

# BIOTECNOLOGIA E GENÉTICA PÓS-COLHEITA: RETROSPECTIVAS E PERSPECTIVAS

Cesar Luis Girardi<sup>1</sup>, Luciano Lucchetta<sup>2</sup>, Benoit van der Rest<sup>3</sup>,  
Alain Latché<sup>3</sup>, Jean-Claude Pech<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Uva e Vinho,  
Bento Gonçalves, RS, Brasil*

<sup>2</sup>*Universidade Federal de Pelotas (UFPEl), Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM),  
Pelotas, RS, Brasil*

<sup>3</sup>*Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)/Institut National Polytechnique  
de Toulouse (INPT) - Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (ENSAT),  
"Genomique et biotechnologie des fruits" (UMR 990), Castanet-Tolosan, France;  
email: pech@ensat.fr*

## RESUMO

A genética e a biotecnologia são ferramentas essenciais na melhoria da qualidade sensorial e nutricional de produtos hortícolas e da sua conservação pós-colheita. Atributos como qualidade e conservabilidade foram, por muito tempo, considerados secundários para os melhoristas, quando comparados ao rendimento e à resistência às doenças. Porém, mutantes ou clones que apresentavam características genéticas relacionadas à longa conservação ou mesmo ao não amadurecimento foram utilizados nos últimos 20 anos para gerar variedades comerciais com boa conservação ou com melhor qualidade sensorial. Em nível mundial, produtos hortícolas geneticamente modificados têm pouca expressão quando comparados a feijão, soja, algodão, colza e milho. A maioria dessas culturas anuais cultivadas em países desenvolvidos é híbrida de F1. Nesse caso, a transformação genética deveria ser incluída em programas avançados de melhoramento genético e as companhias de sementes representam os melhores usuários da biotecnologia. O progresso na biotecnologia de pós-colheita depende fortemente do conhecimento acerca dos mecanismos básicos de amadurecimento e senescência da fruta, bem como das rotas metabólicas envolvidas na síntese de compostos importantes que conferem aroma e valor nutricional aos produtos. Porém, a maioria dos resultados obtidos está longe dos interesses práticos e comerciais. O desenvolvimento da biotecnologia de pós-colheita em nível comercial requer esforços integrados entre fisiologistas, biólogos moleculares, geneticistas, socioeconomistas e companhias de semente.

**Palavras-chave:** Caráter climatérico. Etileno. Frio. Genômica. Melhoramento. Plantas modificadas. Proteômica. Qualidade sensorial. Textura. Vida de prateleira.

## ABSTRACT

### **Biotechnology and post-harvest genetics: retrospective and perspective**

Biotechnology and genetics are essential tools in the enhancement of the sensory and nutritional quality of horticultural crops and their postharvest shelf-life. Quality attributes and storage life have long been a secondary goal compared to yield and disease resistance. However, mutants or chance seedlings that provide the fruit long storage life or non-ripening features have been used in the last 20 years to generate commercial varieties with good conservation characteristics or with improved sensory quality. Genetically transformed horticultural crops represent very little compared to soybean, cotton, canola, and maize. Most annual horticultural crops cultivated in developed countries are F1 hybrids. In this case, genetic transformation should be included in advanced breeding programs and seed companies represent the best users of biotechnology. The progress in postharvest biotechnology strongly depends on the knowledge of basic mechanisms of senescence and fruit ripening as well as the metabolic pathways involved in the synthesis of important compounds responsible for flavor and nutritional value. Nevertheless, most of the data obtained so far are way behind the practical and commercial interests. The development of postharvest biotechnology at a commercial level requires integrated efforts of physiologists, molecular biologists, geneticists, socio-economists, and seed companies.

**Key words:** Breeding. Climateric character. Cold. Ethylene. Genomic. Modified plants. Proteomic. Sensorial quality. Shelf life. Texture.

## 1 INTRODUÇÃO

**A** engenharia genética permite a transferência de genes originados de outros organismos vivos para plantas, o que pode lhes conferir uma nova característica. Além disso, a expressão de genes específicos que conferem características indesejáveis pode ser suprimida, utilizando-se estratégias de *antisense*, co-supressão e RNAi. Métodos biotecnológicos representam uma nova ferramenta que pode ser utilizada para melhorar a qualidade dos produtos de plantas. Para frutas e hortaliças, a obtenção da característica de “longa vida” representou por muito tempo um dos principais critérios nas decisões de compra dos consumidores. Porém, os consumidores modernos também demandam melhor textura, sabor e aroma, apreciam o valor nutritivo e estão preocupados com os resíduos de agroquímicos. Tendo em mente esses critérios, um produto hortícola ideal deve apresentar aparência atraente, boa conservação, sabor acentuado, ser benéfico à saúde e livre de resíduos de agrotóxicos. Este capítulo é especificamente dedicado à avaliação do potencial da biotecnologia para melhorar a qualidade das frutas e hortaliças na colheita e pós-colheita.

## 2 CONTROLE HORMONAL DO AMADURECIMENTO DAS FRUTAS

### 2.1 Biossíntese do etileno e controle pela biotecnologia

O etileno é o hormônio das plantas que está envolvido na promoção de senescência, abscisão e amadurecimento dos produtos hortícolas. Reduzindo-se a ação e a biossíntese desse hormônio, é possível diminuir a deterioração das frutas e hortaliças, estendendo sua vida de prateleira e limitando, assim, as perdas pós-colheita.

ACC sintase (ACS) e ACC oxidase (ACO) são os genes-chave que controlam a biossíntese do etileno. Oeller e outros (1991) obtiveram alta taxa de inibição da produção de

etileno (ao redor de 99%) pela supressão da expressão *antisense* da ACS em tomate. Como resultado, foram inibidos o desenvolvimento da cor vermelha, o amolecimento e a produção de aromas. Ao se tratar essa fruta com etileno, o processo maturativo restabeleceu-se completamente. Picton e outros (1993) constataram forte redução na produção de etileno utilizando construções *antisense* do gene ACO. Porém, a redução da síntese de etileno teve efeito significativo no amadurecimento somente após a colheita dos frutos. O etileno residual é provavelmente o responsável pelo desenvolvimento de alguns dos processos maturativos, como o amolecimento. Isso é consistente com a observação de que uma quantidade mínima de etileno pode estimular a expressão do gene da endopoligalacturonase (PG) em tomates *antisense* da ACS (SITRIT; BENNETT, 1998). Outras estratégias consistem em remover o precursor do etileno SAM pelo gene da S-adenosil-metionina hidrolase (SAMase) ou transformar ACC em amônia e  $\alpha$ -ácido cetobutírico pela ACC deaminase (GOOD et al., 1994; KLEE, 1993; KRAMER et al., 1997). Porém, nesses casos, a inibição da produção de etileno não é suficiente para afetar significativamente o processo maturativo.

Melão Cantaloupe, do tipo Charentais, foi a segunda fruta, após o tomate, a apresentar alta inibição da produção de etileno (> 99,5%) quando se utilizou a técnica *antisense* do gene da ACO (AYUB et al., 1996). Nesse modelo de estudo, uma linhagem de melão *antisense* da ACO apresentou redução da produção de etileno de mais de 99,5%, resultando em inibição do amarelecimento da casca, ataque de fungos, abscisão do pedúnculo, respiração climática e redução da velocidade de amolecimento da polpa (GUIS et al., 1997). Baixas concentrações de etileno ( $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$  a  $5 \mu\text{L L}^{-1}$ ) aplicadas nessa linhagem de melão puderam restabelecer o fenótipo maturativo original (FLORES et al., 2001). Alguns processos maturativos, como a coloração da polpa e a acumulação de açúcares e ácidos orgânicos, não foram afetados pela supressão do etileno. Os conteúdos de açúcar

nas frutas *antisense* da ACO podem ser mais elevados, visto que elas se mantêm por muito mais tempo na planta sem sofrer danos na zona de abscisão. O amolecimento da polpa não foi abolido completamente pela supressão do etileno, pois é, em parte, etileno-independente. Além do fenótipo maturativo, os melões *antisense* ACO mostraram-se mais tolerantes aos distúrbios fisiológicos de baixas temperaturas durante e depois do armazenamento a 2°C quando comparados ao tipo selvagem (BEN-AMOR et al., 1999). Essa maior tolerância foi observada também em atmosfera modificada (FLORES et al., 2004). A tolerância ao *chilling* foi correlacionada com acúmulo reduzido de etanol e acetaldeído e atividade mais alta de enzimas capazes de remover espécies reativas de oxigênio, como catalase e superóxido dismutase (BEN-AMOR et al., 1999).

## 2.2 Percepção do etileno e seu controle pela biotecnologia

Avanços recentes nos conhecimentos da percepção e tradução do etileno abriram novos caminhos para o entendimento do efeito desse hormônio sobre o amadurecimento e a senescência, com perspectivas de controle pela engenharia genética. O mutante natural de tomate *Never-ripe* (Nr), que exhibe fenótipo severo de não amadurecimento das frutas, foi caracterizado como deficiente na percepção do etileno. Tomates transgênicos, que expressam uma versão transformada do gene do receptor do etileno (ETR1-1), exibiram um fenótipo alterado no amadurecimento e na resposta a esse fitormônio, que são indistinguíveis do observado no mutante Nr. O problema principal no prolongamento da vida de prateleira por inibição da percepção do etileno reside no fato de que o processo não é essencialmente reversível, pois quando os componentes etileno-dependentes da fruta são bloqueados, sua qualidade sensorial fica prejudicada.

Em flores, a eficiência na transferência de um gene do receptor do etileno de *Arabidopsis* (WILKINSON et al., 1997) ou de brócolis (SHAW et al., 2002) para petúnia, por exemplo, demons-

trou que se pode prevenir o murchamento. Nesse caso, porém, foram observadas características indesejáveis nas plantas transgênicas, incluindo baixa resistência a doenças (GUBRIUM et al., 2000; SHAW et al., 2002), as quais poderiam possivelmente ser superadas com o uso de promotores flor-específicos.

## 2.3 Regulação do etileno no amolecimento e separação da parede celular em frutas

Esforços consideráveis têm sido dedicados ao entendimento dos mecanismos de degradação da parede celular com o objetivo de melhor controlar a firmeza e reduzir a velocidade de deterioração das frutas. Análises funcionais de genes suspeitos de desempenhar um papel nesse processo foram realizadas quase exclusivamente por métodos biotecnológicos, utilizando-se tomate como modelo. O primeiro estudo nessa área foi dirigido para a co-supressão da endo-poligalacturonase (PG). As frutas transgênicas resultantes apresentaram níveis reduzidos de atividade da PG e menor degradação da pectina (SHEEHY; KRAMER; HIATT, 1988; SMITH et al., 1988), embora a firmeza não tenha sido significativamente afetada (KRAMER et al., 1992; SCHUCH et al., 1991). Entretanto, essas frutas ficaram menos suscetíveis a rachamento, dano mecânico e doenças fúngicas em pós-colheita. Tomates com supressão da PG foram comercializados para consumo *in natura* nos Estados Unidos e para processamento industrial nos Estados Unidos e na Inglaterra. As vantagens para a indústria de processamento incluem alta viscosidade e oportunidade para processamento em baixas temperaturas. No entanto, por razões comerciais e de marketing, esses tomates foram retirados do mercado.

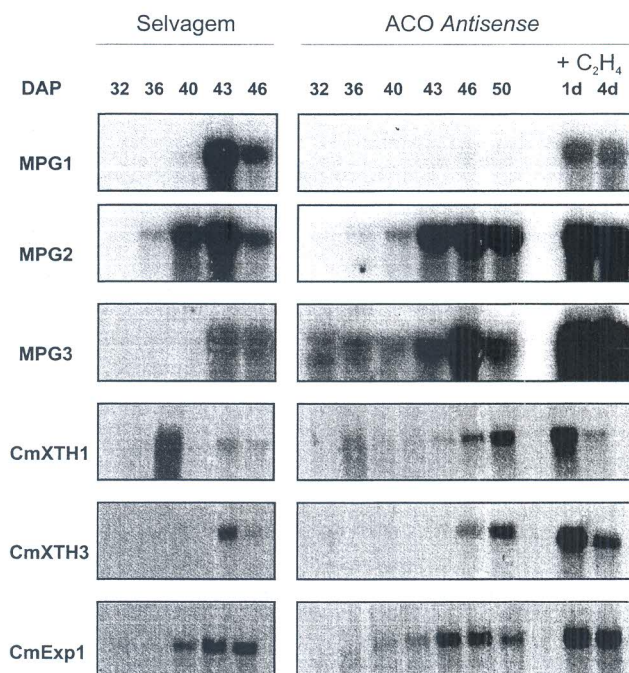
O conceito que emerge atualmente é que o amolecimento das frutas envolve muitos genes que codificam uma variedade de enzimas e proteínas não-enzimáticas, as quais degradam a parede celular. Cada isoforma de uma proteína pode desempenhar um papel específico no amolecimento e nas mudanças na textura. Isso poderia

explicar porque a tentativa de controlar a textura das frutas pela supressão de uma única enzima degradativa da parede celular não obteve êxito completo. Assim, devem ser orientadas estratégias para a supressão de um conjunto de genes.

Para melhor entender o papel específico dos membros da família de genes envolvidos na degradação da parede celular e a sua regulação ou não pelo etileno, comparou-se sua expressão em melões Charentais selvagens e transgênicos que apresentam inibição do etileno. O amadurecimento de melões Charentais é caracterizado por significativa solubilização e despolimerização da pectina nos últimos estádios do amadurecimento (ROSE et al., 1998), processos que são largamente regulados pelo etileno, como observado em análises do tamanho das moléculas de água e pectinas solúveis em CDTA de melões selvagens e transgênicos com supressão da ACO. Aumentos nos níveis de mRNA

e na atividade da PG têm sido relatados em várias espécies de frutas, concomitantemente com a degradação de polissacarídeos da pectina durante o amolecimento (FISCHER; BENNETT, 1991; HUBER; O'DONOGHUE, 1983). Hadfield e outros (1998) mostraram que a expressão da metil-poligalacturonase (MPG1, MPG2 e MPG3) aumentou durante o amadurecimento de melões Charentais e foi relacionada temporalmente com o aumento na atividade de degradação da pectina.

Nishiyama e outros (2007) também observaram padrão de maturação semelhante na expressão de MPG em frutas de tipo selvagem não tratadas; porém, cada gene de MPG mostrou um padrão distinto de regulação pelo etileno (Figura 1). A expressão da MPG1 foi apenas detectável nas frutas transgênicas com supressão da ACO, mas foi induzida a níveis altos pela aplicação de etileno exógeno. Além disso, a aplicação de 1-MCP suprimiu completamente



**Figura 1** – Análise da expressão de RNA por *gel blot* de três PGs (MPG1, MPG2 e MPG3), duas XTHs (CmXTH1, CmXTH3) e uma expansina (CmExp1). Os RNAs foram extraídos 46 dias após a polinização (DAP) de frutas de melão Charentais selvagens e transgênicas *antisense* ACO tratadas e não tratadas com 50 ppm de etileno por 1 a 4 dias.

**Fonte:** Nishiyama e outros (2007).

a expressão da MPG1 durante vários dias. Essas observações indicam que a expressão da MPG1 é totalmente etileno-dependente e sugerem que esta enzima seja uma das responsáveis primárias pela separação da pectina e pelo amolecimento da fruta. Em contraste, a expressão da MPG2 só foi afetada ligeiramente pela supressão da ACO em frutas transgênicas ou tratadas com 1-MCP, indicando que a regulação da expressão da MPG2 é etileno-independente. A expressão da MPG3 parece ser regulada por ambos – é etileno-dependente e independente –, pois mRNA de MPG3 foi detectado em frutas transgênicas ACO e os níveis de expressão aumentaram com a aplicação de etileno exógeno. Observou-se que não houve significativa despolimerização da pectina e amolecimento da fruta em ausência de etileno e em frutas transgênicas com supressão da ACO. Assim sendo, não é provável que a MPG2 e a MPG3 sejam os principais fatores de inibição do amolecimento e degradação da pectina ou que sua ação na parede celular requeira modificação na atividade de outras proteínas fundamentais que foram inativadas em ausência do etileno. É provável que a MPG3 codifique uma exo-PG e esta atividade não tenha sido detectada nas separações por cromatografia (HADFIELD et al., 1998).

A perda da galactose também tem sido proposta, por contribuir na modificação da pectina durante o amadurecimento, e genes que codificam  $\beta$ -Gal têm sido caracterizados em várias espécies de frutas, como tomate (SMITH; GROSS, 2000), pêra japonesa (TATEISHI et al., 2001) e pêra (MWANIKI et al., 2005). Smith, Abbott e Gross (2002) demonstraram que a baixa regulação da expressão da  $\beta$ -Gal em tomates (TBG4) transgênicos resultou, em média, em frutas 40% mais firmes que o controle no estágio de maturação vermelho-maduro. Em melão Charentais, o conteúdo de galactose na pectina e de hemicelulose nos extratos da parede celular diminuíram durante o amadurecimento, especialmente nos estádios tardios de amolecimento (ROSE et al., 1998). Estudo semelhante, de Ranwala, Suematsu e Masuda (1992), mostrou que a  $\beta$ -Gal purificada tem capacidade de cata-

lisar a diminuição aparente do tamanho das moléculas de pectina *in vitro*. Nesse estudo, três  $\beta$ -Gal foram clonadas e caracterizadas. Enquanto a acumulação de mRNAs de CmGal1 e CmGal2 não foi detectável no estágio pré-climatérico, mRNAs de CmGal2 acumularam abruptamente no início do amadurecimento e os níveis de mRNA da CmGal1 aumentaram com atraso de dois dias após o início do amadurecimento. De modo semelhante, o tratamento com 1-MCP inibiu completamente a acumulação de mRNA de CmGal1, mas teve menor efeito na CmGal2. Essas observações sugerem que a expressão da CmGal1, que está associada à maturação, seja dependente do etileno e a expressão da CmGal2 seja etileno-independente. Níveis de mRNA de CmGal1 não foram detectados em frutas tratadas com 1-MCP em estádios tardios, enquanto níveis de mRNA de MPG1 retornaram ao nível normal. Isso sugere que a CmGal1 tem um papel na reiniciação gradual do amolecimento em frutas tratadas com 1-MCP e uma ação cooperativa potencial entre CmGal1 e MPG1.

Rose e outros (1998) sugerem que a despolimerização de uma fração de xiloglucan, a qual é firmemente ligada a fibras de microcelulose, representa um dos primeiros eventos da maturação relacionados com a separação da parede celular. Os resultados descritos aqui apóiam a correlação existente entre a despolimerização dessa fração de xiloglucan e o amolecimento da fruta e comprovam que este aspecto de separação de parede celular é regulado pelo etileno. Embora a base enzimática desse processo ainda não esteja estabelecida, proteínas que modificam a parede celular, incluindo EGases, XTHs e expansinas, têm sido sugeridas por exercer papel sinérgico na reestruturação da rede celulose-xiloglucan (ROSE; BENNETT, 1999). De acordo com Nishiyama e outros (2007), duas XTHs (CmXTH1 e CmXTH3) e uma expansina (CmExp1) de melão mostraram padrões de expressão relacionados com a maturação (Figura 1). Nenhuma diferença significativa foi observada nos níveis de mRNA globais de XTHs e CmExp1 entre melões do tipo selvagem e transgênicos com supressão da ACO, exceto retar-

damento temporal nas frutas transgênicas, embora o etileno exógeno tenha aumentado os níveis de mRNA destes genes. Portanto, as expressões de CmXTH1, CmGal3 e CmExp1 parecem estar associadas com a maturação, mas são apenas parcialmente etileno-dependentes, sugerindo que não exerçam um papel etileno-dependente significativo no amolecimento de melão. Enquanto uma potencial função para esses genes no processo de amolecimento não estiver bem definida para MPG1 e CmGal1, ainda é possível que estas representem unidades importantes no grupo de enzimas empregadas na separação da parede celular, devendo ser observado futuramente que a detecção de níveis de mRNA em frutas do tipo selvagem e transgênicas não impede a regulação pós-transcricional do gene como parte importante do controle global da modificação da parede celular.

O estudo de Nishiyama e outros (2007) indica que, embora o processo global de separação da parede celular na maturação de melões Charentais seja claramente regulado pelo etileno, existem variações consideráveis entre os padrões de regulação nas diversas famílias de proteínas que modificam a parede celular e entre os membros individuais dentro destas famílias. Propõe-se aqui que investigações adicionais sejam realizadas de modo a desvendar o papel dos diferentes membros específicos dessas famílias de genes. Isso possibilitará a verificação da importância de cada um deles na separação da parede celular durante o amolecimento das frutas, bem como a investigação acerca dos mecanismos pelos quais sua expressão é co-regulada como parte do programa de amadurecimento.

## **2.4 Regulação transcricional durante o amadurecimento da fruta e interações entre hormônios - Controle biotecnológico da partenocarpia**

Nos últimos anos, novas técnicas de fisiologia e genética inversa têm claramente confirmado o papel do hormônio etileno como um

dos responsáveis pelo amadurecimento das frutas climatéricas, como o melão e o tomate. Porém, mudanças nos níveis de outros hormônios existentes nas plantas durante o crescimento e o desenvolvimento da fruta sugerem seu forte envolvimento dinâmico no processo de desenvolvimento. Para aprofundar os conhecimentos sobre os fatores que agem conjuntamente com o etileno na regulação do desenvolvimento da fruta de tomate, utilizou-se no laboratório de Génomique et Biotechnologie des Frutis, do ENSAT, em Toulouse, França, a técnica de mRNA *Differential Display* para isolar genes que são regulados durante o desenvolvimento (DR) e que apresentam alteração na sua expressão durante o período de transição crítico que conduz ao ganho da capacidade e autonomia para o amadurecimento da fruta (ZENG-ZOUTI et al., 1999).

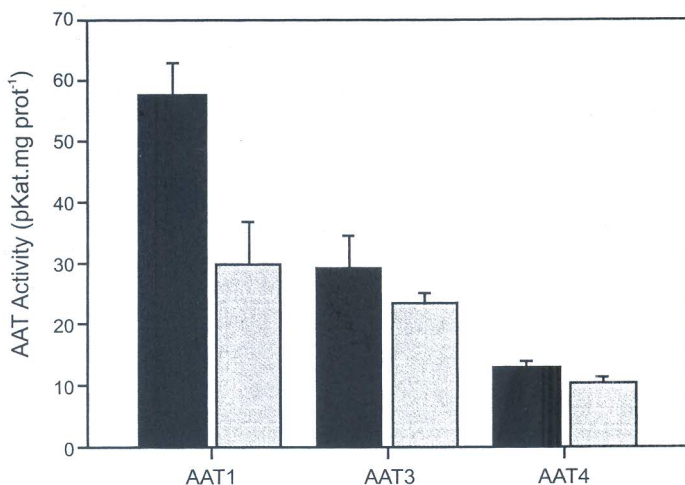
Foram identificados vários fatores de transcrição putativos entre os clones diferencialmente isolados. Notavelmente, poucos genes *developmentally regulated* (DR) putativos e que codificam fatores de transcrição de auxinas foram identificados. O primeiro deles a ser caracterizado foi o DR12, um homólogo de um ARF (*Auxin Regulated Factors*) de tomate, além dos DR1, DR3, DR4 e DR8, que mostraram semelhanças de seqüências com genes de Aux/IAA de várias espécies de plantas. Estudos de expressão mostraram acumulação de transcritos dos genes Aux/IAA regulados pelo etileno em frutos de tomateiro, mas não em folhas, sugerindo que esses componentes putativos de resposta a auxinas também participam na regulação da expressão de genes etileno-dependentes de forma tecido-específica.

A importância funcional do DR12 foi investigada por Jones e outros (2002) utilizando a técnica de genética inversa. Plantas transgênicas com baixa expressão de DR12 exibiram fenótipo de pleiotropismo – frutas imaturas com cor verde mais escura e divisão celular do pericarpo incomum –, presença de manchas durante o amadurecimento, aumentada firmeza da polpa, enrolamento das folhas para cima e aumento do crescimento dos hipocótilos e cotilédones (JO-

dos. Como a transferência do acil em álcool na formação de ésteres só foi inibida em parte, isto indica que este passo teve ambos os componentes, etileno-dependente e etileno-independente (FLORES et al., 2002).

A formação de ésteres é catalisada pelas enzimas álcool acil transferases (AAT), que transferem um grupamento acil-CoA para um álcool (HARADA; UEDA; IWATA, 1985). Essas enzimas são capazes de combinar diferentes álcoois e acil-CoAs resultando na síntese de uma extensa gama de ésteres que são emitidos pelas frutas. O laboratório de Génomique et Biotechnologie des Frutis demonstrou que, em melão Charentais (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*), as AAT são codificadas por uma família de genes de pelo menos quatro membros, com faixa de identidade de aminoácidos que varia entre 84% (Cm-AAT1/Cm-AAT2), 58% (Cm-AAT1/Cm-AAT3) a somente 22% (Cm-AAT1/Cm-AAT4). A expressão de todos os genes de Cm-AAT é aumentada durante o amadurecimento e inibida em melões *antisense* ACC oxidase e em frutas tratadas com o antagonista do etileno, o 1-MCP, indicando regulação positiva pelo etileno (MANRÍQUEZ et al., 2006).

Yahyaoui e outros (2002) e El-Sharkawy e outros (2005) demonstraram que todas as proteínas codificadas, excluindo-se a Cm-AAT2, foram enzimaticamente ativas em leveduras e apresentaram preferências diferenciais por substratos. A proteína da Cm-AAT1 produz uma gama extensa de ésteres de acil de cadeia curta e longa; entretanto, apresenta forte preferência na formação de acetato de E-2-hexenil e hexanoate de hexil. A Cm-AAT3 também aceita uma gama extensiva de substratos, porém com forte preferência para produção de acetato de benzila. A Cm-AAT4 é quase exclusivamente dedicada à formação de acetato, com forte preferência para produção de acetato de cinamoil. Das três AATs recombinantes que são específicas da maturação da fruta de melão Cantaloup Charentais, sem dúvida a mais ativa é a Cm-AAT1, capaz de sintetizar ésteres de tioéter (Figura 2), compostos que contêm enxofre e que contribuem fortemente em notas aromáticas típicas de melões. Todas as proteínas, como também as AATs extraídas de frutas de melões, são tetrâmeros ativos ao redor de 200 kDa. Análises cinéticas demonstraram que um produto da reação da CoA-SH é ativado a baixas concentrações e inibido em altas concentrações. A remo-



**Figura 2** – Atividade de formação de ésteres de tioéter em três AATs recombinantes de melão. A atividade do acetato 3-(metiltio) propil é representada em preto e a do acetato 2-(metiltio) etil, em cinza. Valores de desvio padrão ( $\pm$ SE) representam a média de três repetições.

**Fonte:** Lucchetta e outros (2007).



ção da CoA-SH da reação pela adição de uma fosfo-transacetilase originou valores de Km que foram diminuídos de duas a três vezes pela acil-CoA como co-substrato.

O uso da técnica de mutagenesis local dirigida permitiu demonstrar a incapacidade da Cm-AAT2 em produzir ésteres voláteis, relacionada com a presença de um resíduo de aminoácido alanina na posição 268 em vez de uma treonina, como ocorre normalmente em todas as proteínas de AAT ativas. Transformando-se 268-A em 268-T na Cm-AAT2, conseguiu-se restabelecer a atividade desta enzima, enquanto a transformação de 268-T em 268-A anulou completamente a atividade da Cm-AAT1 (LUCCHETTA et al., 2007). Também com a utilização da mutagenesis de alguns aminoácidos, os quais são específicos da seqüência de Cm-AAT, em aminoácidos consensos a outras AATs, Lucchetta e outros (2007) conseguiram afetar a seletividade da proteína original e o número de ésteres produzidos. Os dados apresentados naquele trabalho sugerem que a multiplicidade de genes de AAT é importante para a grande diversidade de ésteres formados em melões, o que poderia ser utilizado para propósitos biotecnológicos.

## 4 FATORES GENÉTICOS DA QUALIDADE E CONSERVAÇÃO DA FRUTA

### 4.1 Melhoramento da qualidade e conservação

O melhoramento genético voltado para a qualidade e a conservação foi, por muito tempo, uma meta secundária, pois o foco era a resistência às doenças. Porém, mutantes ou clones que produzem frutas com características de longa vida de conservação ou que não amadurecem têm sido utilizados nos últimos 20 anos para a geração de variedades comerciais visando manter ou melhorar estas características. No caso de maçã, a variedade Golden delicious foi difundida amplamente por causa de suas boas características agrônômicas (alto rendimento, ausência ou baixa alternância, longa conserva-

ção, cultivo em ampla faixa de climas e condições culturais). Entretanto, essa fruta apresenta limitações em qualidade sensorial, especialmente quando produzida com alto rendimento. Têm sido realizados cruzamentos entre variedades de maçã Golden delicious e variedades antigas de maçãs que apresentam bons atributos sensoriais, gerando novas variedades de maçã que combinam boas características sensoriais e agrônômicas. Da mesma forma, a pobre qualidade de conservação do grupo Deliciouso (farinosidade após poucos meses de armazenamento) foi melhorada pelo cruzamento com variedades de maçã que têm boa conservação (Rall's Janet), dando origem ao grupo de maçãs Fuji (VAYSSE et al., 2000).

Tigchelaar, McGlasson e Buescher (1978) afirmam que, em tomate, muitas das variedades modernas de longa ou média vida foram obtidas pela introgressão de genes dos mutantes naturais *ripening inhibitor* (rin) (inibição da maturação) e *non-ripening* (nor) (não amadurecem). Foi descoberto recentemente que o gene de *rin* corresponde a um fator de transcrição do tipo MADS *box* que regula o processo maturativo, conferindo insensibilidade ao etileno (GIOVANNONI, 2004). Porém, o caráter longa vida é associado à pobre qualidade sensorial.

Em melões do tipo Charentais, estão disponíveis genótipos comerciais de vida longa ou média, obtidos utilizando-se o melão não-climático denominado Vauclusien. Nesses híbridos, o desenvolvimento da zona de abscisão é demorado, prejudicando ou dificultando a determinação do ponto de colheita. O amadurecimento da fruta fica prejudicado, quando comparado com o tipo Charentais de origem, em termos de desverdecimento da casca e produção de aromas voláteis, embora o conteúdo de açúcar geralmente seja mais alto.

### 4.2 Determinismo genético da qualidade e conservação da fruta

Uma relação entre as taxas de amadurecimento e a produção de etileno foi estabelecida

para frutas climatéricas (GRIERSON, 1987). Desse modo, maçãs com baixa produção de etileno têm longa vida de armazenamento (GUSSMAN; GOFFREDZ; GIANFAGNA, 1993). As quantidades de etileno em maçã madura apresentam um paralelo com os níveis de transcritos do gene da 1-aminociclopropane-1-carboxilato sintase (ACCS), MdACS1 (HARADA et al., 2000). Um alelo do gene (MdACS1-2), que contém um retrotransposom inserido na região inicial 5', apresenta menores níveis de transcritos que o alelo MdACS1-1 do tipo selvagem. Cultivares que são homocigotas para esse alelo apresentam longa vida de armazenamento (SUNAKO et al., 1999) e reduzida queda em pré-colheita (SATO et al., 2004). A presença do alelo de MdACS1-2 pode, então, ser utilizada como marcador molecular para a descoberta precoce de cultivares de maçã com baixa produção de etileno e baixa taxa de queda da fruta.

Zheng e Wolff (2000) afirmam que existe uma correlação entre produção de etileno e degenerescência pós-colheita em melão. Utilizando sondas obtidas de cDNAs que codificam ACC oxidase, foi demonstrado que a baixa produção de etileno estava associada à presença de um alelo putativo ao de RFLP-ACO, considerando que a alta produção de etileno estava associada com o alelo Bo nas condições homocigotas. Esses marcadores de RFLP estão disponíveis para seleção assistida.

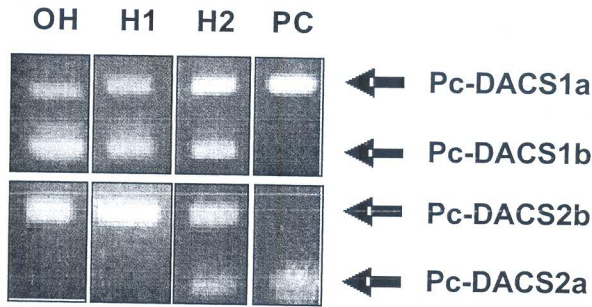
Empregando análises QTLs da qualidade em frutas de tomateiro comerciais, Causse e outros (2002) obtiveram indícios de que algumas regiões do cromossomo são capazes de controlar as variações em características sensoriais. QTLs maiores foram descobertos para peso da fruta, diâmetro, cor, firmeza, farinosidade e seis voláteis do aroma. QTLs que são próximos da qualidade da fruta foram determinados para maçãs e pêssegos. Além de auxiliar no entendimento do controle genético das características da qualidade da fruta, todos esses dados podem ser utilizados como marcadores genéticos para seleção de novas cultivares.

### 4.3 Determinismo genético da exigência em frio em pêras

Frutas da cultivar tardia de pêra Passe-Crassane (PC) requerem longo tratamento a frio para adquirir a capacidade de amadurecer, ao passo que as de cultivares precoces, como Old Home (OH), não necessitam desta condição prévia. El-Sharkawy e outros (2004) estudaram a regulação diferencial dos genes da ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintase (ACS) em pêras OH, PC e em híbridos OH x PC visando determinar o papel desta família de genes na exigência em frio. Dos sete cDNAs Pc-ACS isolados, quatro (Pc-ACS1a, Pc-ACS1b, Pc-ACS2a e Pc-ACS2b) mostraram expressão diferencial associada com a exigência em frio. Transcritos de Pc-ACS1a acumularam-se ao longo do tratamento com frio e transcritos de Pc-ACS2a, durante o amadurecimento em cultivares frio-dependentes. Pc-ACS1b e Pc-ACS2b somente foram observadas durante o amadurecimento de genótipos frio-independentes. Além disso, a acumulação de transcritos de Pc-ACS2a foi regulada negativamente pelo etileno, enquanto a de Pc-ACS2b foi regulada positivamente por este hormônio. Pc-ACS3, Pc-ACS4 e Pc-ACS5 acumularam transcritos semelhantes em todos os genótipos. Análises genéticas de OH, PC e de 22 progênies de OH x PC demonstraram que cultivares precoces e frio-dependentes eram homocigotas para Pc-ACS1a e Pc-ACS2a, enquanto cultivares precoces e frio-independentes eram heterocigotas para Pc-ACS1a e Pc-ACS1b e homocigotas para Pc-ACS2b (Figura 3). Diferenças nos alelos Pc-ACS e expressão do gene entre pêras que requerem frio e as que não requerem são fatores críticos na determinação do comportamento maturativo destas cultivares.

### 4.4 Determinismo genético do caráter climatérico

Existe uma grande diversidade dentro da espécie *Cucumis melo*, incluindo frutas dos tipos climatérico e não-climatérico. Essa diversidade proporciona excelente material para estu-



**Figura 3** – Análise Southern utilizando sondas de Pc-ACS1 e Pc-ACS2 para ampliar a região 5' específica de cada gene. O DNA foi extraído das variedades de pêra Passe-Crassane (PC), exigente em frio, Old Home (OH), frio-independente, um híbrido (H1) exigente em frio e um híbrido (H2) frio-independente. As bandas correspondem aos alelos de Pc-DACS1a, Pc-DACS1b, Pc-DACS2a e Pc-DACS2b.

**Fonte:** Adaptada de El-Sharkawy e outros (2004).

do do controle genético do caráter climatérico. Em melões climatéricos, como o Cantaloupe, a aplicação de etileno exógeno pode induzir abscisão prematura, aumento na produção de etileno interno e amadurecimento. Melões coreanos não-climatéricos, como *Cucumis melo* var. *agrestis*, não mostram sensibilidade a etileno em termos de amolecimento, produção deste fitormônio, abscisão e expressão de genes relacionados ao hormônio durante a maturação, embora as plantas habitualmente exibam tríplice resposta induzida pelo etileno (PÉRIN et al., 2002). Análises genéticas em populações recombinantes de Cantaloupe Charentais x *Cucumis melo* var. *agrestis* (PI 161375) inibiram, nas linhas segregantes, a abscisão da fruta e a produção climatérica do etileno, indicando que ambos os caracteres são controlados apenas por dois locos independentes da camada de abscisão (AI)-3 e (AI)-4. A intensidade de produção de etileno é controlada por pelo menos quatro QTLs diferentes localizados em outras regiões genômicas. O fenótipo não-climatérico é relacionado com formas alélicas recessivas do PI161375 (PÉRIN et al., 2002).

## 5 PERSPECTIVAS OFERECIDAS PELAS TÉCNICAS DE GENÔMICA E PROTEÔMICA

Técnicas de alta tecnologia desenvolvidas recentemente permitem analisar a estrutura e o funcionamento do genoma e começam a ter

impacto em pesquisas com frutas. Vários programas nacionais e internacionais estão atualmente combinando técnicas de genômica, proteômica, metabolômica e genética inversa na tentativa de desvendar os mecanismos moleculares do desenvolvimento das frutas. Com a implementação de programas de genoma (ALBA et al., 2004) e metabolômica (OVERY et al., 2005), juntamente com a aplicação de ferramentas de bioinformática, espera-se promover novos conhecimentos relativos ao desenvolvimento das frutas e às interações existentes entre as diferentes rotas metabólicas envolvidas em sua qualidade.

Os programas mais importantes que vêm sendo implementados têm utilizado o tomate como espécie modelo para pesquisas com frutas. Um consórcio internacional envolvendo vários países foi recentemente estabelecido com o objetivo de facilitar a obtenção e a disponibilização de seqüências ESTs e lâminas de DNA (*microarray*) de tomate. Isso permitirá estudar mudanças globais na expressão de genes durante o desenvolvimento e o amadurecimento da fruta e realizar análises dos perfis de expressão de um conjunto completo de genes envolvidos em um determinado mecanismo metabólico e seus reguladores específicos. Comparando diferenças entre variantes naturais, mutantes da maturação ou introgressão existente entre linhagens, os genes que são essenciais para aspectos específicos da fruta e amadurecimen-

to poderão ser identificados, assim como o impacto no seu metabolismo correspondente (FEI et al., 2004; OVERY et al., 2005). Além disso, a identificação funcional de genes por meio da genética inversa está sendo desenvolvida por diferentes programas, entre os quais o TILLING (*Targeting Induced Local Lesions In Genomes*) tem sido a tecnologia mais promissora. Finalmente, com o lançamento do projeto de seqüenciamento do genoma do tomate e a disponibilização, em um futuro próximo, de seqüências completas de seus genes, as principais inovações provavelmente mudarão nossa forma de determinar os tópicos de pesquisa em frutas.

## 6 QUAL SERÁ O FUTURO DA BIOTECNOLOGIA EM PÓS-COLHEITA?

A biotecnologia em pós-colheita assumiu posição de liderança em biotecnologia de planta em ambos os níveis, básico e aplicado. O primeiro produto transgênico colocado no mercado para consumo *in natura* foi o tomate *antisense* da PG (KRAMER; REDENBAUGH, 1994). Também foi a biotecnologia pós-colheita que promoveu os primeiros exemplos de viabilidade da utilização da tecnologia *antisense* para identificar a função de um gene em plantas superiores (HAMILTON; LYCETT; GRIERSON, 1990; SHEEHY; KRAMER; HIATT, 1988; SMITH et al., 1988). Entretanto, grande parte dos resultados desses estudos foi obtida em laboratório, o que, a princípio, não é suficiente para estabelecer se um determinado gene identificado pode apresentar interesse prático e comercial. Mais trabalhos devem ser realizados visando a avaliação de possíveis alterações da

fisiologia da planta inteira e de seu desempenho hortícola. Entre as exigências cruciais para isso estão o isolamento e a caracterização de promotores órgão-específicos ou a indução da expressão do transgene no órgão designado ou no momento desejado. Os promotores fruta-específicos que foram isolados e caracterizados, freqüentemente apresentam baixa eficiência quando comparados ao promotor constitutivo 35S, havendo, portanto, necessidade de novos promotores sintéticos ou nativos.

Embora grandes progressos tenham sido realizados para compreender alguns aspectos do processo de amadurecimento e senescência, mais investigações fundamentais ainda são necessárias em algumas áreas. A falta de conhecimento acerca dos mecanismos moleculares do amadurecimento de frutas não-climatéricas é um bom exemplo. Estão sendo realizados avanços importantes na genômica, o que permitirá desenvolver ferramentas eficientes para a identificação e a análise funcional de genes e rotas envolvidas no amadurecimento e senescência de plantas e frutas. Outro domínio em que o progresso ainda está lento é o da resistência aos patógenos em pós-colheita.

O desenvolvimento da engenharia genética para reduzir desperdícios e manter a qualidade dos produtos hortícolas frescos em nível comercial, provavelmente necessitará de esforços muito maiores e mais integrados que aqueles realizados na indústria de processamento. Para isso, será preciso o envolvimento de biólogos moleculares, genomistas, melhoristas, fisiologistas e patologistas pós-colheita, socioeconomistas e todos os membros da cadeia produtiva e de distribuição, inclusive os consumidores.

## AGRADECIMENTOS

C.L. Girardi e L. Lucchetta foram estudantes de Doutorado do laboratório de Génétique et Biotechnologie des Fruits na França e receberam bolsa da Capes - Ministério da Educação do Brasil. Parte das pesquisas foi financiada pelo conselho regional de Midi Pyrénées (processo 01008920 e 03001146).

- FLORES, F.; BEN-AMOR, M.; JONES, B.; PECH, J. C.; BOUZAYEN, M.; LATSCHÉ, A.; ROMOJARO, F. The use of ethylene-suppressed lines to assess differential sensitivity to ethylene of the various ripening pathways in Cantaloupe melons. **Physiologia Plantarum**, København, v. 113, p. 128-133, 2001.
- FLORES, F.; EL YAHYAOU, F.; DE BILLERBECK, G.; ROMOJARO, F.; LATSCHÉ, A.; BOUZAYEN, M.; PECH, J. C.; AMBID, C. Role of ethylene in the biosynthetic pathway of aliphatic ester aroma volatiles in Charentais Cantaloupe melons. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 201-206, 2002.
- FLORES, F.; MARTINEZ-MADRID, M. C.; BEN-AMOR, M.; PECH, J. C.; LATSCHÉ, A.; ROMOJARO, F. Modified atmosphere packaging confers chilling tolerance on ethylene-inhibited Cantaloupe Charentais melon fruit. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 219, p. 614-619, 2004.
- GIOVANNONI, J. J. Genetic regulation of fruit development and ripening. **Plant Cell Supplement**, Waterbury, v. 16, Supplement, p. S170-S180, 2004.
- GOOD, X.; KELLOGG, J. A.; WAGONER, W.; LANGHOFF, D.; MATSUMURA, W.; BESTWICK, R. K. Reduced ethylene synthesis by transgenic tomato expressing S-adenosylmethionine hydrolase. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 26, p. 781-790, 1994.
- GRIERSON, D. Senescence in fruits. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 5, p. 859-862, 1987.
- GUBRIUM, E. K.; CLEVINGER, D. J.; CLARK, D. G.; BARRETT, J. E.; NELL, T. E. Reproduction and horticultural performance of transgenic ethylene-insensitive petunias. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 125, p. 277-281, 2000.
- GUIS, M.; BOTONDI, R.; BEN-AMOR, M.; AYUB, R.; BOUZAYEN, M.; PECH, J. C.; LATSCHÉ, A. Ripening-associated biochemical traits of cantaloupe Charentais melons expressing an antisense ACC oxidase transgene. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 122, p. 748-751, 1997.
- GUSSMAN, C. D.; GOFFREDZ, J. C.; GIANFAGNA, T. J. Ethylene production and fruit-softening rates in several apple fruit ripening variants. **HortScience**, Alexandria, v. 28, p. 135-137, 1993.
- HADFIELD, K. A.; ROSE, J. C. K.; YAVER, D. S.; BERKA, R. M.; BENNETT, A. B. Polygalacturonase gene expression in ripe melon fruit supports a role for polygalacturonase in ripening-associated pectin disassembly. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 117, p. 363-373, 1998.
- HAMILTON, A. J.; LYCETT, G. W.; GRIERSON, D. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. **Nature**, London, v. 346, p. 284-287, 1990.
- HARADA, T.; SUNAKO, T.; WAKASA, Y.; SOEJIMA, J.; SATOH, T.; NIIZEKI, M. An allele of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene accounts for the low level of ethylene production in climacteric fruits of some apple cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, p. 742-746, 2000.
- HARADA, M.; UEDA, Y.; IWATA, T. Purification and some properties of alcohol acyltransferase from banana fruit. **Plant Cell Physiology**, Leiden, v. 26, p. 1067-1074, 1985.
- HUBER, D. J.; O'DONOGHUE, E. M. Polyuronides in avocado (*Persea americana*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits exhibit markedly different patterns of molecular weight downshifts during ripening. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 102, p. 473-480, 1993.

- JONES, B.; FRASSE, P.; OLMOS, E.; ZEGZOUTI, H.; LI, Z. G.; LATCHÉ, A.; PECH, J. C.; BOUZAYEN, M. Down-regulation of an ARF-like gene in the tomato results in a pleiotropic phenotype including dark-green and blotchy ripening fruit. **The Plant Journal**, Gainesville, v. 32, p. 603-614, 2002.
- KLEE, H. J. Ripening physiology of fruit from transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants with reduced ethylene synthesis. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 102, p. 911-916, 1993.
- KRAMER, M. G.; KELLOGG, J.; WAGONER, W.; MATSUMURA, W.; GOOD, X.; PETERS, S.; CLOUGH, G.; BESTWICK, R.K. Reduced ethylene synthesis and ripening control in tomato expressing S-adenosyl-methionine hydrolase. In: KANELIS, A. K.; CHANG, C.; KENDE, H.; GRIERSON, D. (Ed.) **Biology and biotechnology of the plant hormone ethylene**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. p. 307-319.
- KRAMER, M. G.; REDENBAUGH, K. Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene: The FLAVR SAVR-TM tomato story. **Euphytica**, Wageningen, v. 79, p. 293-297, 1994.
- KRAMER, M. G.; SANDERS, R.; BOLKAN, H.; WATERS, C.; SHEEHY, R. E.; HIATT, W. R. Postharvest evaluation of transgenic tomatoes with reduced levels of polygalacturonase: processing, firmness and disease resistance. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 1, p. 241-255, 1992.
- LUCCHETTA, L.; MANRIQUEZ, D.; EL-SHARKAWY, I.; FLORES, F. B.; SANCHEZ-BEL, P.; ZOUINE, M.; GINIES, C.; BOUZAYEN, M.; ROMBALDI, C.; PECH, J. C.; LATCHÉ, A. Biochemical and catalytic properties of three recombinant alcohol acyltransferases of melon. Sulfur-containing esters formation, regulatory role of CoA-SH in activity, and sequence elements conferring substrate preference. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, D.C., v. 55, n. 13, p. 5213-5220, 2007.
- MANRÍQUEZ, D.; EL-SHARKAWY, I.; FLORES, F. B.; REGAD, F.; BOUZAYEN, M.; LATCHÉ, A.; PECH, J. C. Fruit-specific gene expression and biochemical characteristics of two highly divergent alcohol dehydrogenases of melon. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 61, p. 675-685, 2006.
- MWANIKI, M. W.; MATHOOKO, F. M.; MATSUZAKI, M.; HIWASA, K.; TATEISHI, A.; USHIJIMA, K.; NAKANO, R.; INABA, A.; KUBO, Y. Expression characteristics of seven members of the  $\beta$ -galactosidase gene family in 'La France' pear (*Pyrus communis* L.) fruit during growth and their regulation by 1-methylcyclopropene during postharvest ripening. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 36, p. 253-263, 2005.
- NISHIYAMA, K.; GUI, M.; ROSE, J. K.; KUBO, Y.; BENNETT, K. A.; WANGJIN L.; KATO, K.; USHIJIMA, K.; NAKANO, R.; INABA, A.; BOUZAYEN, M.; LATCHÉ, A.; PECH, J. C.; BENNETT, A. B. Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in Charentais melon. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 6, p. 1281-1290, 2007.
- OELLER, P. W.; LU, M. W.; TAYLOR, L. P.; PIKE, D. A.; THEOLOGIS, A. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. **Science**, Washington, D.C., v. 254, n. 5030, p. 437-439, 1991.

- OVERY S. A.; WALKER H. J.; MALONE, S.; HOWARD, T. P.; BAXTER, C. J.; SWEETLOVE, L. J.; HILL, S. A.; QUICK W. P. Application of metabolite profiling to the identification of traits in a population of tomato introgression lines. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, p. 287-296, 2005.
- PÉRIN, C.; GOMEZ-JIMENEZ, M. C.; HAGEN, L.; DOGIMONT, C.; PECH, J. C.; LATCHÉ, A.; PITRAT, M. D.; LELIÈVRE, J. M. Molecular and genetic characterisation of a non-climacteric phenotype in melon reveals two loci conferring altered ethylene response in fruit. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 129, p. 300-209, 2002.
- PICTON, S. J.; BARTON, S. L.; BOUZAYEN, M.; HAMILTON, A. J.; GRIERSON, D. Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene. **The Plant Journal**, Gainesville, v. 3, p. 469-481, 1993.
- RANWALA, A. P.; SUEMATSU, C.; MASUDA, H. The role of  $\beta$ -galactosidases in the modification of cell wall components during muskmelon fruit ripening. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 100, p. 1318-1325, 1992.
- ROSE, J. K. C.; BENNETT, A. B. Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. **Trends in Plant Science**, London, v. 4, p. 176-183, 1999.
- ROSE, J. K. C.; HADFIELD, K. A.; LABAVITCH, J. M.; BENNETT, A. B. Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 117, p. 345-361, 1998.
- SATO, T.; KUDO, T.; AKADA, T.; WAKASA, Y.; NIIZEKI, M.; HARADA, T. Allelotype of a ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene defines the rate of fruit drop in apple. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 129, p. 32-36, 2004.
- SCHUCH, W.; KANCZLER, J.; ROBERTSON, D.; HOBSON, G.; TUCKER, G.; GRIERSON, D.; BRIGHT, S.; BIRD, C. Fruit quality characteristics of transgenic tomato fruit with altered polygalacturonase activity. **HortScience**, Alexandria, v. 26, p. 1517-1520, 1991.
- SHAW, J. F.; CHEN, H. H.; TSAI, M.; KUO, C. I.; HUANG, L. C. Extended flower longevity of *Petunia hybrida* plants transformed with boers, a mutated ERS gene of *Brassica oleracea*. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 9, p. 211-216, 2002.
- SHEEHY, R. E.; KRAMER, M.; HIATT, W. R. Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, D.C., v. 85, p. 8805-8809, 1988.
- SITRIT, Y.; BENNETT, A. B. Regulation of tomato fruit polygalacturonase mRNA accumulation by ethylene. A re-examination. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 116, p. 1145-1150, 1998.
- SMITH, C. J. S.; WATSON, C. F.; RAY, J.; BIRD, C. R.; MORRIS, P. C.; SCHUCH, W.; GRIERSON, D. Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. **Nature**, London, v. 334, p. 724, 1988.
- SMITH, D. L.; ABBOTT, J. A.; GROSS, K. C. Down-regulation of tomato  $\beta$ -galactosidase 4 results in decreased fruit softening. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 129, p. 1755-1762, 2002.

- SMITH, D. L.; GROSS, K. C. A family of at least seven  $\beta$ -galactosidase genes is expressed during tomato fruit development. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 123, p. 1173-1183, 2000.
- SPEIRS, J.; LEE, E.; HOLT, K.; YONK-DUK, K.; SCOTT, N. S.; LOVEYS, B.; SCHUCH, W. Genetic manipulation of alcohol dehydrogenase levels in ripening tomato fruits affects the balance of some flavor aldehydes and alcohols. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 117, p. 1047-1058, 1998.
- SUNAKO, T.; SAKURABA, W.; SEND, M.; AKADA, S.; ISHIKAWA, R.; NIIZEKI, M.; HARADA, T. An allele of the ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (ACS1) in apple fruit with a long storage life. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 119, p. 1297-1303, 1999.
- TATEISHI, A.; INOUE, H.; SHIBA, H.; YAMAKI, S. Molecular cloning  $\beta$ -galactosidase from Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) and its gene expression with fruit ripening. **Plant Cell Physiology**, Leiden, v. 42, p. 492-498, 2001.
- TIGCHELAAR, E. C.; McGLASSON, W. B.; BUESCHER, R. W. Genetic regulation of tomato fruit ripening. **HortScience**, Alexandria, v. 13, p. 508-513, 1978.
- VAYSSE, P.; SCANDELLA, D.; MASSERON, A.; MATHIEU, V.; TRILLOT, M.; MARION, M. **Recognizing apple and pear varieties**. Paris: Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes, 2000.
- WANG, C.; CHIN, C. K.; HO, C. T.; HWANG, C. F.; POLASH, J. J.; MARTIN, C. E. Changes of fatty acids and fatty acid-derived flavor compounds by expressing the yeast  $\Delta$ -9 desaturase gene in tomato. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, D.C., v. 44, n. 10, p. 3399-3402, 1996.
- WANG, H.; JONES, B.; LI, Z.; FRASSE, P.; DELALANDE, C.; REGAD, F.; CHAABOUNI, S.; LATCHÉ, A.; PECH, J. C.; BOUZAYEN, M. The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 17, n. 10, p. 2676-2692, 2005.
- WILKINSON, J. Q.; LANAHAN, M. B.; CLARK, D. G.; BLEECKER, A. B.; CHANG, C.; MEYEROWITZ, E. M.; KLEE, H. J. A dominant mutant receptor from Arabidopsis confers ethylene insensitivity in heterologous plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 15, p. 444-447, 1997.
- YAHYAOU, F. E. L.; WONGS-AREE, C.; LATCHÉ, A.; HACKETT, R.; GRIERSON, D.; PECH, J. C. Molecular and biochemical characteristics of a gene encoding an alcohol acyl-transferase involved in the generation of aroma volatile esters during melon ripening. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 269, p. 2359-2365, 2002.
- ZEGZOUTI, H.; JONES, B.; FRASSE, P.; MARTY, C.; MAITRE, B.; LATCHÉ, A.; PECH, J. C.; BOUZAYEN, M. Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene-responsive and ripening-related genes isolated by differential display. **Plant Journal**, Gainesville, v. 18, n. 6, p. 589-600, 1999.
- ZHENG, X. Y.; WOLFF, D. W. Ethylene production, shelf-life and evidence of RFLP polymorphisms linked to ethylene genes in melon (*Cucumis melo* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, p. 613-624, 2000.