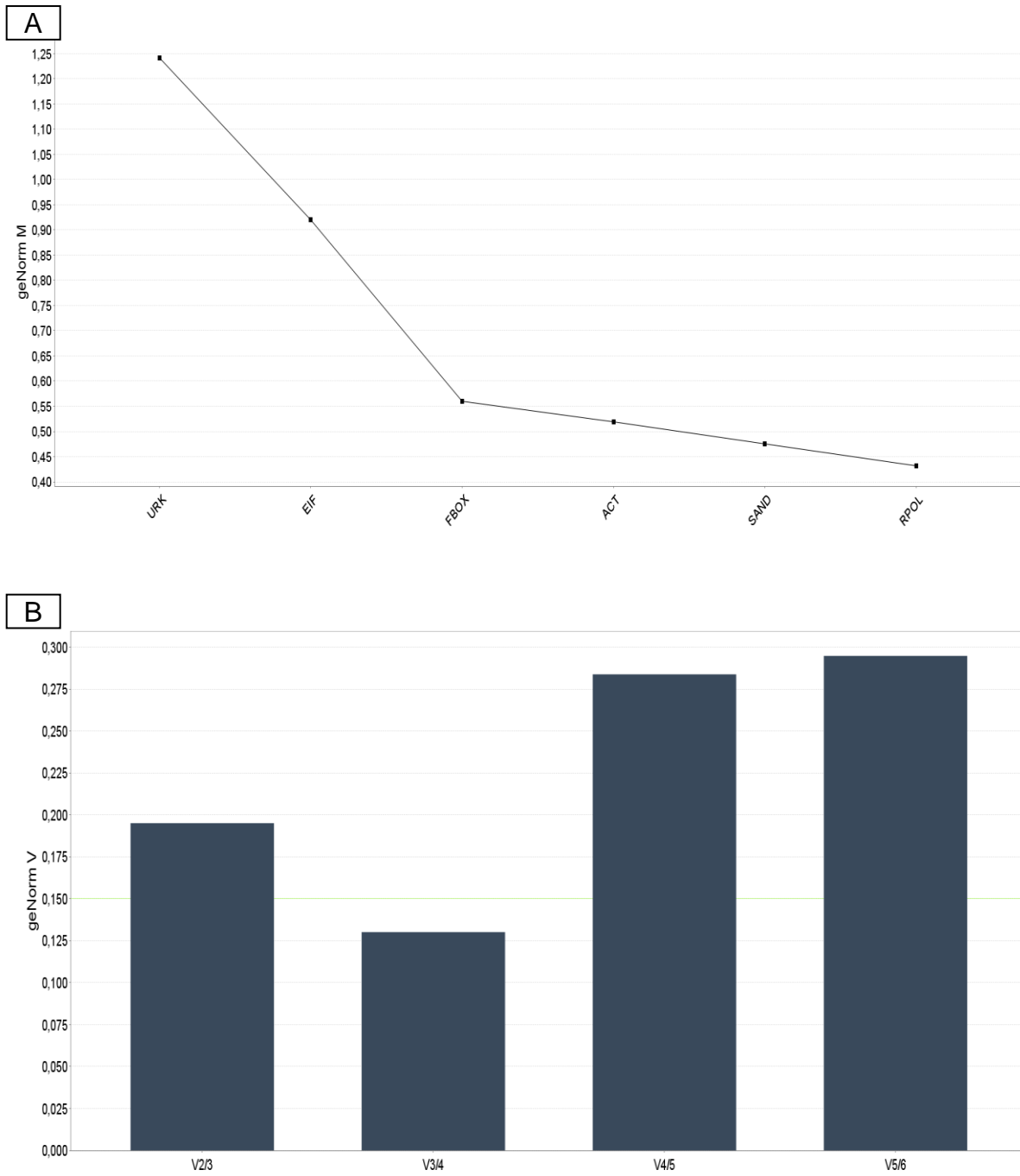


Fig8.



Supplementary Figure 2



Supplementary Table 2

Gene	Gene_ID	Gene name	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')	Anneling temperature (°C)	Amplicon size (bp)
ACT*	Anaoc.0006s0509	Actin	GACAACCGTATGATGTTATACC	CAATCGCAACTTCTTTAGCC	63.6	152
EIF*	Anaoc.0005s0957	Translation initiation factor	ATTGAGAGGAGAAACTGGGCG	CACACCATGAGAACAGCACCG	63.6	190
FBOX*	Anaoc.0002s2076	F-box protein	GGTTCAGAGACAAGAAATAGATG	GCACTAGAGTTGACACAAGAAT	63.6	182
RPOL*	Anaoc.0019s0338	RNA polymerase II protein	CTGGAAATTGTGGTTCGTGG	TTTCTGATTGCTGGTGTGG	65	141
SAND*	Anaoc.0010s1075	SAND family protein	AAACTATGTTCTTCTCTGCTGG	TTTCCACATCCTTCACCCAC	63.6	127
URK*	Anaoc.0001s0689	Protein uridylylate kinase	ATAATGTGAAGCCCAAGCC	ATTGCTACCTCTATTCCCAAG	59.8	162
PAL	Anaoc.0011s0624	Phenylalanine ammonia lyase	AGTATGAACAAAGGGACGGA	GATAGCAAACCTGATACCTGAG	65	236
PG	Anaoc.0010s0426	Polygalacturonase	CAATCGTAAGTGGTCCCGAA	GCACCATTACAGTTACTCCT	65	129
PL	Anaoc.0015s0315	Pectate lyase	TCTCTCTGTCTCCTCTTCCTG	GGGTATTTGTCTTGCGGAAC	63.6	134
FLS	Anaoc.0017s0663	Flavonol synthase	ATGTCCTCGTCCTGATCTC	TGCTAAGAATCTCAATCTGGTC	63.6	181
LAR	Anaoc.0002s0626	Leucoanthocyanidin reductase	GTCACTTTGTTGCCGATGCT	CATTTATTGATCCCGAGGTGAGAG	65	161
XTH	Anaoc.0013s1113	Xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase	TGCTTGCTTCTGCTAATTC	CGTTAGTGTGAAGAGTGTAG	59.8	299

* genes de referência

Supplementary Table 4

Genotypes	Developmental stages	cDNA libraries	Total raw reads	Total filter reads	Q30 percentage	GC content percentage	Mapped reads (%)
BRS 265	Green	BG-R1	35,475,960	31,212,424	91.51	44.88	27010883 (91.0)
		BG-R2	40,246,384	35,993,228	92.66	44.64	31105586 (91.3)
		BG-R3	46,360,900	41,200,480	92.30	44.84	35608226 (91.0)
	Mature	BM-R1	55,931,418	50,335,408	93.00	44.77	43487231 (91.1)
		BM-R2	46,257,628	41,672,446	93.11	44.87	35941632 (90.9)
		BM-R3	41,510,620	37,301,176	92.62	44.72	32180457 (91.1)
CCP 76	Green	CG-R1	52,234,814	41,200,480	92.73	44.43	40479663 (90.8)
		CG-R2	47,732,844	42,602,124	92.14	44.54	36657480 (91.0)
		CG-R3	44,064,846	39,912,154	93.49	44.65	34432885 (91.1)
	Mature	CM-R1	41,517,440	41,250,450	92.68	44.64	32528770 (91.2)
		CM-R2	43,962,712	38,823,036	91.95	44.57	33266884 (90.6)
		CM-R3	46,654,026	41,915,778	93.14	44.60	36021978 (90.8)

5. CONCLUSÃO

Em resumo, o presente estudo mostra uma análise transcriptômica comparativa de dois genótipos contrastantes de caju (CCP 76 e BRS 265) a fim de explorar genes-chave envolvidos em características específicas tais como a firmeza e a coloração. Além disso, este é o primeiro estudo a relatar o sequenciamento do transcriptoma de pedúnculos de caju. Por meio do sequenciamento dos transcritos, foi possível fornecer uma compreensão abrangente sobre os principais processos envolvidos no desenvolvimento dos pedúnculos de caju e, portanto, responsável pelas mudanças organolépticas nos frutos.

Em particular, foram identificados genes que podem potencialmente contribuir para a melhoria dos processos de biossíntese de flavonóides e degradação da parede celular durante o amadurecimento de cajus. Além disso, os resultados obtidos contribuem para a elucidação de mecanismos moleculares envolvidos na regulação desses metabolismos em frutos. A expressão de alguns genes foi associada a singularidade de cada genótipo estudado, fornecendo conhecimento para posteriores estudos envolvendo o melhoramento das características de qualidade. Por fim, o presente estudo fornece suporte científico para estudos de manipulação genética da característica desejada, valorizando a produção comercial de caju.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI-COSTA, T. D. S.; LIMA, A.; LIMA, M. V. Determinação de tanino em pedúnculo de caju: método da vanilina versus método do butanol ácido. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 763-765, 2003.
- ALBUQUERQUE, D. P. L.; KHAN, A. S.; LIMA, P. V. P. S.; CARVALHO, E. B. S. A competitividade externa da amêndoa de castanha de caju brasileira no período de 1990 a 2007. **Economia do Ceará em Debate 2010 – IPEC**, Fortaleza, v. 1, p. 85-108, 2011.
- ALIYU, O. M.; AWOPETU, J. A. Chromosome studies in cashew (*Anacardium occidentale* L.). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.6, n. 2, p. 131-136, 2007.
- ANANGA, A.; GEORGIEV, V.; OCHIENG, J.; PHILLS, B.; TS OLOVA, V. Production of anthocyanins in grape cell cultures: A potential source of raw material for pharmaceutical, food, and cosmetic industries. In: **The Mediterranean Genetic Code - Grapevine and Olive**, p. 247-287, 2013.
- AQUILA, M. E. A. A.; BRAGA, M. R.; DIETRICH, S. M. C. The similarity of galactomannan in seeds and endocarp of pods during development in *Senna macranthera* var. *nervosa*. **South Africa Journal of Botany**, [s.l.], v. 83, p. 56-62, 2012.
- ASSUNÇÃO, R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 16, n. 6, p. 647-657, 2003.
- ATKINSON, R. G.; SUTHERLAND, P. W.; JOHNSTON, S. L.; GUNASEELAN, K.; HALLETT, I. C.; MITRA, D., et al. Down-regulation of POLYGALACTURONASE1 alters firmness, tensile strength and water loss in apple (*Malus x domestica*) fruit. **BMC plant biology**, London, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2012.
- BARRETO, G. P. M.; SOUZA, A. C. R.; AZEREDO, H. M. C.; MERCADANTE, A. Z. Compostos bioativos em sub-produtos da castanha de caju. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 207–213, 2007.
- BARROS, L. M. **Árvore do conhecimento caju: características da planta**. Agência Embrapa de Informação Tecnológica, 2011. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/caju/arvore/CONT000fi8wxjm202wyiv80z4s473zfkkt9.html>. Acesso em: 14 out 2020.
- BEEJMOHUN, V.; MIGNON, C.; MAZOLLIER, A.; PEYTAVY-IZARD, M.; PALLET, D.; DORNIER, M.; CHAPAL, N. Cashew apple extract inhibition of fat storage and insulin resistance in the diet-induced obesity mouse model. **Journal of nutritional science**, [s.l.], v. 4, 2015.
- BHAT, M. G.; NAGARAJA, K. V.; RUPA, T. R. Cashew research in India. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 5, n. 1, p.1–16, 2010.
- BIALE, J. B. Growth, maturation, and senescence in fruits. **Science**, [s.l.], v. 146, n. 3646,

p.880-888, 1964.

BIALE, J. B.; BARCUS, D. E. Respiratory pattern in tropical fruits of the Amazon Basin. **Tropical Science**, [s.l.], v. 12, n. 2, p. 93-104, 1967.

BOGS, J.; JAFFE, F. W.; TAKOS, A. M.; WALKER, A. R.; ROBINSON, S. P. The grapevine transcription factor *VvMYBPA1* regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. **Plant Physiology**, Varanasi, v. 143, p. 1347–1361, 2007.

BOSS, P. K.; DAVIES, C.; ROBINSON, S. P. Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. **Plant Physiology**, Varanasi, v. 111, p. 1059–1066, 1996.

BRITO, E.; MENDES, L.; GARRUTI, D.; ZOCOLO, G.; LIMA, M. Structure-Astringency Relationship of Anacardic Acids from Cashew Apple (*Anacardium Occidentale* L.). **ChemRxiv**, Washington, 2020. Preprint. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12336704.v1>

BRUMMELL, D. A. Cell wall disassembly in ripening fruit. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 33, n. 2, p. 103-119, 2006.

CAVALCANTE, A. A. M.; RUBENSAM, G.; PICADA, J. N.; GOMES DA SILVA, E.; MOREIRA, J. C. F.; HENRIQUES, J. A. Mutagenicity, antioxidant potencial and antimutagenic activity against hydrogen peroxide of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and cajuina. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 41, p. 360-369, 2003.

CARIOCA, J. O. B.; HILUY, J. J. F.; GAZELLI, F. Cadeia do Caju: Novas Possibilidades para o Ceará. **Revista de Ciência e Tecnologia**, Campinas, v. 2, p. 17- 21, 2003.

CARVALHO, D. V.; GALLÃO, M. I.; BRITO, E. S. OBESIDADE e fibra dietética: destaque para a fibra de caju. **Brazilian Journal of Development**, São Paulo, v. 6, n. 7, p. 43474-43488, 2020.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.

DAS, I.; ARORA, A. Post-harvest processing technology for cashew apple: A review. **Journal of Food Engineering**, London, v. 194, p. 87-98, 2017.

DESHPANDE, A. B.; ANAMIKA, K.; JHA, V.; CHIDLEY, H. G.; OAK, P. S.; KADDOO, N. Y.; PUJARI, K. H.; GIRI, A. P.; GUPTA, V. S. Transcriptional transitions in Alphonso mango (*Mangifera indica* L.) during fruit development and ripening explain its distinct aroma and shelf life characteristics. **Scientific Reports**, London, v. 7, p. 1-19, 2017.

DOTTO, M. C.; MARTÍNEZ, G. A.; CIVELLO, P. M. Expression of expansin genes in strawberry varieties with contrasting fruit firmness. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 44, n. 5-6, p. 301-307, 2005.

ESPLEY, R. V.; HELLENS, R. P.; PUTTERILL, J.; STEVENSON, D. E.; KUTTY-AMMA, S.; ALLAN, A. C. Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB

transcription factor, MdMYB10. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 49, n. 3, p. 414-427, 2007.

FAOSTAT (2018). **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/CC>. Acesso em: 01 out 2020.

FIGUEIREDO, R. W.; LAJOLO, F. M.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C.; ARAÚJO, N. C. C. Alterações de firmeza, pectinas e enzimas pectinolíticas durante o desenvolvimento e maturação de pedúnculos de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L. var. *nanum*) CCP-76. **Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture**, p. 82-86, 2001.

FIGUEIREDO, R. W.; LAJOLO, F. M.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C. Physical-chemical changes in early dwarf cashew pseudofruits during development and maturation. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 77, n. 3, p. 343-347, 2002.

FIGUEROA, C. R.; PIMENTEL, P.; DOTTO, M. C.; CIVELLO, P. M.; MARTÍNEZ, G. A.; HERRERA, R.; et al. Expression of five expansin genes during softening of *Fragaria chiloensis* fruit: effect of auxin treatment. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 53, p. 51-57, 2009.

FILGUEIRAS, H. A. C.; ALVES, R. E.; MOSCA, J. L.; MENEZES, J. B. Cashew apple for fresh consumption: research on harvest and postharvest handling technology in Brazil. **Acta Horticulturae**, [s.l.], v. 485, p. 155-160, 1999.

FILGUEIRAS, H. A. C.; ALVES, R. E. Características do pedúnculo para exportação. Caju: Pós-colheita. **Embrapa Agroindústria Tropical**, p. 14-21, 2002.

GONZÁLEZ, M.; SALAZAR, E.; CABRERA, S.; OLEA, P.; CARRASCO, B. Analysis of anthocyanin biosynthesis genes expression profiles in contrasting cultivars of Japanese plum (*Prunus salicina* L.) during fruit development. **Gene Expression Patterns**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 54-62, 2016.

GOULAO, L. F.; OLIVEIRA, C. M. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 19, n. 1, p. 4-25, 2008.

GRIESSER, M.; VITZTHUM, F.; FINK, B.; BELLIDO, M. L.; RAASCH, C.; MUNOZ-BLANCO, J.; et al. Multi-substrate flavonol O-glucosyltransferases from strawberry (*Fragaria xananassa*) achene and receptacle. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, p. 2611-2625, 2008.

HEATHER, J. M.; CHAIN, B. The sequence of sequencers: the history of sequencing DNA. **Genomics**, [s.l.], v. 107, n. 1, p. 1-8, 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção agrícola municipal**. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 01 out 2019.

INSTITUTO CAJU BRASIL. **O agronegócio caju em números**, Boletim ICB, n. 7, 2020. Disponível em: <https://issuu.com/institutocajubrasil/>. Acesso em: 01 out 2020.

JAAKOLA, L. New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. **Trends in plant science**, Kidlington, v. 18, n. 9, p. 477-483, 2013.

JARA, K.; CASTRO, R. I.; RAMOS, P.; PARRA-PALMA, C.; VALENZUELA-RIFFO, F.; MORALES-QUINTANA, L. Molecular Insights into FaEG1, a Strawberry Endoglucanase Enzyme Expressed during Strawberry Fruit Ripening. **Plants**, Basel, v. 8, n. 6, p. 140, 2019.

KNAPP, S.; LITT, A. Fruit – an angiosperm innovation. In: SEYMOUR, G. B.; POOLE, M.; GIOVANNONI, J. J.; TUCKER, G. A. **The molecular biology and biochemistry of fruit ripening**. Willey-Blackwell, p. 21–38, 2013.

KOBAYASHI, S.; ISHIMARU, M.; HIRAOKA, K.; HONDA, C. Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. **Planta**, [s.l.], v. 215, p. 924–933, 2002.

KOBAYASHI, S.; GOTO-YAMAMOTO, N.; HIROCHIKA, H. Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. **Science**, [s.l.], v. 304, p. 982, 2004.

KORPELAINEN, E.; TUIMALA, J.; SOMERVUO, P.; HUSS, M.; WONG, G. RNA-seq data analysis: a practical approach. **CRC press**, [s.l.], 2015.

KOTEPONG, P.; KETSA, S.; DOORN, W. G. A white mutant of Malay apple fruit (*Syzygium malaccense*) lacks transcript expression and activity for the last enzyme of anthocyanin synthesis, and the normal expression of a MYB transcription factor. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 38, p. 75–86, 2011.

KOYAMA, K.; NUMATA, M.; NAKAJIMA, I.; GOTO-YAMAMOTO, N.; MATSUMURA, H.; TANAKA, N. Functional characterization of a new grapevine MYB transcription factor and regulation of proanthocyanidin biosynthesis in grapes. **Journal of experimental botany**, Oxford, v. 65, n. 15, p. 4433-4449, 2014.

KUBO, I.; NIHEI, K.I.; TSUJIMOTO, K. Antibacterial action of anacardic acids against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal Agriculture and Food Chemistry**, Nitra, v. 51, p. 7624-7628, 2003.

LAMPUGNANI, E. R.; KHAN, G. A.; SOMSSICH, M.; PERSSON, S. Building a plant cell wall at a glance. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 131, 2018.

LANGLEY, K. R.; MARTIN, A.; STENNING, R.; MURRAY, A. J.; HOBSON, G. E.; SCHUCH, W. W.; BIRD, C. R. Mechanical and optical assessment of the ripening of tomato fruit with reduced polygalacturonase activity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 66, p. 547-554, 1994.

LI, S. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: fine-tuning of the MYB-bHLH-WD40 (MBW) complex. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 9, n. 1, p. e27522, 2014.

LOPES, M. M. A.; MOURA, C. F. H.; ARAGÃO, F. A. S.; CARDOSO, T. G.; FILHO, J. E. Caracterização física de pedúnculos de clones de cajueiro anão precoce em diferentes estádios

de maturação. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 4, p. 914-920, 2011.

LOPES, M. M. A.; MIRANDA, M. R. A.; MOURA, C. F. H.; FILHO, J. E. Bioactive compounds and total antioxidant capacity of cashew apples (*Anacardium occidentale* L.) during the ripening of early dwarf cashew clones. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 3, p. 325-332, 2012.

MERCADO, J. A.; PLIEGO-ALFARO, F.; QUESADA, M. A. Fruit shelf life and potential for its genetic improvement. **Breeding for Fruit Quality**, p. 81–104, 2011.

MICHODJEHOUN-MESTRES, L.; AMRAOUI, W.; BRILLOUET, J. M. Isolation, characterization, and determination of 1-O-trans-cinnamoyl- β -D-glucopyranose in the epidermis and flesh of developing cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) and four of its genotypes. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 57, n. 4, p. 1377-1382, 2009.

MINOIA, S.; BOUALEM, A.; MARCEL, F.; TROADEC, C.; QUEMENER, B.; CELLINI, F.; PETROZZA, A.; VIGOUROUX, J.; LAHAYE, M.; CARRIERO, F.; BENDAHMANE, A. Induced mutations in tomato SIExp1 alter cell wall metabolism and delay fruit softening. **Plant Science**, Beijing, v. 242, p. 195-202, 2016.

MOLINA-HIDALGO, F. J.; FRANCO, A.; VILLATORO, C.; MEDINA-PUCHE, L.; MERCADO, J. A.; HIDALGO, M. A.; MONFORT, A.; CABALLERO, J. L.; MUÑOZ-BLANCO, J.; BLANCO-PORTALES, R. The strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruit-specific rhamnogalacturonate lyase 1 (FaRGLyase1) gene encodes an enzyme involved in the degradation of cell-wall middle lamellae. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, p. 1471–1483, 2013.

MOURA, C. F. H.; ALVES, R. E.; INNECCO, R.; FILGUEIRAS, H. A. C.; MOSCA, J. L.; PINTO, S. A. A. Características físicas de pedúnculos de cajueiro para comercialização in natura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 23, n. 3, p. 537-540, 2001.

MOURA, C. F. H.; FIGUEIREDO, R.W.; ALVES, R. E.; SILVA, E. D.; ARAUJO, P. G. L.; MACIEL, V. T. Increasing shelf life of early dwarf cashew tree peduncle through reduction of storage temperature. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, p. 140-145, 2010.

NCBI. **GenBank Statistic**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/statistics/>. Acesso em: 01 nov 2020.

OLIVEIRA, V. H. D. Cashew crop. **Revista Brasileira De Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 30, n. 1, 2008.

OZSOLAK, F.; MILOS, P. M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. **Nature reviews genetics**, London, v. 12, n. 2, p. 87, 2011.

PANDEY, A.; ALOK, A.; LAKHWANI, D.; SINGH, J.; ASIF, M. H.; TRIVEDI, P. K. Genome-wide expression analysis and metabolite profiling elucidate transcriptional regulation of flavonoid biosynthesis and modulation under abiotic stresses in banana. **Scientific reports**, London, v. 6, p. 31361, 2016.

PANIAGUA, C.; BLANCO-PORTALES, R.; BARCELÓ-MUÑOZ, M.; GARCÍA-GAGO, J. A.; WALDRON, K. W.; QUESADA, M. A.; MUÑOZ-BLANCO, J.; MERCADO, J. A. Antisense down-regulation of the strawberry β -galactosidase gene Fa β Gal4 increases cell wall galactose levels and reduces fruit softening. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 67, n. 3, p. 619-631, 2016.

PEI, M.; GU, C.; ZHANG, S. Genome-wide identification and expression analysis of genes associated with peach (*Prunus persica*) fruit ripening. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 246, p. 317-327, 2019.

PELLETIER, M. K.; MURRELL, J. R.; SHIRLEY, B.W. Characterization of flavonol synthase and leucoanthocyanidin dioxygenase genes in *Arabidopsis* (further evidence for differential regulation of “early” and “late” genes). **Plant physiology**, Varanasi, v. 113, n. 4, p. 1437-1445, 1997.

PORAT, R.; WEISS, B.; ZIPORI, I.; DAG, A. Postharvest longevity and responsiveness of guava varieties with distinctive climacteric behaviors to 1-methylcyclopropane. **Horticulturae Technology**, Alexandria, v. 19, n. 3, p. 580-585, 2009.

POSÉ, S.; PANIAGUA, C.; CIFUENTES, M.; BLANCO-PORTALES, R.; QUESADA, M.A.; MERCADO, J. A. Insights into the effects of polygalacturonase FaPG1 gene silencing on pectin matrix disassembly, enhanced tissue integrity, and firmness in ripe strawberry fruits. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 12, p. 3803-3815, 2013.

PRASANNA, V.; PRABHA, T. N.; THARANATHAN, R. N. Fruit ripening phenomena—an overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 47, p. 1–19, 2007.

PRATT, H. K.; MENDOZA JR, D. B. Influence of nut removal on growth and ripening of the cashew-apple. **Journal American Society for Horticultural Science**, United States, 1980.

PROMMAJAK, T.; LEKSAWASDI, N.; RATTANAPANONE, N. Biotechnological valorization of cashew apple: a review. **Chiang Mai University Journal of Natural Sciences**, [s.l.], v. 13, p.159-182, 2014.

QUEIROZ, C.; SILVA, A. J. R.; LOPES, M. L. M.; FIALHO, E.; VALENTE MESQUITA, V. L. Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) after processing. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 125, n. 1, p. 128-132, 2011.

QUEIROZ, M. A. D.; BARROS, L. D. M.; CARVALHO, L. P. D.; CANDEIA, J. D. A.; FERRAZ, E. Plant breeding in the semiarid region of Brazil: examples of success. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, p. 57–66, 2012.

RAVAGLIA, D.; ESPLEY, R. V.; HENRY-KIRK, R.; ANDREOTTI, C.; ZIOSI, V.; HELLENS, R. P.; COSTA, G.; ALLAN, A. C. Transcriptional regulation of flavonoid biosynthesis in nectarine (*Prunus persica*) by a set of R2R3 MYB transcription factors. **BMC plant biology**, London, v. 13, n. 1, p. 68, 2013.

ROBINSON, S. P.; BOGS, J.; MCDAVID, D. A. J.; HOOPER, L. C.; SPEIRS, J.; WALKER,

A. R. Transgenic grapevines with decreased expression of tannin synthesis genes have altered grape and wine flavonoid composition. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Australia, 2020. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12468>.

RYALL, A. L.; LIPTON, W. J. **Handling, transportation and storage of fruits and vegetables**. 2 ed. Westport: AVI, v. 1, p. 560, 1979.

SALADIÉ, M.; ROSE, J.K.C.; COSGROVE, D. J.; CATALÁ, C. Characterization of a new xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) from ripening tomato fruit and implications for the diverse modes of enzymatic action. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 47, p. 282–295, 2006.

SAROJ, P. L.; NAYAK, M. G.; MEENA, R. K. **Physiology of Flowering, Fruit and Nut Development in Cashew**. In Eds. Ravishankar, H.; Singh, V. K.; Misra, A. K.; Mishra, M. Souvenir, National Seminar-cum-workshop on physiology of flowering in perennial fruit crops, p. 105-114, 2014.

SAVADI, S.; MURALIDHARA, B. M.; PREETHI, P. Advances in genomics of cashew tree: molecular tools and strategies for accelerated breeding. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 16, n. 5, p. 1-15, 2020.

SCHWEIGGERT, R. M.; VARGAS, E.; CONRAD, J.; HEMPEL, J.; GRAS, C. C.; ZIEGLER, J. U.; MAYER, A.; JIMENEZ, V.; ESQUIVEL, P.; CARLE, R. Carotenoids, carotenoid esters, and anthocyanins of yellow-, orange-, and red-peeled cashew apples (*Anacardium occidentale* L.). **Food chemistry**, Amsterdam, v. 200, p. 274-282, 2016.

SEYMOUR, G.; TUCKER, G. A.; POOLE, M.; GIOVANNONI, J. **The molecular biology and biochemistry of fruit ripening**. John Wiley & Sons, 2013.

SHIRLEY, B. W.; HANLEY, S.; GOODMAN, H. M. Effects of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two Arabidopsis transparent testa mutations. **Plant Cell**, Oxford, v. 4, p. 333–347, 1992.

SIMSEK, O.; DONMEZ, D.; KACAR, Y. A. RNA-Seq analysis in fruit science: a review. **American Journal of Plant Biology**, New York, v. 2, n. 5, p. 1, 2017.

SIVAGURUNATHAN, P.; SIVASANKARI, S.; MUTHUKKARUPPAN, S.M.J. Characterization of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) fruits collected from Ariyalur District. **BioScience Research**, [s.l.], v. 1, p. 101- 107, 2010.

SMITH, C. J.; WATSON, C. F.; MORRIS, P. C.; BIRD, C. R.; SEYMOUR, G. B.; GRAY, J. E.; ARNOLD, C.; et al. Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 14, p. 369-379, 1990.

SOUSA, L. B.; FEITOZA, L. L.; GOMES, R. L. F.; LOPES, A. C. A.; SOARES, E. B.; SILVA, E. M. P. Floral biology aspects of the early dwarf and common cashew. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, 2007.

SRIVASTAVA, S.; SINGH, R. K.; PATHAK, G.; GOEL, R.; ASIF, M. H.; SANE, A. P.; SANE, V. A. Comparative transcriptome analysis of unripe and mid-ripe fruit of *Mangifera*

indica (var. “Dashehari”) unravels ripening associated genes. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. 1-13, 2016.

STICKLEN, M. B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 9, n. 6, p. 433-443, 2008.

STRACKE, R.; ISHIHARA, H.; HUEP, G.; BARSCH, A.; MEHRTENS, F.; NIEHAUS, K.; WEISSHAAR, B. Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. **Plant Journal**, [s.l.], v. 50, n. 4, p. 660-677, 2007.

SU, X.; XU, J.; RHODES, D.; SHEN, Y.; SONG, W.; KATZ, B.; WANG, W. Identification and quantification of anthocyanins in transgenic purple tomato. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 202, p. 184-188, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 6 ed., 2017.

TAKOS, A. M.; JAFFÉ, F. W.; JACOB, S. R.; BOGS, J.; ROBINSON, S. P.; WALKER, A. R. Light-induced expression of a MYB gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples. **Plant Physiology**, Varanasi, v. 142, p. 1216–1232, 2006.

TALASILA, U.; SHAIK, K. B. Quality, spoilage and preservation of cashew apple juice: A review. **Journal of Food Science and Technology**, New Delhi, v. 52, n. 1, p. 54-62, 2015.

TAMIELLO-ROSA, C. S.; CANTU-JUNGLES, T. M.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L. M. Pectins from cashew apple fruit (*Anacardium occidentale*): Extraction and chemical characterization. **Carbohydrate research**, Amsterdam, v. 483, p. 107752, 2019.

TANAKA, Y.; BRUGLIERA, F.; KALC, G.; SENIOR, M.; DYSON, B.; NAKAMURA, N.; KATSUMOTO, Y.; CHANDLER, S. Flower color modification by engineering of the flavonoid biosynthetic pathway: practical perspectives. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Oxford, v. 74, p.1760-1769, 2010.

TERRIER, N.; TORREGROSA, L.; AGEORGES, A.; VIALET, S.; VERRIES, C.; CHEYNIER, V.; ROMIEU, C. Ectopic expression of VvMybPA2 promotes proanthocyanidin biosynthesis in grapevine and suggests additional targets in the pathway. **Plant Physiology**, Varanasi, v. 149, p. 1028–1041, 2009.

TUCKER, G. A. Introduction. In: SEYMOUR, G. B.; TAYLOR, J. E.; TUCKER, G. A. Ed 1. **Biochemistry of fruit ripening**. Heidelberg: Springer, p. 1–51, 1993.

ULUISIK, S.; CHAPMAN, N. H.; SMITH, R.; POOLE, M.; ADAMS, G.; GILLIS, R. B.; BESONG, T. M. D.; SHELDON, J.; STIEGELMEYER, S.; PEREZ, L.; SAMSULRIZAL, N.; WANG, D.; FISK, I.D.; YANG, N.; BAXTER, C.; RICKETT, D.; FRAY, R.; BLANCOULATE, B.; POWELL, A. L. T.; HARDING, S. E.; CRAIGON, J.; ROSE, J. K. C.; FICH, E. A.; SUN, L.; DOMOZYCH, D. S.; FRASER, P. D.; TUCKER, G. A.; GRIERSON, D.; SEYMOUR, G. B. Genetic improvement of tomato by targeted control of fruit softening. **Nature Biotechnology**, New York, v. 34, p. 950–952, 2016.

VASCONCELOS, M. S.; GOMES-ROCHETTE, N. F.; OLIVEIRA, M. L. M.; NUNES-

PINHEIRO, D. C. S.; TOMÉ, A. R.; SOUSA, F. Y. M.; PINHEIRO, F. G. M.; MOURA, C. F. H.; MIRANDA, M. R. A.; MOTA, E. F.; MELO, D. F. Anti-inflammatory and wound healing potential of cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.) in mice. **Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 240, n. 12, p. 1648-1655, 2015.

VIDAL, F. C. N.; BARROS, L. M.; CAVALCANTI, J. J. V.; MELO, D. S. **Melhoramento genético e cultivares de cajueiro**. In: ARAÚJO, J. P. P. (Ed.). Agronegócio caju: práticas e inovações. Brasília, DF: Embrapa, parte 7, cap. 2, p. 481-508, 2013.

VIDAL, M. F. **Cajucultura nordestina continua em declínio**. Caderno Setorial ETENE – Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, n. 22, 2017.

VITAL, B. R.; CARNEIRO, A. D. C. O.; PIMENTA, A. S.; DELLA LUCIA, R. M. Adesivos à base de taninos das cascas de duas espécies de eucalipto para produção de chapas de flocos. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 4, p. 571-582, 2004.

VORAGEN, A. G. J.; COENEN, G.; VERHOEF, R. P.; SCHOLS, H. A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, Deerfield Beach, v. 20, p. 263-275, 2009.

WALKER, A. R.; LEE, E.; BOGS, J.; MCDAVID, D. A.; THOMAS, M. R.; ROBINSON, S. P. White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 49, n. 5, p. 772-785, 2007.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for Transcriptomics. **Nature Reviews**, London, v. 10, p. 57-63, 2009.

WANG, D.; YEATS, T. H.; ULUISIK, S.; ROSE, J. K.; SEYMOUR, G. B. Fruit softening: revisiting the role of pectin. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 23, n. 4, p. 302-310, 2018.

WANG, D.; SAMSULRIZAL, N. H.; YAN, C.; ALLCOCK, N. S.; CRAIGON, J.; BLANCO-ULATE, B.; ORTEGA-SALAZAR, I.; MARCUS, S. E.; BAGHERI, H. M.; PEREZ-FONS, L.; FRASER, P. D.; FOSTER, T.; FRAY, R.; KNOX, J. P.; SEYMOUR, G. B. Characterization of CRISPR mutants targeting genes modulating pectin degradation in ripening tomato. **Plant physiology**, Varanasi, v. 179, n. 2, p. 544-557, 2019.

WATADA, A. E.; HERNER, R. C.; KADER, A. A.; ROMANI, R. J.; STABY, G. L. Terminology for the description of developmental stages of horticultural crops. **Horticulturae Science**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.20-21, 1984.

WEN, B.; STRÖM, A.; TASKER, A.; WEST, G.; TUCKER, G. A. Effect of silencing the two major tomato fruit pectin methylesterase isoforms on cell wall pectin metabolism. **Plant Biology**. Oxford, 15, 1025-32, 2013.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiology**, Varanasi, v. 126, p. 485–493, 2001.

WITASARI, L. D.; HUANG, F. C.; HOFFMANN, T.; ROZHON, W.; FRY, S. C.; SCHWAB, W. Higher expression of the strawberry xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase genes Fv

XTH 9 and Fv XTH 6 accelerates fruit ripening. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 100, n. 6, p. 1237-1253, 2019.

XU, W.; DUBOS, C.; LEPINIEC, L. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 20, n. 3, p. 176-185, 2015.

XUE, C.; GUAN, S. C.; CHEN, J. Q.; WEN, C. J.; CAI, J. F.; CHEN, X. Genome wide identification and functional characterization of strawberry pectin methylesterases related to fruit softening. **BMC plant biology**, London, v. 20, n. 1, p. 1-17, 2020.

YAHIA, E. M. **Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits: Açai to Citrus**. Ed. Elsevier, p. 414 – 417, 2011.

YANG, Y. N.; ZHAO, G.; YUE, W. Q.; ZHANG, S. L.; GU, C.; WU, J. Molecular cloning and gene expression differences of the anthocyanin biosynthesis-related genes in the red/green skin color mutant of pear (*Pyrus communis* L.). **Tree genetics & genomes**, Heidelberg, v. 9, n. 5, p. 1351-1360, 2013.

YANG, Y.; YAO, G.; YUE, W.; ZHANG, S.; WU, J. Transcriptome profiling reveals differential gene expression in proanthocyanidin biosynthesis associated with red/green skin color mutant of pear (*Pyrus communis* L.). **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, p. 795, 2015.

YANG, L.; HUANG, W.; XIONG, F.; XIAN, Z.; SU, D.; REN, M.; LI, Z. Silencing of Sl PL, which encodes a pectate lyase in tomato, confers enhanced fruit firmness, prolonged shelf-life and reduced susceptibility to grey mould. **Plant biotechnology journal**, Oxford, v. 15, n. 12, p. 1544-1555, 2017.

YOKOYAMA, R.; NISHITANI, K. Functional diversity of xyloglucan- related proteins and its implications in the cell wall dynamics in plants. **Plant Biology**, Oxford, v. 2, p. 598–604, 2000.

ZHAO, X.; YUAN, Z.; FENG, L.; FANG, Y. Cloning and expression of anthocyanin biosynthetic genes in red and white pomegranate. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 128, n. 4, p. 687-696, 2015.