

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

MARÍLIA APARECIDA STROKA KREMER

MELÃO CLIMATÉRICO X NÃO-CLIMATÉRICO: DIFERENCIAL DE EXPRESSÃO  
GÊNICA NO METABOLISMO DE AÇÚCARES E CAROTENOIDES

PONTA GROSSA - PR  
2021

MARÍLIA APARECIDA STROKA KREMER

MELÃO CLIMATÉRICO X NÃO-CLIMATÉRICO: DIFERENCIAL DE EXPRESSÃO  
GÊNICA NO METABOLISMO DE AÇÚCARES E CAROTENOIDES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, curso de Mestrado da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Área de Concentração: Agronomia. Linha de Pesquisa: Fisiologia, Melhoramento e Manejo de Culturas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub

PONTA GROSSA – PR  
2021

K92 Kremer, Marília Aparecida Stroka  
Melão climatérico x não-climatérico: diferencial de expressão gênica no metabolismo de açúcares e carotenoides / Marília Aparecida Stroka Kremer. Ponta Grossa, 2021.  
62 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia - Área de Concentração: Agricultura), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub.

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Mazer Etto.

1. Sacarose. 2. Maturação. 3. Trealose. 4. Coloração do fruto. I. Ayub, Ricardo Antonio. II. Etto, Rafael Mazer. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Agricultura. IV.T.

CDD: 634



## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação: **MELÃO CLIMATÉRICO X NÃO-CLIMATÉRICO: DIFERENCIAL DE EXPRESSÃO GÊNICA NO METABOLISMO DE AÇÚCARES E CAROTENOIDES.**

Nome: **Marília Aparecida Stroka Kremer**

Orientador: Ricardo Antonio Ayub

### Aprovado pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vanessa Galli

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Silvanda de Melo Silva

Ponta Grossa - PR, 17 de dezembro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Antonio Ayub, Professor(a)**, em 17/12/2021, às 14:41, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **SILVANDA DE MELO SILVA, Usuário Externo**, em 17/12/2021, às 16:50, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **VANESSA GALLI, Usuário Externo**, em 17/12/2021, às 19:59, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador **0786217** e o código CRC **D50B134B**.

## AGRADECIMENTOS

Ao término desta jornada acadêmica, agradeço infinitamente a Deus pela oportunidade a mim concedida e por todas as pessoas que colocou no meu caminho até aqui.

Agradeço aos meus pais, João e Janete, por toda dedicação e apoio nestes anos, pelos dias que precisaram me ajudar diretamente nos experimentos e pelo privilégio de permitirem estudar, mesmo com todas as atribulações. Especialmente à minha mãe, minha saudade constante, de onde estiver, agradeço por me iluminar e cuidar todos os dias, mesmo quando as forças parecem ser poucas. Só vocês sabem como não foi fácil chegar até aqui.

Ao meu marido Lucas, por escolher traçar este caminho comigo e dividir os objetivos, compreender meus momentos de ausência e me acompanhar tantas vezes ao laboratório. Também agradeço por todo o apoio da família que ganhei, minha sogra Sandra, meu sogro Luiz, que tão prematuramente nos deixou, e minha cunhada Brenda.

Ao meu orientador Dr. Ricardo Antonio Ayub pelos oito anos de orientação, pela compreensão, auxílio e oportunidade. Estendo os agradecimentos aos professores Dr. Rafael Etto e Dra. Carolina Galvão por todos os conselhos e suporte para os experimentos. Agradeço também ao tempo e dedicação da Prof. Natali Maidl de Souza para auxiliar-me nas interpretações da estatística.

A todos os queridos amigos que me acompanharam Flávia, Calistene, Willian, Isabela, Salomé, Keren, Jessé e demais integrantes do LABFRUTI e LABMOM, que tornaram mais leve este caminho. Agradeço especialmente à Kamila Karoline Los, que me apoiou nos piores momentos e sem a qual este trabalho não poderia ter sido realizado, à Daniele Domingues, Mariana Celano e Juliana Hay pela disposição e entrega, e à Michelle Orane por sua dedicação e ajuda. Agradeço à Letícia Reis pelos dados de HPLC cedidos para o complemento deste trabalho.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa pela formação recebida e suporte físico e material ao experimento. Aos técnicos Wilson Padilha e Lígia Dombroski pelo acompanhamento, auxílio e cuidado com os laboratórios.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para a construção deste trabalho, minha eterna gratidão.

O meu passado é a referência que me projeta e que eu devo ultrapassar.  
Portanto, ao meu passado, eu devo o meu saber e a minha ignorância, as minhas necessidades, as minhas relações, a minha cultura e o meu corpo. Hoje, que espaço o meu passado deixa para a minha liberdade hoje?  
Não sou escrava dele.  
O que eu sempre quis foi comunicar unicamente da maneira mais direta o sabor da minha vida.  
Unicamente o sabor da minha vida.

- Simone de Beauvoir

## RESUMO

Dentre os atributos de qualidade importantes para a comercialização dos frutos de meloeiro estão o acúmulo de açúcares, principalmente sacarose, e a coloração de polpa e casca. Tais características podem ser afetadas, entre outros fatores, pelo tipo de maturação. A espécie *Cucumis melo* L. é de extremo interesse para estudos voltados ao metabolismo destes compostos por possuir cultivares climatéricas e não-climatéricas. Com isto, este trabalho objetivou investigar a expressão gênica de candidatos ao metabolismo da sacarose e da carotenogênese através de RT-qPCR de forma integrativa a análises fisiológicas de pós-colheita e de quantificação de açúcares através de cromatografia líquida de alta performance, em frutos de meloeiro cv. Gaúcho (climatérico) e cv. Eldorado (não-climatérico). Os resultados aqui apresentados apontam que a sacarose sintase 1 (*CmSUS1*) possui a função de síntese e acúmulo de sacarose para ambas as cultivares, enquanto que a sacarose sintase 2 (*CmSUS2*) é mais expressa em frutos de melão 'Gaúcho', contribuindo para o menor conteúdo de hexoses nesta cultivar. O inibidor de invertase 1 (*CmINH1*) apresenta maior expressão em frutos não-climatéricos e pode estar envolvido na maturação desencadeada ou sinalizada por açúcares. A  $\alpha$ -galactosidase neutra 2 (*CmNAG2*) possui papéis distintos para as duas cultivares, atuando na síntese de substratos para o crescimento de frutos jovens de 'Eldorado', enquanto que em frutos maduros de 'Gaúcho' participa do metabolismo dos OFR para acúmulo de sacarose. A expressão dos genes de trealoses-6-fosfato sintase (TPS) indica uma maior participação destas enzimas na regulação dos açúcares de melão 'Gaúcho', exceto pela expressão de *CmTPS7* que também aumenta durante o amadurecimento de 'Eldorado'. Na via dos carotenoides, as caroteno isomerase 1 e 2 (*CmCRTISO1* e *CmCRTISO2*) e  $\beta$ -anel caroteno hidroxilase (*Cm $\beta$ OHase1*) são mais expressos em frutos de melão 'Gaúcho' em estágios mais próximos da maturação e podem estar envolvidos na formação de pigmentos, compostos voláteis e fitormônios para esta cultivar. Tais resultados contribuem para a elucidação de diferenças intraespecíficas relacionadas aos atributos de qualidade do fruto em diferentes tipos de maturação e demonstra pela primeira vez a expressão de genes participantes deste processo para a cultivar 'Gaúcho', de importância comercial para o Brasil.

**Palavras-chave:** sacarose, maturação, trealose, coloração do fruto.

## ABSTRACT

Among the important quality attributes for the commercialization of melon fruits are the accumulation of sugars, mainly sucrose, and the flesh and rind color. Such traits can be affected, among other factors, by the type of ripening. The species *Cucumis melo* L. is of extreme interest for studies aimed at the metabolism of these compounds as it has both climacteric and non-climacteric cultivars. Thus, this work aimed to investigate the gene expression of candidates for sucrose metabolism and carotenogenesis through RT-qPCR in an integrative approach to physiological analyzes of postharvest and sugar quantification through liquid chromatography of high performance, in melon fruits cv. Gaúcho (climacteric) and cv. Eldorado (non-climacteric). The results presented here indicate that sucrose synthase 1 (*CmSUS1*) has the function of synthesis and sucrose accumulation for both cultivars, while sucrose synthase 2 (*CmSUS2*) is higher expressed in 'Gaúcho' melon fruits, contributing to the lower content of hexoses in this cultivar. The invertase inhibitor 1 (*CmINH1*) is higher expressed in non-climacteric fruits and may be involved in maturation triggered by sugars. Neutral  $\alpha$ -galactosidase (*CmNAG2*) has distinct roles for the two cultivars, acting in the synthesis of substrates for the growth of young 'Eldorado' fruits, while in mature 'Gaúcho' fruits it participates in the metabolism of OFR for sucrose accumulation. The expression of trehalose-6-phosphate synthase (TPS) genes indicates a greater participation of these enzymes in the regulation of sugars in 'Gaúcho' melon, except for the expression of *CmTPS7*, which also increases during the ripening of 'Eldorado'. In the carotenoid pathway, carotene isomerase 1 and 2 (*CmCRTISO1* and *CmCRTISO2*) and  $\beta$ -ring carotene hydroxylase (*Cm $\beta$ OHase1*) are higher expressed in 'Gaúcho' melon fruits at premature and full ripening stages and may be involved in the formation of pigments, volatile compounds and phytohormones for this cultivar. These results contribute to the elucidation of intraspecific differences related to fruit quality attributes in different types of maturation and demonstrate for the first time the expression of genes participating in this process for the cultivar 'Gaúcho', of commercial importance for Brazil.

**Key words:** sucrose, ripening, trehalose, fruit colour.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Via metabólica dos Oligossacarídeos da Família da Rafinose em melão e diferentes rotas que levam ao acúmulo da sacarose. A) UDPGlc como substrato da síntese de trealose; B) UDPGlc como substrato da síntese de sacarose. UDPglc – uridina difosfato-glicose; Fru6P - frutose-6-fosfato; Glc6P - glicose-6-fosfato; Glc1P - glicose-1-fosfato; Gal1P - galactose-1-fosfato; Trealose-6-P – trealose-6-fosfato; Sacarose-6-P – sacarose-6-fosfato..... 22
- Figura 2.** Via metabólica dos carotenoides e xantofilas e possíveis desvios de substratos. MEP - 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato; PDS – fitoeno dessaturase; Z-ISSO - ζ-caroteno dessaturase; ZDS - ζ-caroteno isomerase; CYP97A e CYP97C - hidroxilases tipo citocromo P450; ZEP – zeaxantina epoxidase; VDE – violaxantina de-epoxidase. .... 26
- Figura 3.** Plantas de melão cultivadas verticalmente através de tutoramento com fitilho. Ponta Grossa - PR, novembro de 2018. .... 30
- Figura 4.** Etapas da polinização manual de meloeiro, realizada em Ponta Grossa – PR (2018). a) Destacamento da flor masculina da planta; b) retirada de sépalas para exposição do pólen; c) contato do pólen com a flor feminina; e d) marcação de data da flor feminina polinizada. FM – flor masculina; FF – flor feminina. .... 31
- Figura 5.** Frutos de melão ‘Eldorado’ (a esquerda) e ‘Gaúcho’ (a direita) em diferentes estádios de maturação de acordo com os dias após a polinização (D.A.P.). .... 31
- Figura 6.** Etapas da extração de RNA total de frutos de melão. À esquerda, 4 gramas de melão macerados em nitrogênio líquido, em vidraria RNase Free. À direita, pellet de RNA total recém extraído. .... 33
- Figura 7.** Mudanças de coloração demonstradas por análises colorimétricas dos melões ‘Gaúcho’ (climatérico) e ‘Eldorado’ (não-climatérico). A) ângulo Hue; B) Brilho (L\*), no qual 0 representa a cor preta e 100 representa o branco; C) coordenada a\*, na qual -a\* representa a cor verde e +a\* a cor vermelha; e D) coordenada b\*, sendo -b\* tons em azul e +b\* tons em amarelo. .... 36
- Figura 8.** Diagrama de cromaticidade do espaço de cor CIELAB. As coordenadas colorimétricas a\* e b\* representam as cores do verde (-a\*) para o vermelho (+a\*) e do azul (-b\*) para o amarelo (+b\*), respectivamente. .... 37
- Figura 9.** Teores de sacarose (mg.mL<sup>-1</sup>) no mesocarpo de melão de acordo com (A) dias de desenvolvimento do fruto e (B) cultivar (‘Gaúcho’ e ‘Eldorado’). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. .... 39
- Figura 10.** Teores de frutose (mg.mL<sup>-1</sup>) nos frutos de melão ‘Gaúcho’ e ‘Eldorado’ em três estágios de desenvolvimento do fruto. Resultados expressos em média ± erro padrão, letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre dias de desenvolvimento do fruto

para a mesma cultivar e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as cultivares para um mesmo estágio de amadurecimento, segundo Teste de Tukey a 5% de significância.....40

**Figura 11.** Teores de glicose ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) nos frutos de melão ‘Gaúcho’ e ‘Eldorado’ durante três estágios de desenvolvimento do fruto. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão, onde letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre dias de desenvolvimento do fruto para a mesma cultivar e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as cultivares para um mesmo estágio de amadurecimento, segundo Teste de Tukey a 5% de significância.....40

**Figura 12.** Expressão relativa do gene *CmSUS1* ao longo da maturação de melões cvs. Gaúcho e Eldorado, determinada através de  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$ . Resultados expressos através da média obtida para as cultivares  $\pm$  erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.....42

**Figura 13.** Expressão relativa do gene *CmSUS2* para as cultivares de melão ‘Gaúcho’ e ‘Eldorado’ determinada através de  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$ . Resultados expressos através da média obtida dos dias de desenvolvimento  $\pm$  erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.....43

**Figura 14.** Expressão relativa do gene *CmINH1* determinada através de  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$  para (A) dias de desenvolvimento dos frutos e (B) cultivares ‘Gaúcho’ e ‘Eldorado’. Resultados expressos através da média  $\pm$  erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.....44

**Figura 15.** Expressão relativa do gene *CmNAG2* determinada através de  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$  para os frutos de melão ‘Gaúcho’ e ‘Eldorado’ em três estágios de desenvolvimento. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão, onde letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre dias de desenvolvimento do fruto para a mesma cultivar e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as cultivares para um mesmo estágio de amadurecimento, segundo Teste de Tukey a 5% de significância. ....46

**Figura 16.** Expressão relativa do gene *CmTPS9* determinada através de  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$  para os frutos de melão ‘Gaúcho’ e ‘Eldorado’ durante três estágios de desenvolvimento. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão, onde letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre dias de desenvolvimento do fruto para a mesma cultivar e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as cultivares para um mesmo estágio de amadurecimento, segundo Teste de Tukey a 5% de significância. ....47

**Figura 17.** Expressão relativa do gene *CmTPS7* ao longo da maturação determinada através de  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$ , resultados expressos através da média obtida para as cultivares  $\pm$  erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.....48

**Figura 18.** Expressão relativa do gene *CmTPS5* determinada através de  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$  para os frutos de melão ‘Gaúcho’ e ‘Eldorado’ durante três estágios de desenvolvimento. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão, onde letras maiúsculas diferentes indicam diferença

significativa entre dias de desenvolvimento do fruto para a mesma cultivar e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as cultivares para um mesmo estágio de amadurecimento, segundo Teste de Tukey a 5% de significância. ....48

**Figura 19.** Expressão relativa do gene *CmPSY3* para as cultivares de melão ‘Gaúcho’ e ‘Eldorado’ determinada através de  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$ , resultados expressos através da média obtida ao longo dos dias de desenvolvimento  $\pm$  erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância. ....51

**Figura 20.** Expressão relativa do gene *CmCRTISO1* determinada através de  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$  para os frutos de melão ‘Gaúcho’ e ‘Eldorado’ durante três estágios de desenvolvimento. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão, letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre dias de desenvolvimento do fruto para a mesma cultivar e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as cultivares para um mesmo estágio de amadurecimento, segundo Teste de Tukey a 5% de significância. ....52

**Figura 21.** Expressão relativa do gene *CmCRTISO2* determinada através de  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$  para os frutos de melão ‘Gaúcho’ e ‘Eldorado’ durante três estágios de desenvolvimento. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão, onde letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre dias de desenvolvimento do fruto para a mesma cultivar e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as cultivares para um mesmo estágio de amadurecimento, segundo Teste de Tukey a 5% de significância. ....53

**Figura 22.** Expressão relativa do gene *Cm $\beta$ OHase1* determinada através de  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$  para os frutos de melão ‘Gaúcho’ e ‘Eldorado’ durante três estágios de desenvolvimento. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão, onde letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre dias de desenvolvimento do fruto para a mesma cultivar e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as cultivares para um mesmo estágio de amadurecimento, segundo Teste de Tukey a 5% de significância. ....53

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Genes codificadores e enzimas correspondentes relacionadas ao metabolismo de açúcares em melão, suas formas curtas de nomeação ( <i>short form</i> ), ID dos unigenes no Genoma Internacional das Cucurbitáceas (ICuGI) e ID das <i>expressed sequence tags</i> (EST) no genoma MELONOMICS ( <a href="http://www.melonomics.net/">http://www.melonomics.net/</a> ).....	20
--	----

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Genes codificadores e enzimas correspondentes relacionadas ao metabolismo de carotenoides em melão, suas formas curtas de nomeação (*short form*) e ID da EST no genoma MELONOMICS (<http://www.melonomics.net/>).....27
- Tabela 2.** Genes de interesse escolhidos para a análise de RT-qPCR, suas formas curtas de nomeação (*short form*), identificação no genoma Melonomics, pares de *primer* iniciadores específicos (*Forward* – sentido e *Reverse* – anti-sentido), tamanho do amplificado (Amp) em pares de base (pb) e temperatura de anelamento (°C). .....34
- Tabela 3.** Resultados das variáveis pH e °Brix analisadas a partir do suco de melão cv. Gaúcho e cv. Eldorado. ....38

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>16</b>
3.1	CULTURA DO MELÃO .....	16
3.2	FISIOLOGIA DA MATURAÇÃO DE FRUTOS .....	17
3.3	AÇÚCARES NO FRUTO .....	19
3.3.1	Composição de açúcares no fruto durante o desenvolvimento .....	19
3.3.2	Metabolismo da sacarose.....	19
3.4	COLORAÇÃO DOS FRUTOS .....	24
3.4.1	Metabolismo de carotenoides.....	25
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
4.1	MATERIAL VEGETAL .....	30
4.2	QUALIDADE PÓS-COLHEITA .....	32
4.3	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC) PARA QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES.....	32
4.4	EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR .....	33
4.5	DESENHO DE INICIADORES ( <i>PRIMERS</i> ).....	33
4.6	RT-qPCR E ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA .....	34
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
5.1	QUALIDADE PÓS-COLHEITA .....	36
5.2	METABOLISMO DE AÇÚCARES .....	38
5.2.1	Composição de açúcares .....	38
5.3	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA VIA RT-qPCR.....	41
5.3.1	Metabolismo de açúcares.....	41
5.3.2	Metabolismo de carotenoides.....	50
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>57</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O melão (*Cucumis melo* L.), espécie pertencente à família Cucurbitaceae é cultivado mundialmente em regiões temperadas e tropicais, em casa de vegetação ou à campo (AMANULLAH *et al.*, 2018; FERNÁNDEZ-TRUJILLO *et al.*, 2011; PARIS *et al.*, 2017). Dados do IBGE (2020) estimam a área plantada no Brasil em 23.827 ha, produzindo cerca de 613.933 toneladas de melão, figurando entre as frutas mais exportadas do país, com mais de 86 mil toneladas enviadas para o exterior no primeiro semestre de 2021 (ABRAFRUTAS, 2021).

Além de sua importância econômica, o fruto é um modelo para estudos voltados aos processos fisiológicos das plantas, como a determinação sexual, biologia vascular e maturação dos frutos (AYUB *et al.*, 1996; GUIB *et al.*, 1997; MARTIN *et al.*, 2009; PECH *et al.*, 2008; SALADIÉ *et al.*, 2015; SCHEMBERGER *et al.*, 2020). É de extremo interesse para comparações do processo de amadurecimento por possuir cultivares climatéricas e não-climatéricas, permitindo a análise de vias dependentes e independentes de etileno sem intervenção de diferenças interespecíficas, além de possuírem o genoma completo e transcritomas disponíveis para estudo (FERNÁNDEZ-TRUJILLO *et al.*, 2011; GARCIA-MAS *et al.*, 2012; SCHEMBERGER *et al.*, 2020; YANO; EZURA, 2016; YANO; NONAKA; HIROSHI, 2018; ZHANG *et al.*, 2019).

A determinação da qualidade dos frutos de meloeiro é complexa, sendo os principais atributos o teor de açúcar, cor da casca e da polpa, acidez, aroma, firmeza, tamanho e formato, que compõem a elegância do fruto e são decisivos na escolha dos consumidores, além do conteúdo nutricional e da vida útil pós-colheita (AMANULLAH *et al.*, 2018; FREILICH *et al.*, 2015; SALADIÉ *et al.*, 2015; YANO; EZURA, 2016). Estes atributos estão diretamente ligados ao processo de maturação dos frutos e são controlados por múltiplos genes, os quais sofrem ação de diversos fatores genéticos e ambientais (AMANULLAH *et al.*, 2018; GARCIA, 2018; KOU *et al.*, 2021).

Tratando-se de açúcares, em geral, as Cucurbitáceas possuem carregamento simplástico do floema e exportam oligossacarídeos da família da rafinose (rafinose e estaquiose), além de sacarose para os tecidos dreno (GUR *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2012). Chrost e Schmitz (1997) verificaram que a concentração desses oligossacarídeos nos frutos de meloeiro é muito baixa, sugerindo um rápido metabolismo para compostos mais simples. Em geral, nos frutos, as hexoses glicose e frutose constituem a maior porcentagem dos açúcares solúveis armazenados, porém para melão, o principal componente responsável pelo sabor doce é a sacarose, variando seu teor dependendo do genótipo e de sua interação com o ambiente

(BALDWIN *et al.*, 1991; BURGER; SCHAFFER, 2007; FERNÁNDEZ-TRUJILLO *et al.*, 2011; SALADIÉ *et al.*, 2015).

Os carotenoides integram um grupo de diversos pigmentos coloridos e são compostos nutricionais importantes para a dieta humana por apresentarem funções como precursores de vitamina A, ação anti-inflamatória e antioxidante (ZHENG; KUIJER; AL-BABILI, 2021). Como função biológica em plantas, são atrativos para polinizadores e dispersores de sementes, agem como fotoprotetores (pigmentos acessórios na fotossíntese) e servem como substrato para formação de compostos aromáticos e de fitormônios como o ácido abscísico e estrigolactonas (OHMIYA *et al.*, 2018; SATHASIVAM *et al.*, 2020; SUN; TADMOR; LI, 2020). Este atributo é altamente variável entre os genótipos, havendo frutos de polpa branca, verde, amarela e alaranjada, com evidências apontando que esta regulação ocorre no nível transcricional e pós-transcricional, através da expressão diferencial de genes carotenogênicos e suas interações moleculares (OHMIYA *et al.*, 2018; TZURI *et al.*, 2015).

Estudos biomoleculares mais amplos que compreendam o funcionamento das vias metabólicas integrando a construção dos atributos de qualidade e a evolução da maturação são ferramentas essenciais, a nível comercial e científico, para direcionar modificações de manejo e intervenções na engenharia genética a fim de valorizar a qualidade dos frutos de meloeiro e de toda a família Cucurbitaceae.



## 2 OBJETIVOS

Este trabalho objetivou elucidar aspectos do metabolismo dos açúcares e carotenoides em frutos de meloeiro (*Cucumis melo* L.) climatérico cv. Gaúcho (grupo *Cantalupensis*) e não-climatérico (melão amarelo, grupo *Inodorus*) cv. Eldorado, bem como os mecanismos moleculares que coordenam este processo, através da análise de expressão gênica ao longo da maturação.

Os objetivos específicos foram:

- a) identificar genes de interesse para as vias metabólicas de açúcares e carotenoides em melão com base em resultados anteriores de análise de RNA-Seq e da literatura;
- b) desenhar iniciadores (*primers*) específicos para os genes de interesse e analisar a expressão destes através da técnica de RT-qPCR;
- c) comparar os resultados de expressão gênica de ambos os genótipos com os resultados de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) do perfil de açúcares (sacarose, glicose e frutose), adquiridos anteriormente.
- d) comparar a expressão gênica entre os frutos climatéricos e não-climatéricos e assim verificar diferenças intrínsecas no metabolismo dos açúcares e carotenoides de acordo com o tipo de maturação.

As informações obtidas poderão contribuir para o entendimento da fisiologia da maturação dos frutos de melão de forma ampla e especificamente para estas cultivares de importância comercial para o Brasil, bem como auxiliar na seleção e engenharia genética de frutos de melhor qualidade em relação aos atributos teor de açúcares, carotenoides e propriedades nutricionais.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 CULTURA DO MELÃO

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma planta herbácea, anual, de crescimento rápido e adaptada a climas quentes. Com origem asiática, é uma espécie diploide com 12 pares de cromossomos ( $2n=24$ ) e de ampla diversidade de variedades botânicas que produzem frutos de diferentes formatos, cores, tamanhos e tipos de maturação (LI *et al.*, 2006; PARIS *et al.*, 2017; PITRAT, 2016; TUAN *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019). A espécie pode ser classificada em pelo menos 16 grupos botânicos (PARIS *et al.*, 2017) dos quais os mais representativos no Brasil são o *Inodorus* e o *Cantaloupe*. Seu uso industrial é voltado para a produção de sucos, geleias e sorvetes e também é amplamente consumido *in natura* (TUAN *et al.*, 2019).

Segundo os dados da FAO (2019), atualmente a China figura como o maior produtor da fruta, com mais de 27 milhões de toneladas anuais em 1.039.691 ha de área colhida, enquanto que o Brasil ocupa a 12ª posição mundial em termos de produção. Em solo brasileiro, o IBGE (2020) estima a área plantada em 23.827 ha, produzindo cerca de 613.933 toneladas de melão, sendo um importante produto de exportação (ABRAFRUTAS, 2021).

O melão tipo amarelo, do grupo *Inodorus* (não-climatérico) é plantado no Brasil para consumo interno e exportação, principalmente devido ao sabor e à capacidade de transporte, sendo a região Nordeste responsável pela maior produção (YURI; RESENDE; COSTA, 2019). Há ainda demanda crescente de melões tipo “nobre”, como Pele de Sapo, Gália e Charentais pelos consumidores brasileiros e pelo mercado externo, principalmente os países europeus (COSTA, 2017). O melão ‘Caipira’ ou ‘Gaúcho’ (*Cucumis melo*, grupo *Cantalupensis*), também produzido no Brasil e com maior expressão no Sul do país, pertence ao grupo de maturação climatérica, possui aroma e sabor marcantes e boa aceitação pelo mercado (OLIVEIRA *et al.*, 2017; PITRAT, 2016; SOUSA *et al.*, 2017).

O fruto é dividido em exocarpo, mesocarpo e endocarpo e acumula sacarose ao invés de hexoses como açúcar de reserva, bem como não acumula amido. A cor da polpa varia de cores claras até o alaranjado, principalmente devido aos diferentes teores de  $\beta$ -caroteno e é rico em ácido ascórbico, fibras, açúcares e minerais importantes para a dieta (COSTA, 2017; ESTERAS *et al.*, 2018; FILGUEIRA, 2013; PARIS *et al.*, 2017).

Quatro tipos de expressão sexual podem ocorrer na espécie *Cucumis melo* L., sendo elas a andromonoiccia, ginomonoiccia, monoiccia e flores hermadroditas. A maior parte das plantas de meloeiro cultivadas no Brasil são andromonóicas com flores masculinas e flores

completas separadas espacialmente na mesma planta (COSTA, 2017; KIILL *et al.*, 2015). As flores masculinas se desenvolvem ao longo da haste principal e possuem menor dimensão, enquanto as flores completas ou femininas se formam nas ramas laterais (FILGUEIRA, 2013; KIILL *et al.*, 2015). Quanto à morfologia, as flores do meloeiro possuem cálice verde com cinco sépalas, corola amarela com cinco pétalas ligadas pela base e o ovário é ínfero (SOUSA, 2008). A abertura floral ocorre pela manhã, em torno de 5h e 5h30 e as flores começam a perder a viabilidade a partir das 15h, com tempo de vida médio em torno de 12 horas (KOUONON *et al.*, 2009). As melhores taxas de fecundação e frutificação são alcançadas através da polinização cruzada (manual ou por insetos), apesar da planta possuir autocompatibilidade (KIILL *et al.*, 2013). O sistema radicular é superficial, com raiz pivotante, não tolerando solos ácidos, encharcados, rasos, argilosos e pesados (COSTA, 2017; FILGUEIRA, 2013).

A temperatura ótima para cultivo do meloeiro se dá em torno de 25°C a 35°C e é muito suscetível ao frio (OLIVEIRA *et al.*, 2017). No Brasil, em regiões de clima mais ameno, sugere-se o plantio de outubro a fevereiro e em regiões quentes pode-se produzir durante o ano todo (YURI; RESENDE; COSTA, 2019).

Ao menos quatro estágios de desenvolvimento do fruto podem ser definidos, segundo Zhang *et al.* (2016), consistindo em fruto jovem (com aproximadamente 10 dias após a polinização – D.A.P.), em expansão (~20 D.A.P.), em estágio prematuro (~30 D.A.P.) e plenamente maduro (~40 D.A.P.), podendo variar de acordo com a cultivar e local de crescimento.

### 3.2 FISILOGIA DA MATURAÇÃO DE FRUTOS

A espécie *Cucumis melo* L. possui intenso interesse biológico por possuir variedades com diferentes padrões de maturação, que podem ser divididos de maneira simplificada em climatérico e não-climatérico de acordo com a dependência do etileno para o processo de amadurecimento. O etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) foi o primeiro fitormônio gasoso descoberto e sua síntese se dá a partir do precursor S-adenosil-1-metionina (AdoMet) que é então convertido para ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) através da enzima ACC sintase (EC 4.4.1.14) e por fim, ACC é oxidado pela enzima ACC oxidase (EC 1.14.17.4) para formar etileno (KOU *et al.*, 2021; SALADIÉ *et al.*, 2015; YANO; EZURA, 2016).

Frutos tipicamente climatéricos são caracterizados por um pico de respiração seguida da marcante síntese autocatalítica de etileno, como em tomate, banana e manga (KOU *et al.*, 2021). Em melão maduro apresentam, frequentemente, aroma acentuado, polpa alaranjada e

menor tempo de vida útil pós-colheita, pois perdem firmeza e sofrem deterioração do sabor mais rapidamente, como no grupo *Cantalupensis* (que abrange, por exemplo, cultivares de melão Charentais e Védraçais) e *Reticulatus* (como o melão Dulce). Em contraposição, frutos não climatéricos (morango, citros e uva, por exemplo) apresentam pouca ou nenhuma síntese de etileno e geralmente não iniciam a maturação com a aplicação exógena deste hormônio. Frutos não climatéricos de melão mantêm a firmeza quando maduros, geralmente possuem polpa clara ou branca, pouco aroma (explicado pela via de síntese dos ésteres voláteis ser dependente de etileno) e maior vida útil pós-colheita, tal como os frutos do grupo *Inodorus/Ibericus* (que inclui, por exemplo, cultivares de melão Amarelo, ‘Piel de Sapo’, ‘Honey Dew’ e melão Hami) (PARIS *et al.*, 2017; PITRAT, 2016; SALADIÉ *et al.*, 2015; YANO; EZURA, 2016; ZHENG; WOLFF, 2000).

Variedades de melão climatérico possuem a característica de formar zona de abscisão e exalarem aroma acentuado quando os frutos estão plenamente maduros, ao contrário de frutos não climatéricos que não sofrem abscisão e são pouco aromatizados, prejudicando a identificação da maturação comercial e a tomada de decisão sobre o ponto de colheita (SALADIÉ *et al.*, 2015; YANO; EZURA, 2016).

Além da classificação dos frutos quanto à maturação, as vias metabólicas de diversos atributos de qualidade também são classificadas em dependentes ou independentes de etileno. Ayub *et al.* (1996) foram pioneiros na identificação deste fator através da supressão da produção de etileno com a transformação do gene *CmACO1* no sentido antisense em melão Charentais cv. Védraçais (climatérico). O melão transgênico apresentava maior vida de prateleira, casca verde, sem formação de linha de abscisão, no entanto, a polpa manteve-se alaranjada e a produção de açúcares e ácidos orgânicos também não foi afetada, demonstrando serem independentes de etileno (AYUB *et al.*, 1996). Entretanto, diferentes mecanismos de regulação podem agir para formar um mesmo composto, resultando em diferenças intrínsecas no metabolismo entre genótipos (YANO; EZURA, 2016).

Frutos climatéricos já possuem amplo estudo em termos de fisiologia e bioquímica da maturação, porém para frutos não-climatéricos muitas lacunas ainda estão abertas, exigindo atenção por parte dos pesquisadores. Além disto, o entendimento das vias metabólicas dependentes ou não de etileno sem a interferência de fatores interespecíficos, que interferem negativamente na clareza dos resultados, são essenciais para o desenvolvimento de novas tecnologias de produção e de pós-colheita destes frutos.

### 3.3 AÇÚCARES NO FRUTO

#### 3.3.1 Composição de açúcares no fruto durante o desenvolvimento

Geralmente, frutos maduros têm predomínio das hexoses glicose e frutose na constituição dos açúcares solúveis, porém em *Lycopersicon chmielewskii* e *Solanum habrochaites*, espécies de tomates silvestres, e em frutos de melão doce (*Cucumis melo* L. domesticado), a sacarose é a principal responsável pelo sabor adocicado, sendo armazenada nos vacúolos das células do parênquima do pericarpo (NOOKARAJU *et al.*, 2010; SALADIÉ *et al.*, 2015).

No início do desenvolvimento dos frutos de melão, o conteúdo de açúcares solúveis é baixo, composto principalmente por glicose e frutose. Com o evento da maturação, o teor de açúcar aumenta rapidamente devido ao acúmulo de sacarose e há o declínio das hexoses ou permanência constante destas (GUR *et al.*, 2016; LINGLE; DUNLAP, 1987).

Diferenças na composição dos açúcares solúveis de grupos e variedades de melão, devem-se além do manejo e do clima, principalmente à ação distinta das enzimas catalizadoras de reações envolvendo a sacarose, seja por características genéticas ou pelo resultado da interação genótipo x ambiente (BURGER *et al.*, 2000; NOOKARAJU *et al.*, 2010).

#### 3.3.2 Metabolismo da sacarose

Compreender o metabolismo de açúcares em melão já foi o tema de diversos trabalhos. Dai *et al.* (2011) encontraram, através de sequenciamento genético, 42 genes relacionados à via metabólica dos oligossacarídeos da família da rafinose (OFR), lista esta que foi ampliada para 66 genes com o sequenciamento do genoma do melão (melonomics.net) (GARCIA-MAS *et al.*, 2012). Schemberger *et al.* (2020) também relataram recentemente, a participação de genes relacionados à síntese de trealose como importantes para o metabolismo de açúcares em melão.

O teor de sólidos solúveis (SS) é a medida mais utilizada para representar os teores de açúcares totais no fruto e trata-se de um atributo poligênico, com pelo menos três locus de característica quantitativa (QTLs - *quantitative trait locus*) relacionados ao teor de Brix mapeados em diferentes cromossomos (7, 9 e 10) em melão (AMANULLAH *et al.*, 2018). Dai *et al.* (2011) apontam que mais de uma dúzia de reações enzimáticas estão envolvidas no metabolismo da sacarose, atuando na hidrólise do açúcar, fosforilação, transglicosilação, clivagem e síntese (Quadro 1).

**Quadro 1.** Genes codificadores e enzimas correspondentes relacionadas ao metabolismo de açúcares em melão, suas formas curtas de nomeação (*short form*), ID dos unigenes no Genoma Internacional das Cucurbitáceas (ICuGI) e ID das *expressed sequence tags* (EST) no genoma MELONOMICS (<http://www.melonomics.net/>).

(continua)

Enzima	Gene	ICuGI unigene ID	MELONOMICS ID
$\alpha$ -Galactosidase Ácida 1	<i>CmAAG1</i>	MU44893	MELO3C011770
$\alpha$ -Galactosidase Ácida 2	<i>CmAAG2</i>	MU65691	MELO3C011771
$\alpha$ -Galactosidase Ácida Putativa <sup>1</sup>	<i>CmAAG-LIKE1</i>	MU51660 MU61553 MU67306	MELO3C010698
Nova $\alpha$ -Galactosidase Ácida Putativa <sup>2</sup>	<i>CmAAG-LIKE2</i>	-	MELO3C020138
$\alpha$ -Galactosidase Neutra 1	<i>CmNAG1</i>	MU45660	MELO3C025599
$\alpha$ -Galactosidase Neutra 2	<i>CmNAG2</i>	MU45612	MELO3C023110
$\alpha$ -Galactosidase Neutra 3	<i>CmNAG3</i>	MU50243	MELO3C010314
$\alpha$ -Galactosidase Neutra Putativa	<i>CmNAG-LIKE1</i>	MU48538	MELO3C026247
$\alpha$ -Galactosidase Neutra Putativa	<i>CmNAG-LIKE2</i>	MU58753	MELO3C009979
$\alpha$ -Galactosidase Neutra Putativa	<i>CmNAG-LIKE3</i>	MU64378	MELO3C015912
Nova $\alpha$ -Galactosidase Neutra Putativa	<i>CmNAG-LIKE4</i>	-	MELO3C002287
Invertase Ácida 1	<i>CmAin1</i>	MU60417	MELO3C005560
Invertase Ácida 2	<i>CmAin2</i>	MU47159	MELO3C005363
Invertase Neutra 1	<i>CmNIN1</i>	MU45089 MU59818 MU56837	MELO3C006727
Invertase Neutra 2	<i>CmNIN2</i>	MU50462 MU65693	MELO3C012360
Invertase Neutra 3	<i>CmNIN3</i>	MU46770	MELO3C024083
Invertase Neutra 4	<i>CmNIN4</i>	MU44623	MELO3C004170
Nova Invertase Neutra Putativa	<i>CmNIN-LIKE2</i>	-	MELO3C013379
Invertase de Parede Celular 1	<i>CmCIN1</i>	MU43713	MELO3C016877
Invertase de Parede Celular 2	<i>CmCIN2</i>	MU50786	MELO3C024383
Invertase de Parede Celular 3	<i>CmCIN3</i>	MU53184	MELO3C010751
Invertase de Parede Celular 4	<i>CmCIN4</i>	MU53489	MELO3C009488
Nova Invertase de Parede Celular Putativa	<i>CmCIN-LIKE1</i>	-	MELO3C024384
Inibidor de Invertase 1	<i>CmINH1</i>	MU45449	MELO3C022457
Inibidor de Invertase 2	<i>CmINH2</i>	MU43544	MELO3C008049
Inibidor de Invertase 3	<i>CmINH3</i>	MU51906	MELO3C003367
Inibidor de Invertase Putativo	<i>CmINH-LIKE1</i>	MU61927	MELO3C022456
Novo Inibidor de Invertase Putativo	<i>CmINH-LIKE2</i>	-	MELO3C017187
Novo Inibidor de Invertase Putativo	<i>CmINH-LIKE3</i>	-	MELO3C006266
Galactoquinase	<i>CmGK</i>	MU54492	MELO3C006726
Hexoquinase 1	<i>CmHK1</i>	MU29719	MELO3C004591
Hexoquinase 2	<i>CmHK2</i>	MU20377	MELO3C015416
Hexoquinase 3	<i>CmHK3</i>	MU31349	MELO3C007677
Nova Hexoquinase Putativa	<i>CmHK-LIKE1</i>	-	MELO3C003755
Nova Hexoquinase Putativa	<i>CmHK-LIKE2</i>	-	MELO3C01457
Nova Hexoquinase Putativa	<i>CmHK-LIKE3</i>	-	MELO3C015169

**Quadro 2.** Genes codificadores e enzimas correspondentes relacionadas ao metabolismo de açúcares em melão, suas formas curtas de nomeação (*short form*), ID dos unigenes no Genoma Internacional das Cucurbitáceas (ICuGI) e ID das *expressed sequence tags* (EST) no genoma MELONOMICS (<http://www.melonomics.net/>).

(conclusão)			
Frutoquinase 1	<i>CmFK1</i>	MU46323	MELO3C020278
Frutoquinase 2	<i>CmFK2</i>	MU51092	MELO3C005395
Frutoquinase 3	<i>CmFK3</i>	MU50678	MELO3C022452
Frutoquinase Putativa	<i>CmFK-LIKE1</i>	MU52372	MELO3C009032
Nova Frutoquinase Putativa	<i>CmFK-LIKE2</i>	-	MELO3C009200
Nova Frutoquinase Putativa	<i>CmFK-LIKE3</i>	-	MELO3C016138
Fosfoglicomutase (Plastídeo)	<i>CmPGMpl</i>	MU47702	MELO3C005396
Fosfoglicomutase (Citoplasma)	<i>CmPGMcyt</i>	MU47383 MU44957	MELO3C005293
Fosfoglicose isomerase (Plastídeo)	<i>CmPGIpl</i>	MU46633	MELO3C011104
Fosfoglicose isomerase (Citoplasma)	<i>CmPGIcyt</i>	MU58375	MELO3C010936
UDP-Glc/gal pirofosforilase	<i>CmUGGP</i>	MU47766	MELO3C008467
UDP-Glc/gal pirofosforilase Putativa	<i>CmUGGP-LIKE1</i>	MU60761	MELO3C008313
Galactose-1-P-uridil transferase	<i>CmUT</i>	MU46271	MELO3C006156
UDP-glicose pirofosforilase	<i>CmUGP</i>	MU47685	MELO3C020244
UDP-glicose pirofosforilase Putativa	<i>CmUGP-LIKE1</i>	MU47342 MU52742	MELO3C011346
UDP-glicose epimerase 1	<i>CmUGE1</i>	MU47192 MU62509	MELO3C005769
UDP-glicose epimerase 2	<i>CmUGE2</i>	MU49759 MU61968	MELO3C016300
UDP-glicose epimerase 3	<i>CmUGE3</i>	MU51262	MELO3C005640
Sacarose Sintase 1	<i>CmSUS1</i>	MU53959 MU63794 MU47336 MU60050 MU60353 MU63124	MELO3C015552
Sacarose Sintase 2	<i>CmSUS2</i>	MU60624 MU49231	MELO3C025101
Sacarose Sintase 3	<i>CmSUS3</i>	MU55306 MU50152	MELO3C017942
Nova Sacarose Sintase Putativa	<i>CmSUS-LIKE1</i>	-	MELO3C001956
Sacarose-P-sintase 1	<i>CmSPS1</i>	MU47089 MU65695 MU49488	MELO3C010300
Sacarose-P-sintase 2	<i>CmSPS2</i>	MU43508	MELO3C020357
Nova Sacarose-P-sintase Putativa	<i>CmSPS-LIKE1</i>	-	MELO3C008101
Sacarose-P-fosfatase 1	<i>CmSPP1</i>	MU51242 MU62132 MU62894 MU58753	MELO3C009570

Fonte: Adaptado de Dai *et al.* (2011) e Garcia-Mas *et al.* (2012).

Notas:

<sup>1</sup> O termo “putativo” refere-se a uma nova enzima predita no genoma MELONOMICS com Unigene correspondente no ICuGI.

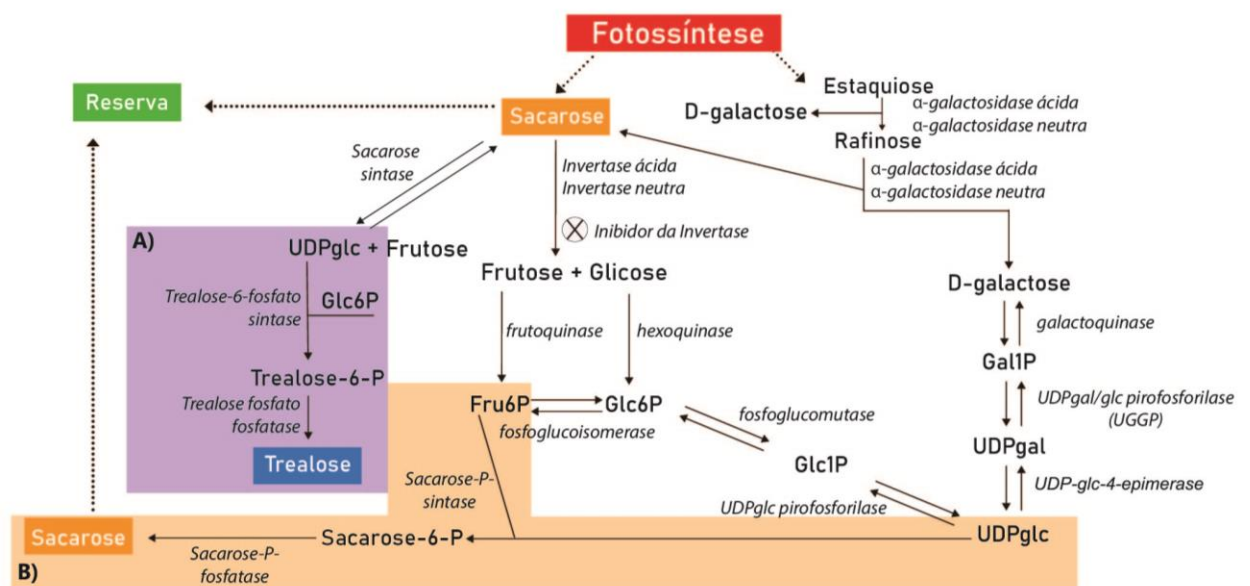
<sup>2</sup> “Nova enzima putativa” refere-se a uma nova enzima predita no Genoma MELONOMICS sem Unigene correspondente descrito no ICuGI.

Três fontes principais são utilizadas para o acúmulo de sacarose pelos frutos: o açúcar advindo diretamente da fotossíntese, o produto do catabolismo dos oligossacarídeos da família da rafinose (OFR) e a ressíntese da sacarose (Figura 1) (SCHEMBERGER *et al.*, 2020).

Os oligossacarídeos da família da rafinose, rafinose e estaquiase, ao serem descarregados do floema para o fruto dreno sofrem hidrólise pela  $\alpha$ -galactosidase ácida (AAG) e/ou neutra (NAG). A rafinose é então clivada em sacarose e galactose e a estaquiase em galactose e rafinose (LEIDA *et al.* 2015; OHKAWA *et al.*, 2010). A galactose liberada pode ser fosforilada pela galactoquinase, resultando em galactose-1-fosfato (Gal1P) e através da ação conjunta de uridina difosfato (UDP)-galactose/glicose pirofosforilase (UGGP), UDP-glicose-4-epimerase (UGE) e UDP-glicose pirofosforilase (UGP) é convertida para glicose-1-fosfato (Glc1P) (DAI *et al.*, 2006; DAI *et al.*, 2011; SALADIÉ *et al.*, 2015).

A Glc1P pode ser transformada nas hexoses-fosfato glicose-6-fosfato (Glc6P) e frutose-6-fosfato (Fru6P) através das enzimas fosfoglicomutase (PGM) e fosfoglicoisomerase (PGI), respectivamente. A Fru6P (que pode ser desviada para respiração celular) e a UDP-glicose (UDPGlc) são substratos para a síntese ou ressíntese de sacarose via sacarose-fosfato-sintase (SPS) e hidrólise subsequente por sacarose-fosfato-fosfatase (SPP) (DAI *et al.*, 2011; SALADIÉ *et al.*, 2015).

**Figura 1.** Via metabólica dos Oligossacarídeos da Família da Rafinose em melão e diferentes rotas que levam ao acúmulo da sacarose. A) UDPGlc como substrato da síntese de trealose; B) UDPGlc como substrato da síntese de sacarose. UDPglc – uridina difosfato-glicose; Fru6P - frutose-6-fosfato; Glc6P - glicose-6-fosfato; Glc1P - glicose-1-fosfato; Gal1P - galactose-1-fosfato; Trealose-6-P – trealose-6-fosfato; Sacarose-6-P – sacarose-6-fosfato.



Fonte: A autora, adaptado de Stroka, Schemberger e Ayub (2021).



A sacarose sintase (SUS) também pode atuar na síntese de sacarose a partir de frutose e UDP-glicose ou na hidrólise deste açúcar devido a capacidade de realizar a reação inversa, clivando sacarose em frutose e UDP-glicose (DAI *et al.*, 2011; SALADIÉ *et al.*, 2015; SCHEMBERGER *et al.*, 2020). Glicose e a frutose podem ser fosforiladas pela hexoquinase (HK) e frutoquinase (FK), respectivamente, para formar Fru6P e Glc6P (TESTONE *et al.*, 2019).

Várias são as espécies vegetais que possuem duas ou mais isoformas da sacarose sintase, com funções e perfil de expressão diferentes, dando flexibilidade ao metabolismo da sacarose durante as etapas do desenvolvimento do fruto (KLOTZ *et al.*, 2003). Em melão, três isoformas podem estar presentes (SUS1, SUS2 e SUS3), além das formas putativas em diferentes fases do desenvolvimento (DAI *et al.*, 2011).

As enzimas invertases ácidas (INV) ou neutras (NIN) hidrolisam a sacarose advinda de translocação ou de síntese, resultando em frutose e glicose, podendo estar presentes na parede celular (CIN) ou solúveis no vacúolo (DAI *et al.*, 2011). Um dos mecanismos de regulação das invertases, por sua vez, é o controle pós-traducional a partir de proteínas inibidoras da invertase (INH) (LEIDA *et al.*, 2015; PRESSEY, 1994).

A hidrólise da sacarose pela ação das invertases, além de diminuir a doçura do fruto, forma hexoses que podem alimentar as cadeias respiratórias e conseqüentemente produzir ácidos orgânicos, tal como o malato, gerando sabor desagradável ao fruto (SALADIÉ *et al.*, 2015).

O declínio da atividade da invertase ácida vacuolar, bem como o aumento da expressão de *SUS*, são pontos-chave do processo de acúmulo de sacarose durante o amadurecimento (BURGER; SCHAFFER, 2007; DAI *et al.*, 2011; SALADIÉ *et al.*, 2015).

Em oito genótipos de melão estudados por Burger e Schaffer (2007), todos apresentaram perfil de diminuição da atividade da invertase ácida vacuolar, sendo o momento deste evento um indicativo interessante no cálculo dos dias potenciais para acúmulo de sacarose. Portanto, uma alternativa para o aumento do teor de sacarose é a manipulação da atividade das invertases por meio de proteínas inibidoras. As pequenas proteínas inibidoras da invertase (15-23 kDa), vacuolares ou de parede celular, são caracterizadas pela presença de quatro resíduos conservados de cisteína, compõem a família dos inibidores da pectina metil-esterase (PMEI) e regulam a atividade das invertases através da formação reversível de um complexo proteínico (1 INH: 1 INV), processo este altamente dependente do pH celular (GIOVANE *et al.*, 2004; JIN *et al.*, 2009; PRESSEY, 1994; RAUSH; GREINER, 2004).

Jin *et al.* (2009) ao silenciarem o gene codificante do inibidor de invertase INVINH1 em tomate, que tem como alvo uma invertase de parede celular, obtiveram aumento de aproximadamente 70% em glicose e frutose comparado ao fruto selvagem jovem e até 30% em frutos maduros. Greiner *et al.* (1999) obtiveram redução de 75% do acúmulo de hexoses quando transformaram tubérculos de batata com o gene *Nt-INHH* que atua como inibidor da invertase vacuolar. Estes trabalhos demonstram o potencial a ser explorado com relação a esta regulação pós-traducional pouco estudada ainda em melão.

Quanto ao metabolismo da trealose, um dissacarídeo não redutor, Glc6P e UDPGlc podem ser convertidas em trealose-6-fosfato (T6P) e UDP através da ação da trealose-6-fosfato sintase (TPS) e T6P pode ser desfosforilada para formar trealose + fosfato inorgânico pela trealose-fosfato-fosfatase (TPP) (SCHEMBERGER *et al.*, 2020; STROKA; SCHEMBERGER; AYUB, 2021). Yadav *et al.* (2014) postularam sobre o modelo sacarose-T6P em tecidos vegetais, afirmando que T6P age como osmoprotetor e importante regulador negativo dos níveis de sacarose na célula, a fim de obter uma razão ótima entre os açúcares. Além disto, T6P está diretamente relacionada a respostas de estresses e à alocação de carbono em vegetais (MORABITO; SECHI; SCHUBERT, 2021).

Ayub *et al.* (1996) apontaram a produção de açúcares em melão como independente de etileno, demonstrado pelo fato de frutos de melão Charentais (Grupo Cantaloupe-climatérico) transformados com o DNA antisense do gene que codifica a enzima ACC oxidase apresentarem gosto adocicado. Porém em estudos recentes, sugere-se que apesar do acúmulo de açúcares ocorrer de forma independente ao fitormônio, o metabolismo dos oligossacarídeos tem se mostrado distinto para os tipos de maturação, como por diferenças epigenéticas, polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs - *single nucleotide polymorphism*) e expressão diferencial de genes (LEIDA *et al.*, 2015; SALADIÉ *et al.*, 2015; ZHONG *et al.*, 2013).

### 3.4 COLORAÇÃO DOS FRUTOS

O teor de carotenoides representa um importante atributo de qualidade para melão no que tange o valor nutricional e a aparência. Estes pigmentos coloridos podem ser sintetizados em organismos como algas, bactérias e plantas, atribuindo coloração amarelada, alaranjada ou avermelhada, sendo uma característica geneticamente determinada (SATHASIVAM *et al.*, 2020; TUAN *et al.*, 2019; TZURI *et al.*, 2015). Além disto, o conteúdo final de carotenoides é determinado pela razão entre a biossíntese e a degradação dos compostos carotenogênicos, aliado à capacidade de armazenamento do tecido dreno, fatores que podem ser coordenados

pela expressão de genes e suas interações pós-traducionais e com o ambiente (OHMIYA *et al.*, 2018; SALADIÉ *et al.*, 2015; SUN; TADMOR; LI, 2020; SUN, LI *et al.*, 2020).

Em frutos e flores, os carotenoides são sintetizados e acumulados durante a maturação em plastídeos especializados, denominados cromoplastos (LI *et al.*, 2006; OHMIYA *et al.*, 2018; TUAN *et al.*, 2019). Pech, Bouzayen e Latché (2014) citam que quando há a transição dos plastídios de cloroplasto para cromoplastos nos frutos, há uma regulação negativa dos genes da via fotossintética e posterior degradação da clorofila. Concomitantemente, ocorre a ativação da via biossintética dos carotenoides, mudando a coloração verde do fruto e conseqüentemente, o composto de acúmulo predominante.

A cor da casca do melão, atributo sugerido como dependente de etileno (AYUB *et al.*, 1996), é atribuída principalmente ao balanço de clorofilas e carotenoides como  $\beta$ -caroteno e mais recentemente descoberto, ao acúmulo de um pigmento amarelo do grupo dos flavonoides denominado de chalcona naringenina (chalcona 4,20,40,60-tetra hidroxil), que ocorre de forma independente aos demais (TADMOR *et al.*, 2010).

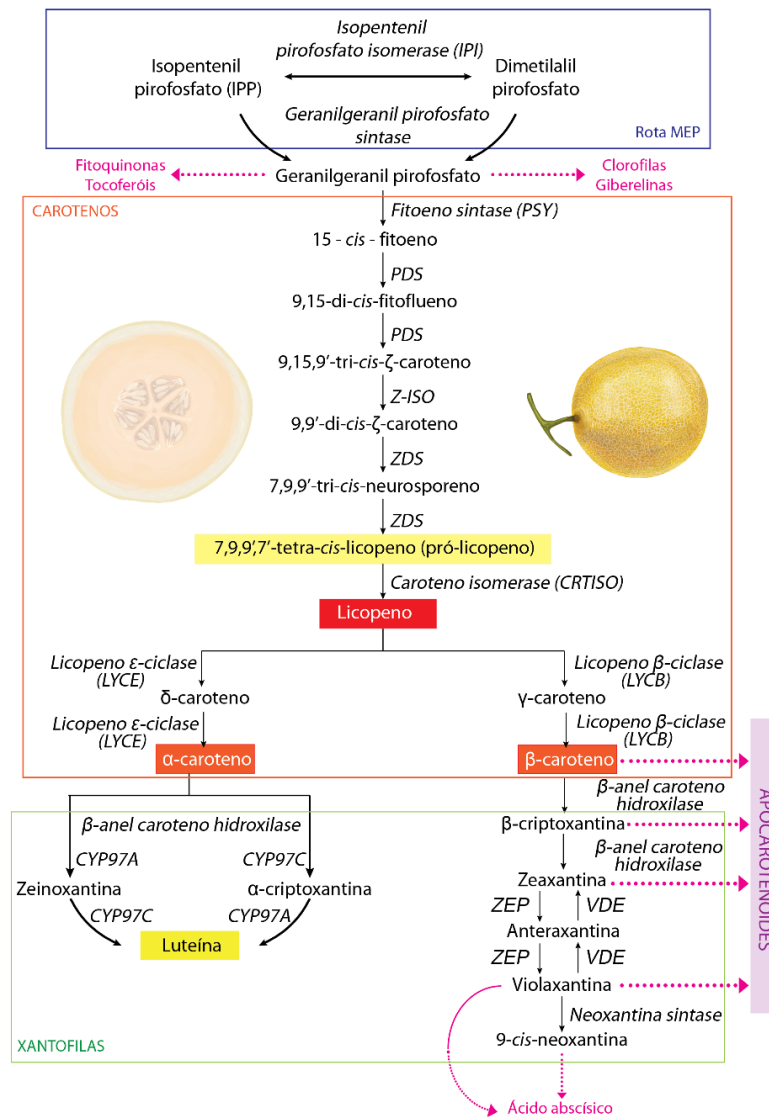
A cor da polpa do melão, que é o enfoque deste trabalho, é resultado da combinação entre os carotenoides e clorofilas acumuladas, sem a presença de chalcona naringenina, gerando diferentes tonalidades de branco, verde ou laranja (SALADIÉ *et al.*, 2015; TADMOR *et al.*, 2010). Esteras *et al.* (2018) analisaram através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) os carotenoides produzidos por frutos de melão maduro com diferentes tonalidades de polpa e verificaram diferenças acentuadas no teor de  $\beta$ -caroteno, luteína e  $\beta$ -criptoxantina entre os genótipos, entretanto estes foram menos evidentes em frutos de polpa clara (branca/verde claro), comuns em frutos de melão não climatérico, como Piel de Sapo e Amarelo. Saladié *et al.* (2015), de forma complementar, identificaram nas polpas de melões maduros climatéricos e não climatéricos a predominância de  $\beta$ -caroteno, mesmo em polpa branca.

#### 3.4.1 Metabolismo de carotenoides

Os carotenoides são isoprenoides, principalmente compostos de 40 carbonos (tetraterpenoides), pertencentes ao grupo dos metabólitos secundários lipofílicos, derivados de uma unidade simples de cinco carbonos (isopreno) denominada isopentenil pirofosfato (IPP) (OHMIYA *et al.*, 2018; SATHASIVAM *et al.*, 2020). O metabolismo de síntese dos carotenoides é chamado de carotenogênese (Figura 2) e é governado por múltiplos genes (Tabela 1), de forma altamente conservada na maior parte das plantas (SATHASIVAM *et al.*, 2020).

Nos plastídeos, a biossíntese dos carotenoides inicia com a formação de geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), um composto de 20 carbonos, através da adição de três moléculas de IPP e uma de dimetilalil pirofosfato (DMAPP), ambos derivados da via metabólica do 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) ou também chamada via independente de mevalonato, pela enzima geranylgeranyl pirofosfato sintase (GGPPS) (LI *et al.*, 2006; LV *et al.*, 2015; SATHASIVAM *et al.*, 2020; SUN; LI, 2020; SUN; TADMOR; LI, 2020). O GGPP é também precursor para a formação de outros isoprenoides importantes para as plantas como giberelinas, tocoferóis, clorofilas e filoquinonas (LI *et al.*, 2006; SUN; TADMOR; LI, 2020).

**Figura 2.** Via metabólica dos carotenoides e xantofilas e possíveis desvios de substratos. MEP - 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato; PDS – fitoeno dessaturase; Z-ISSO - ζ-caroteno dessaturase; ZDS - ζ-caroteno isomerase; CYP97A e CYP97C - hidroxilases tipo citocromo P450; ZEP – zeaxantina epoxidase; VDE – violaxantina de-epoxidase.



Fonte: a autora, adaptado de Sathasivam et al. (2020) e Clotault et al. (2012)

A próxima etapa, a condensação de duas moléculas de GGPP pela enzima fitoeno sintase (PSY) para formação do primeiro composto de 40 carbonos, o pigmento incolor 15-*cis*-fitoeno, é determinante e limitante do fluxo de produção dos carotenoides (OHMIYA *et al.*, 2018; SATHASIVAM *et al.*, 2020; SUN; LI, 2020). O fitoeno pode então dar origem a todos os *trans*-licopenos através de diversas reações de dessaturação (inserções de duplas ligações) e de isomerização, pela ação combinada das enzimas fitoeno dessaturase (PDS),  $\zeta$ -caroteno dessaturase (Z-ISO),  $\zeta$ -caroteno isomerase (ZDS) e caroteno isomerase (CRTISO) (LI *et al.*, 2006; LV *et al.*, 2015; SATHASIVAM *et al.*, 2020; SUN; LI, 2020).

**Tabela 1.** Genes codificadores e enzimas correspondentes relacionadas ao metabolismo de carotenoides em melão, suas formas curtas de nomeação (*short form*) e ID da EST no genoma MELONOMICS (<http://www.melonomics.net/>).

Gene/Enzima	Gene	ID MELONOMICS
Geranilgeranil pirofosfato sintase	<i>CmGGPPS1</i>	MELO3C020952
	<i>CmGGPPS2</i>	MELO3C007109
	<i>CmGGPPS3</i>	MELO3C007490
	<i>CmGGPPS4</i>	MELO3C013320
Fitoeno sintase	<i>CmPSY1</i>	MELO3C025102
	<i>CmPSY2</i>	MELO3C014677
	<i>CmPSY3</i>	MELO3C016185
Fitoeno dessaturase	<i>CmPDS1</i>	MELO3C017772
$\zeta$ -caroteno dessaturase	<i>CmZDS1</i>	MELO3C024674
	<i>CmZDS2</i>	MELO3C024675
Caroteno isomerase	<i>CmCRTISO1</i>	MELO3C009571
	<i>CmCRTISO2</i>	MELO3C016495
Licopeno $\beta$ -ciclase	<i>CmLCY-B1</i>	MELO3C020744
	<i>CmLCY-B2</i>	MELO3C017963
Licopeno $\epsilon$ -ciclase	<i>CmLCY-E1</i>	MELO3C004633
$\epsilon$ -anel caroteno hidroxilase	<i>Cm<math>\epsilon</math>OHase1</i>	MELO3C024495
Zeinoxantina sintase	<i>CmZXS1</i>	MELO3C014945
	<i>CmZXS2</i>	MELO3C016233
$\beta$ -anel caroteno hidroxilase	<i>CmBCH1</i>	MELO3C006938
	<i>CmBCH2</i>	MELO3C005704
Zeaxantina epoxidase	<i>CmZEP1</i>	MELO3C020872
Violaxantina de-epoxidase	<i>CmVDE1</i>	MELO3C020965
	<i>CmVDE2</i>	MELO3C008677

Fonte: Adaptado de Garcia-Mas *et al.* (2012).

Posteriormente, ocorre a ramificação da via metabólica através da ciclização do licopeno pelas enzimas licopeno  $\epsilon$ -ciclase (LYCE) e licopeno  $\beta$ -ciclase, que realizam a formação de  $\alpha$ -caroteno (pela inserção de um anel  $\beta$  e um anel  $\epsilon$  ao licopeno) e  $\beta$ -caroteno (inserção de dois anéis  $\beta$  ao licopeno), respectivamente (LV *et al.*, 2015; SATHASIVAM *et al.*, 2020; SUN; LI, 2020). Estes carotenoides podem sofrer reações de hidroxilação e epoxidação para a formação de compostos oxigenados, denominados de xantofilas (SUN; LI, 2020; OHMIYA *et al.*, 2018).

Na formação de xantofilas,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno são hidroxilados a partir de dois tipos de hidroxilases: uma não-heme  $\beta$ -caroteno hidroxilase (BCH) que hidroxila os anéis  $\beta$  do  $\beta$ -caroteno para formar  $\beta$ -criptoxantina e, na sequência, zeaxantina; e duas heme caroteno hidroxilases tipo citocromo P450 (CYP97C e CYP97A) que participam da hidroxilação dos anéis  $\beta$  e  $\epsilon$  do  $\alpha$ -caroteno para a formação de zeinoxantina e  $\alpha$ -criptoxantina e posteriormente, de luteína (LV *et al.*, 2015; SATHASIVAM *et al.*, 2020; SUN; TADMOR; LI, 2020). Zeaxantina pode sofrer reações de epoxidação e de-epoxidação através das enzimas zeaxantina epoxidase (ZEP) e zeaxantina de-epoxidase (VDE) para formar anteroxantina e violoxantina. O ciclo das xantofilas é então fechado com a formação de 9-*cis*-neoxantina pela enzima neoxantina sintase (NXS) através da conversão de violoxantina (NEUMAN *et al.*, 2014; SATHASIVAM *et al.*, 2020).

A degradação dos carotenoides por enzimas dioxigenases de clivagem (CCDs), por sua vez, produz pequenas moléculas denominadas de apocarotenoides que podem ser utilizadas como precursoras na formação de compostos voláteis, sinalizadores celulares e fitormônios como ácido abscísico e estrigolactonas (LV *et al.*, 2015; SATHASIVAM *et al.*, 2020; SUN; LI, 2020; SUN; TADMOR; LI, 2020; YANO; EZURA, 2016).

Sun e Li (2020) descrevem que a regulação transcricional e pós-transcricional do acúmulo de carotenoides em plantas envolve fatores internos como ritmo circadiano, estágio de desenvolvimento, nível dos fitormônios, epigenética através da modificação de histonas, e homeostase enzimática; e fatores externos como a exposição à luz e estresses ambientais.

Além da expressão diferencial dos genes da via de biossíntese dos carotenoides, o acúmulo de  $\beta$ -caroteno é associado ao polimorfismo do gene *CmOr* (MELO3C005449) que codifica uma proteína DnaJE1 rica em cisteína, da família das chaperonas. Um SNP único (“Golden SNP”) em uma região altamente conservada desencadeia a troca de uma arginina<sup>108</sup> para uma histidina na proteína *CmOr*, estimulando a produção de altas quantidades de  $\beta$ -caroteno, sendo este processo determinante para a presença de polpa alaranjada. Quando o polimorfismo não ocorre, há a formação de frutos de polpa clara (branca/verde) (TZURI *et al.*,

2015). Mais recentemente, identificou-se também a participação de CmOR na biogênese dos cloroplastos para cromoplastos em frutos e no sequestro de  $\beta$ -caroteno para os plastídeos, modulando a força do dreno (CHAYUT *et al.*, 2021).

Compreender o processo de formação e degradação de carotenoides é essencial para o desenvolvimento e seleção de genótipos de melão com melhor qualidade nutricional e possivelmente para o desenvolvimento de frutos biofortificados através de melhoramento clássico ou biotecnologia.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL VEGETAL

Os genótipos de melão (*Cucumis melo*) selecionados para o trabalho foram a cultivar Eldorado (melão amarelo, grupo *Inodorus*) como fruto não-climatérico e a cultivar Gaúcho (melão caipira, grupo *Cantalupensis*) como fruto climatérico. Para as análises de expressão gênica, trinta plantas de cada cultivar foram semeadas em novembro de 2018 e cultivadas em casa de vegetação na Universidade Estadual de Ponta Grossa – Ponta Grossa (PR), através de condução vertical e tutoramento (Figura 3). Foram desbrotados os ramos secundários até o sexto/sétimo nó, permitiu-se então o crescimento de pelo menos dois ramos laterais, e novamente realizou-se a desbrota até os 12<sup>o</sup>-15<sup>o</sup> nós.

**Figura 3.** Plantas de melão cultivadas verticalmente através de tutoramento com fitilho. Ponta Grossa - PR, novembro de 2018.



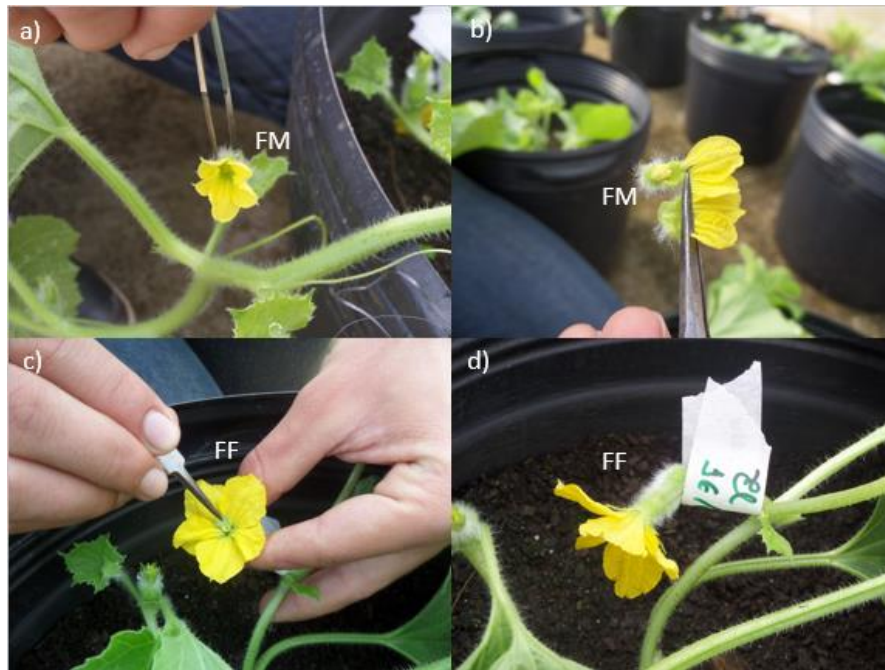
Fonte: a autora.

As flores foram polinizadas manualmente (Figura 4), de forma cruzada, durante a manhã para garantir a viabilidade do pólen, permitindo-se dois frutos por planta. Os frutos foram colhidos em três diferentes estádios de maturação de acordo com os dias após a polinização (Figura 5), sendo 25 D.A.P. correspondente a frutos jovens em expansão, 35 D.A.P.



frutos plenamente expandidos e em mudança de coloração e 45 D.A.P. frutos em maturação plena. Para as análises de pós-colheita, foram colhidos também os frutos de 15 dias após a polinização.

**Figura 4.** Etapas da polinização manual de meloeiro, realizada em Ponta Grossa – PR (2018). a) Destacamento da flor masculina da planta; b) retirada de sépalos para exposição do pólen; c) contato do pólen com a flor feminina; e d) marcação de data da flor feminina polinizada. FM – flor masculina; FF – flor feminina.



Fonte: a autora.

**Figura 5.** Frutos de melão ‘Eldorado’ (a esquerda) e ‘Gaúcho’ (a direita) em diferentes estádios de maturação de acordo com os dias após a polinização (D.A.P.).



Fonte: a autora.

Para as análises de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), também em 2018, foram colhidos frutos das mesmas cultivares e estágios de desenvolvimento, cultivados em casa de vegetação no *Agriculture and Agri-Food Canada* (AAFC), em Kentville, Nova Scotia (Canadá), pela Doutora Letícia Reis, complementando os resultados deste trabalho.

O mesocarpo dos frutos foi imediatamente cortado em pequenos pedaços, congelado em nitrogênio líquido e acondicionado à -80°C para as análises moleculares.

#### 4.2 QUALIDADE PÓS-COLHEITA

Para realizar a caracterização dos genótipos em estudo, procederam-se análises de qualidade pós-colheita, como pH do suco (pHmetro Hanna), sólidos solúveis (°Brix), por meio de refratômetro, e cor da casca e da polpa por meio de colorímetro digital Konica Minolta. A determinação da coloração se deu através do espaço de cor CIELAB definido pela *Commision Internationale de l'Eclairage*, através dos parâmetros L\* (brilho), a\* (coordenada verde/vermelho: -a indica tons de verde e +a tons de vermelho), b\* (coordenada azul/amarelo: -b referente a tons de azul e +b tons de amarelo) e ângulo Hue, apontado como o verdadeiro valor da coloração do fruto. O ângulo Hue foi calculado através da equação  $h^\circ = \tan^{-1} \left( \frac{b^*}{a^*} \right)$  quando  $a^* > 0$  e  $b^* > 0$  e pela equação  $h^\circ = 180 + \tan^{-1} \left( \frac{b^*}{a^*} \right)$  quando  $a^* < 0$  ou  $b^* > 0$ .

#### 4.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC) PARA QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES

Para a determinação dos teores de açúcares foram utilizadas quatro replicatas biológicas para cada cultivar, com 25, 35 e 45 dias após a maturação. De cada amostra retirou-se 20 g de tecido congelado, que foi então descongelado, macerado em cadinho usando nitrogênio líquido e centrifugado em tubos de 50 mL por 20 minutos. O sobrenadante do suco foi filtrado através de uma membrana de polietileno (poros de 0,45 µm - *Milli-pore Corp.*) e coletado diretamente para as análises.

A composição de açúcares foi verificada através do equipamento Agilent uHPLC 1290 Infinity II System equipada com um detector de índice de refração 1260 Infinity II G7162A, mantido a 40°C. Com o emprego de um 1290 Infinity II Multisampler G7116B, 20 µL do suco coletado anteriormente foi injetado em uma coluna Aminex HPX-87P (Bio-Rad) com proteção mantida a 85°C e uma taxa de fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup> de água 100% Nanopura, a qual foi filtrada a vácuo em uma membrana Durapore® (0,22 µ – Merck Millipore) e sonificada por aproximadamente 10 minutos.

Os açúcares sacarose, glicose e frutose foram identificados através do tempo de retenção de 10,11; 11,12 e 18,8 minutos, respectivamente e quantificados através de padrões

externos. A quantificação desses compostos foi realizada por curvas de calibração construídas com três conjuntos independentes de diluições de compostos padrão.

#### 4.4 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

O RNA Total foi extraído do mesocarpo de três frutos para cada estágio de desenvolvimento e cultivar (triplicata biológica), utilizando o método do perclorato de sódio, descrito para melão por Campos *et al.* (2017) (Figura 6).

**Figura 6.** Etapas da extração de RNA total de frutos de melão. À esquerda, 4 gramas de melão macerados em nitrogênio líquido, em vidraria RNase Free. À direita, pellet de RNA total recém extraído.



Fonte: a autora.

A integridade do RNA total foi analisada por eletroforese em gel de agarose à 1%, com tampão TAE (Tris-Acetato EDTA), sendo consideradas amostras de qualidade as que apresentaram nitidez nas bandas 18S e 28S, sem sinais de degradação. As amostras foram tratadas com o kit TURBO™ DNase (Invitrogen) para retirar quaisquer vestígios de DNA genômico e a quantificação do RNA foi realizada através do espectrofotômetro Nanovue™, bem como a determinação das razões de absorvância A260/A280 e A260/A230 que caracterizam a pureza da extração. Foram consideradas amostras puras as que obtiveram ambas razões de absorvância entre 1,7 e 2,0. As amostras puras foram submetidas ao kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) para conversão em cDNA através de 2 µg de RNA Total.

#### 4.5 DESENHO DE INICIADORES (PRIMERS)

Com base em resultados anteriores de RNA-Seq (SCHEMBERGER *et al.*, 2020) e de importância para trabalhos semelhantes, foram selecionados os genes de interesse para as vias

metabólicas dos carotenoides e açúcares e *primers* iniciadores específicos foram sintetizados. Dois genes de referência, *CmRPL* (*Ribosomal protein*) e *CmRPS15* (*Cytosolic ribosomal protein S15*), foram escolhidos com base nos resultados positivos de expressão constante durante o desenvolvimento de melão (KONG *et al.*, 2016).

Os pares de iniciadores (Tabela 2) foram desenhados através dos softwares programados para RT-qPCR, PrimerBlast e Beacon Designer. Todos os iniciadores foram testados em gradiente de temperatura em PCR convencional para ajuste de temperatura ótima de alinhamento.

**Tabela 2.** Genes de interesse escolhidos para a análise de RT-qPCR, suas formas curtas de nomeação (*short form*), identificação no genoma Melonomics, pares de *primer* iniciadores específicos (*Forward* – sentido e *Reverse* – anti-sentido), tamanho do amplificado (Amp) em pares de base (pb) e temperatura de anelamento (°C).

Gene	Short Form	ID Melonomics	Iniciadores ( <i>primers</i> )	Amp. (pb)	Tm (°C)
<b>Genes de referência</b>					
Proteína ribossômica citosólica 40s S15	<i>CmRPS15</i>	MELO3C006471	F 5' GAAGCTGCGTAAAGCGAAAC 3' R 5' GGTCTTTCCATTGTAAACTCCAA 3'	132	63
Proteína ribossômica 60s L	<i>CmRPL</i>	MELO3C023039	F 5' CGACAATACTGGAGCCAAGAA 3' R 5' CATCACCATATCTCCCACACAA 3'	100	63
<b>Metabolismo de açúcares</b>					
Trealose-6-fosfato sintase 9	<i>CmATPS9</i>	MELO3C012010	F 5' AAGACACCGAGCCCTGAAGT 3' R 5' CAAGAGACGAACCACTGACC 3'	119	64,5
Trealose-6-fosfato sintase 5	<i>CmTPS5</i>	MELO3C013838	F 5' ATGAGCCAGGGGAAGGGATT 3' R 5' CAGCAAGCCAAAGAAAATGACC 3'	202	64
Trealose-6-fosfato sintase 7	<i>CmTPS7</i>	MELO3C018715	F 5' ACATTGCCGAGCCTGTTATG 3' R 5' TCTCCTTTGCCTGGGATGAT 3'	132	62
Sacarose Sintase 1	<i>CmSUS1</i>	MELO3C015552	F 5' AACCGTGTTCATAGCCTCCG 3' R 5' TCAGGACTTCCCCAAATGCC 3'	195	64,5
Sacarose Sintase 2	<i>CmSUS2</i>	MELO3C025101	F 5' TCCAGATGCGAAGGGGACTA 3' R 5' ATCCGGCTTTGCTTCCATGA 3'	204	62
Alfa galactosidase neutra 2	<i>CmNAG2</i>	MELO3C023110	F 5' TTCCTGTGGTATCGATGGCG 3' R 5' ATGAATGGTGTGGGAGGCAG 3'	258	64,5
Inibidor de Invertase 1	<i>CmINH1</i>	MELO3C022457	F 5' GAGGAGAAAGAAGGGGTGGTT 3' R 5' CCATGGTGTGGATTGTATTTTGA 3'	205	62
<b>Metabolismo de carotenoides</b>					
Fitoeno sintase 3	<i>CmPSY3</i>	MELO3C006938	F 5' TGGTGAGGTCTGTGCTGAAT 3' R 5' AGTCGTTTTTCCCATCGCTC 3'	180	64,7
Caroteno isomerase 1	<i>CmCRTISO1</i>	MELO3C009571	F 5' CTCCGCTCACTTTCCATTTCAG 3' R 5' GCTTTTGGCATCTGGGTTTGT 3'	175	64,5
Caroteno isomerase 2	<i>CmCRTISO2</i>	MELO3C016495	F 5' TATCGCCCTCTTCCCCTTC 3' R 5' CAACATCAGCCTCTGCCTTC 3'	154	64,7
Beta-anel caroteno hidroxilase 1	<i>CmβOHase1</i>	MELO3C006938	F 5' CGCCGATTGTAGTTTCTCAGA 3' R 5' ATCTCTCCGCCCTCCATTG 3'	175	64

Fonte: a autora.

#### 4.6 RT-qPCR E ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

A análise de expressão gênica por RT-qPCR foi realizada utilizando o termociclador AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies), o kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR

qPCR Master Mix (Agilent), 60 ng de cDNA e 0,8 uL de cada *primer* (*forward* e *reverse*) (10 $\mu$ M). As condições de termociclagem definidas foram 10 minutos a 95°C (*Hot Start*) para ativação da enzima, 40 ciclos de amplificação com 15 segundos a 95°C, 20 segundos na temperatura de anelamento de cada par de iniciador (Tabela 2) e 30 segundos a 72°C. Após a etapa de amplificação, a curva de *melting* seguiu a configuração de 95°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos, 95°C por 30 segundos e um aumento gradativo (*ramp*) de 0,5°C a cada 5 segundos.

O nível de expressão gênica foi dado por quantificação relativa através dos valores normalizados dos genes alvo comparados aos de genes de referência, neste caso *CmRPL* e *CmRPS15*. A partir disso, foi obtido o valor de *fold change* para cada gene nos diferentes estágios de desenvolvimento, utilizando os frutos com 25 D.A.P. da cultivar Gaúcho como amostra calibradora (controle), através do método de Livak que consiste na equação  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), onde  $\Delta Cq = Cq$  (gene alvo) –  $Cq$  (gene de referência) e  $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq$  (amostra de tratamento) –  $\Delta Cq$  (amostra controle).

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

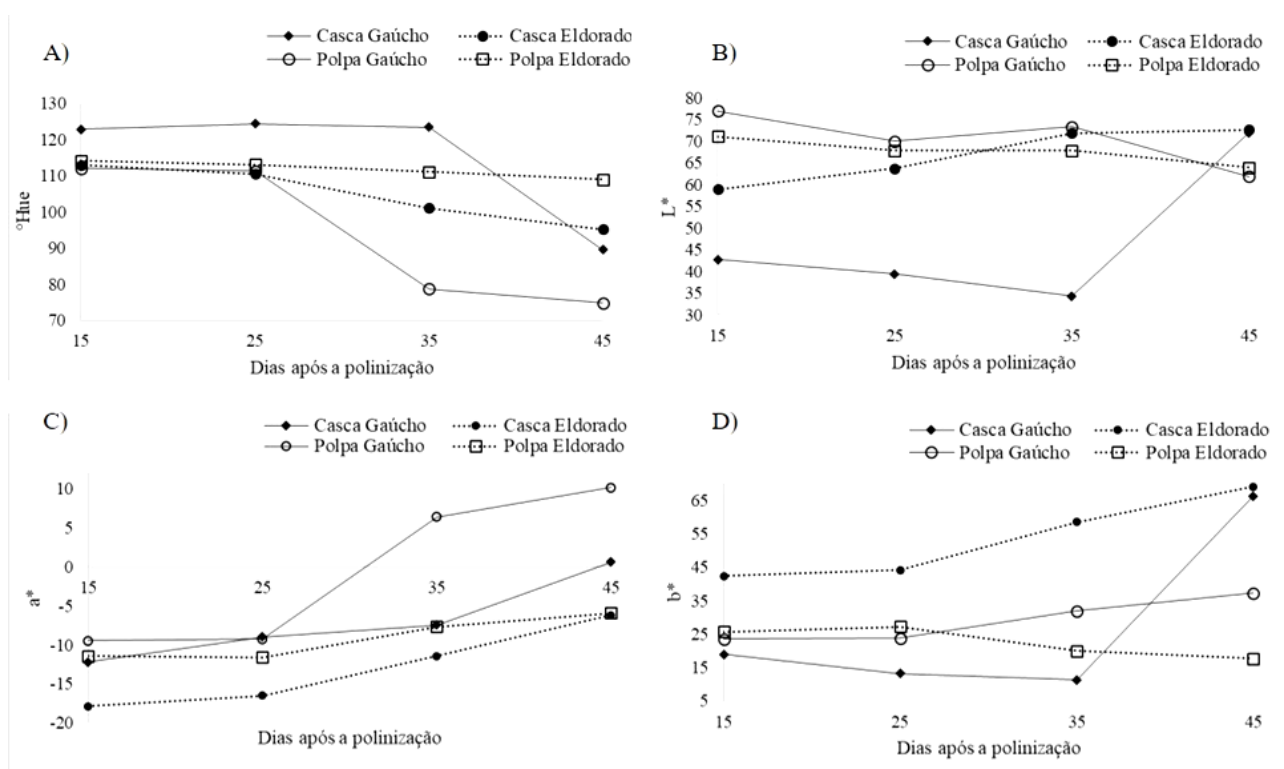
Os valores obtidos da equação de Livak para cada gene e as quantificações de açúcares obtidas por HPLC foram analisados pelo teste Shapiro-Wilk para verificar a normalidade e transformados em caso de não paramétricos. Os dados normais foram então submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey com 95% de significância, sendo o delineamento experimental inteiramente casualizado, e a análise estatística em fatorial 3x2 (três estágios de maturação x duas cultivares), através do software SISVAR.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 QUALIDADE PÓS-COLHEITA

Fatores como a coloração, acidez e teor de açúcares são importantes para a determinação do estágio de desenvolvimento e dos componentes químicos dos frutos. Neste trabalho, avaliou-se a cor da casca e da polpa dos frutos de meloeiro ‘Eldorado’ e ‘Gaúcho’ através do espaço CIELAB de cor ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ) e do ângulo Hue ( $H^\circ$ ) (Figura 7). Tais resultados podem ser comparados com o diagrama de cromaticidade do espaço CIELAB apresentado na Figura 8, para melhor entendimento. O brilho ( $L^*$ ), varia entre 0 (preto ou ausência de brilho) e 100 (branco) e representa cores claras e escuras, respectivamente. As coordenadas colorimétricas  $a^*$  e  $b^*$  representam as cores do verde ( $-a^*$ ) para o vermelho ( $+a^*$ ) e do azul ( $-b^*$ ) para o amarelo ( $+b^*$ ), respectivamente (KONICA MINOLTA, 2007).

**Figura 7.** Mudanças de coloração demonstradas por análises colorimétricas dos melões ‘Gaúcho’ (climatérico) e ‘Eldorado’ (não-climatérico). A) ângulo Hue; B) Brilho ( $L^*$ ), no qual 0 representa a cor preta e 100 representa o branco; C) coordenada  $a^*$ , na qual  $-a^*$  representa a cor verde e  $+a^*$  a cor vermelha; e D) coordenada  $b^*$ , sendo  $-b^*$  tons em azul e  $+b^*$  tons em amarelo.

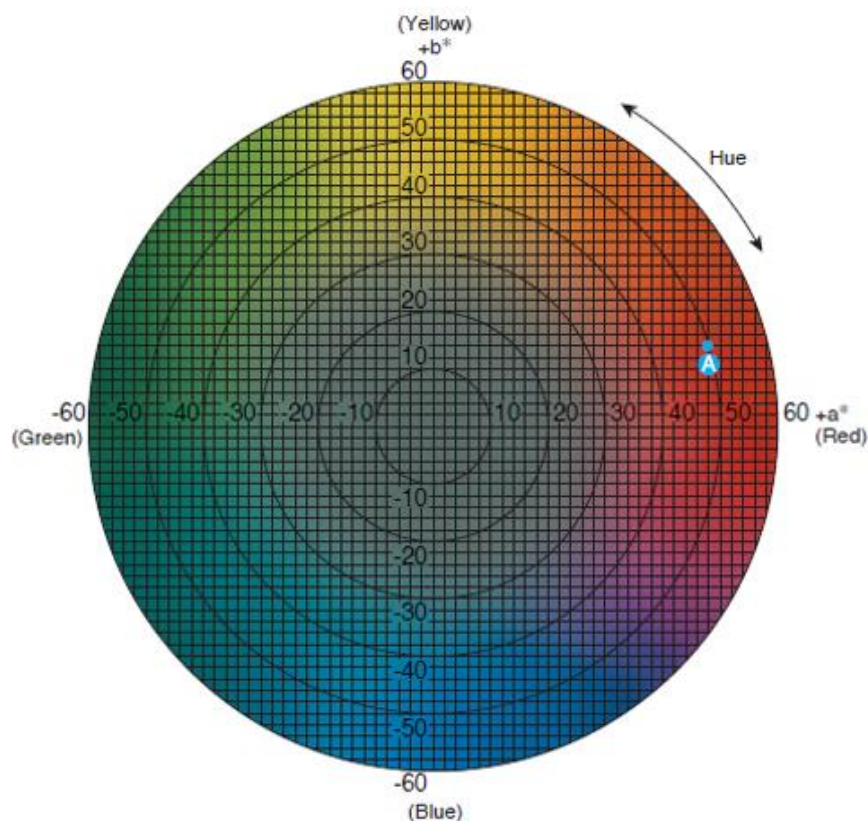


Fonte: a autora.

Quanto ao ângulo Hue (Figura 7a), também chamado de “cor verdadeira”, aos 15 D.A.P. o fruto de meloeiro ‘Gaúcho’ apresenta cor da casca com  $H^\circ$  mais alto que de

‘Eldorado’, devido ao fruto apresentar tonalidade de verde mais escuro, comprovado também pelo menor valor de  $L^*$  (Figura 7b). Dos 25 D.A.P. aos 35 D.A.P. se mantém estável e sofre decréscimo de 35 D.A.P. para 45 D.A.P., momento de mudança de coloração no fruto, fenômeno visível e indicativo de transição para maturação. A mudança de tons esverdeados para amarelado, representado pelo decréscimo do  $H^\circ$ , é menos acentuada ao longo da maturação em melão ‘Eldorado’. A polpa de melão ‘Gaúcho’ sofre mudança de coloração mais acentuada de 25 D.A.P. para 35 D.A.P. e alcança os valores mais baixos de  $H^\circ$  na maturação, aproximando-se de colorações alaranjadas. Por sua vez, a polpa de ‘Eldorado’ apresenta poucas mudanças nos valores de  $H^\circ$  durante a maturação, com leve decréscimo, mantendo-se creme esverdeada.

**Figura 8.** Diagrama de cromaticidade do espaço de cor CIELAB. As coordenadas colorimétricas  $a^*$  e  $b^*$  representam as cores do verde ( $-a^*$ ) para o vermelho ( $+a^*$ ) e do azul ( $-b^*$ ) para o amarelo ( $+b^*$ ), respectivamente.



Fonte: Konica Minolta (2007)

A coordenada colorimétrica  $a^*$  sofreu aumento com a maturação para a cor da casca de ‘Gaúcho’ e de ‘Eldorado’, este último de forma menos intensa, demonstrando a transição de cores do verde para o vermelho. O aumento de  $a^*$  também foi verificado para a polpa de ‘Eldorado’ e ‘Gaúcho’, onde o fruto climatérico confirma o resultado mostrado pelo  $H^\circ$ , com mudança substancial da coloração da polpa de 25 D.A.P. para 35 D.A.P. Quanto à coordenada

b\*, esta demonstra que a mudança de coloração da casca de ‘Eldorado’ é gradual ao longo da maturação, enquanto que para ‘Gaúcho’, há uma rápida transição de cores em direção ao tom de amarelo aos 35 dias após a polinização. Quanto à coloração de polpa do melão ‘Gaúcho’, esta mudança de coloração ocorre antes, de 25 D.A.P. para 35 dias após a polinização.

Tais diferenças podem estar diretamente ligadas ao padrão respiratório de cada um dos frutos, coordenando a mudança de coloração de casca com o momento do pico de produção de etileno no melão climatérico (‘Gaúcho’), como um atributo etileno-dependente. Com a ausência deste pico no melão não-climatérico, as mudanças de coloração são progressivas e menos evidentes. A coloração da polpa, por sua vez, pode estar aliada a outros sinais celulares além do etileno, já que esta ocorre antes do momento de pico do fitormônio, como demonstrado por Ayub *et al.* (1996), que consideraram este um atributo independente de etileno. É importante salientar também que a polpa de melão ‘Gaúcho’, no estágio intermediário (35 D.A.P.), e de forma menos evidente na maturação, mantém sua região mais próxima da casca em tons esverdeados, apenas com o centro do mesocarpo em tons mais alaranjados (Figura 5).

**Tabela 3.** Resultados das variáveis pH e °Brix analisadas a partir do suco de melão cv. Gaúcho e cv. Eldorado.

	pH		°Brix	
	‘Gaúcho’	‘Eldorado’	‘Gaúcho’	‘Eldorado’
15 D.A.P.	5,68±0,20	5,69±0,13	5,43±0,51	5,30±0,52
25 D.A.P.	5,36±0,13	5,24±0,05	4,57±0,35	6,80±1,11
35 D.A.P.	5,06±0,04	5,38±0,13	5,14±0,12	8,93±1,40
45 D.A.P.	5,94±0,32	5,50±0,10	8,13±0,23	9,37±1,80

Fonte: a autora

Quanto ao pH do suco dos frutos, não houve alteração substancial dos valores para nenhuma das variedades ao longo da maturação (Tabela 3). O aumento do °Brix ao longo da maturação está diretamente ligado ao acúmulo de sólidos solúveis (LEIDA *et al.*, 2015), e este padrão ocorreu para ambas as variedades. Em melão ‘Gaúcho’, no entanto, verifica-se que o aumento do teor de SS ocorre de forma brusca de 35 D.A.P. para 45 D.A.P., enquanto que em ‘Eldorado’ este incremento é progressivo durante o desenvolvimento. Observa-se que o teor de SS em frutos maduros de melão ‘Eldorado’ alcançou resultados numericamente superiores ao de Gaúcho, mas com alta variabilidade (Tabela 3).

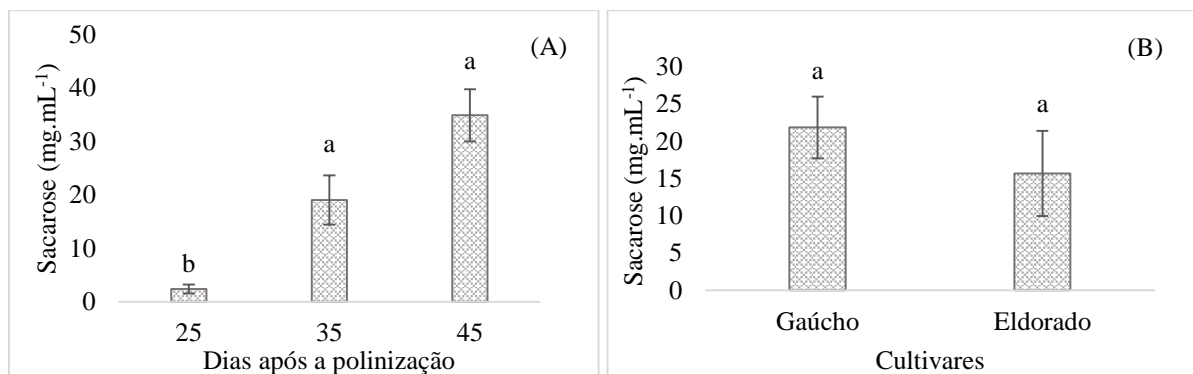
## 5.2 METABOLISMO DE AÇÚCARES

### 5.2.1 Composição de açúcares



As folhas fonte da planta do melão exportam para seus drenos principalmente oligossacarídeos da família da rafinose, além de sacarose (DAI *et al.*, 2011). No entanto, nos drenos, estes são rapidamente catalizados e os principais açúcares solúveis acumulados com a maturação são glicose, frutose e sacarose (BURGER; SCHAFFER, 2007). Neste estudo, analisou-se os teores de cada um destes açúcares para melão ‘Gaúcho’ e ‘Eldorado’ durante três estádios de maturação por HPLC.

**Figura 9.** Teores de sacarose ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) no mesocarpo de melão de acordo com (A) dias de desenvolvimento do fruto e (B) cultivar (‘Gaúcho’ e ‘Eldorado’). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.



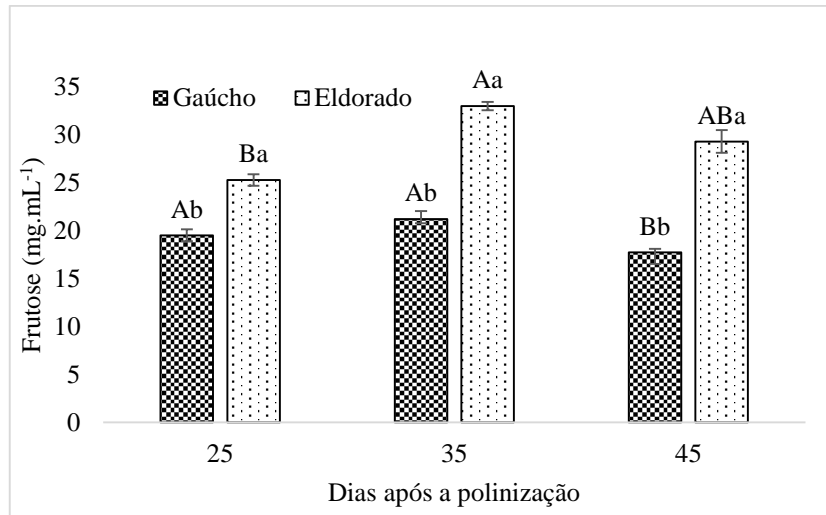
Fonte: a autora.

Para o teor de sacarose, observou-se que a interação dos fatores cultivar x dias de desenvolvimento não foi significativa, no entanto, ao estudar os fatores de forma isolada, observa-se que o nível deste açúcar em frutos jovens (25 D.A.P.) é muito baixo e aumenta drasticamente ao longo da maturação, diferindo significativamente de 25 D.A.P. para 45 D.A.P. (Figura 9a), demonstrando que este acúmulo está ligado ao processo de amadurecimento em ambas as variedades. O teor ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de sacarose encontrado nos frutos de cada cultivar (Figura 9b) obteve diferença significativa na análise de variância, no entanto, não diferiu para o teste de Tukey, indicando que os frutos das cultivares ‘Gaúcho’ e ‘Eldorado’ acumulam níveis similares de sacarose, apesar do perfil de acúmulo de SS se demonstrar distinto.

Quanto à frutose (Figura 10), observa-se que para melão ‘Gaúcho’ há o decréscimo do teor deste açúcar de 35 D.A.P. para 45 D.A.P., sendo inferior ao nível apresentado por ‘Eldorado’ em todos os estágios de desenvolvimento. Para ‘Eldorado’, há o aumento do conteúdo de frutose de 25 D.A.P. para 35 D.A.P. e se mantém estável no fruto maduro.

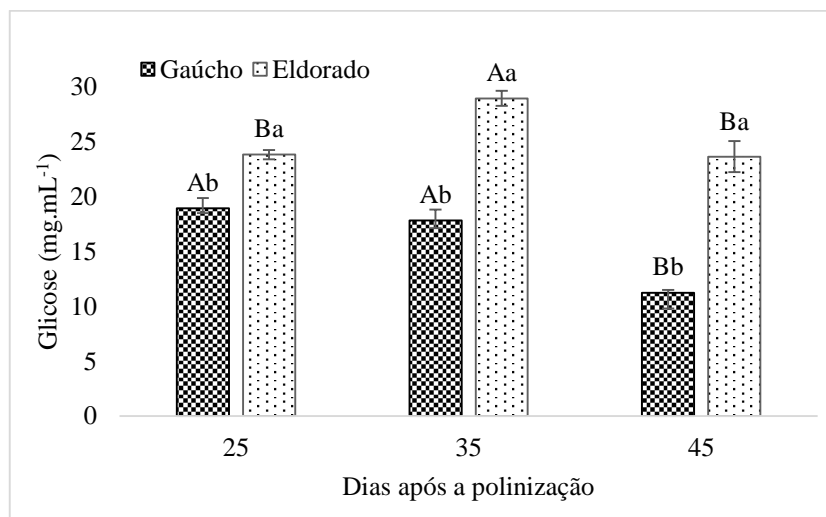
Para glicose (Figura 11), assim como para frutose, houve decréscimo do teor para melão ‘Gaúcho’, mantendo-se abaixo da quantidade encontrada em ‘Eldorado’ em todos os estágios de desenvolvimento. O melão ‘Eldorado’ com 35 D.A.P. apresentou o maior teor de glicose e diferiu significativamente em relação aos demais estágios de desenvolvimento.

**Figura 10.** Teores de frutose ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) nos frutos de melão ‘Gaúcho’ e ‘Eldorado’ em três estágios de desenvolvimento do fruto. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão, letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre dias de desenvolvimento do fruto para a mesma cultivar e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as cultivares para um mesmo estágio de amadurecimento, segundo Teste de Tukey a 5% de significância.



Fonte: a autora.

**Figura 11.** Teores de glicose ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) nos frutos de melão ‘Gaúcho’ e ‘Eldorado’ durante três estágios de desenvolvimento do fruto. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão, onde letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre dias de desenvolvimento do fruto para a mesma cultivar e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as cultivares para um mesmo estágio de amadurecimento, segundo Teste de Tukey a 5% de significância.



Fonte: a autora.

Gur *et al.* (2016) reportam que em melão o aumento de açúcares se deve principalmente à sacarose, concordando com este trabalho, em que ambos os frutos alcançaram valores superiores do teor deste açúcar no estágio maduro em relação aos demais açúcares, frutose e glicose. Nos estágios iniciais, Li *et al.* (2006) citam que o conteúdo total de açúcares

é baixo e o teor das hexoses frutose e glicose é similar e superior ao de sacarose, corroborando os resultados aqui apresentados.

O tipo de açúcar acumulado em melão está diretamente ligado ao estágio de desenvolvimento das células, segundo Kano (2009). A presença das hexoses nos frutos jovens e em desenvolvimento indicam a clivagem dos oligossacarídeos e da sacarose transportada dos órgãos fonte para o dreno, principalmente com destino à formação de compostos de parede celular, essenciais ao crescimento e expansão do fruto, à respiração e à sinalização celular, onde funcionam como substratos prontos para serem consumidos. Em frutos maduros, os processos biológicos relacionados ao crescimento não necessitam mais de tanto substrato e portanto, há uma regulação negativa dos genes e proteínas de clivagem de sacarose e consequentemente, o acúmulo deste açúcar (KANO, 2009; SCHEMBERGER *et al.*, 2020).

Quanto ao conteúdo de açúcares em cada uma das cultivares, a velocidade de acúmulo de sacarose e o teor superior de frutose e glicose em ‘Eldorado’, pode ser explicado, em partes, pelo diferencial de expressão gênica de candidatos do metabolismo dos oligossacarídeos da rafinose que serão expostos a seguir.

### 5.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA VIA RT-qPCR

#### 5.3.1 Metabolismo de açúcares

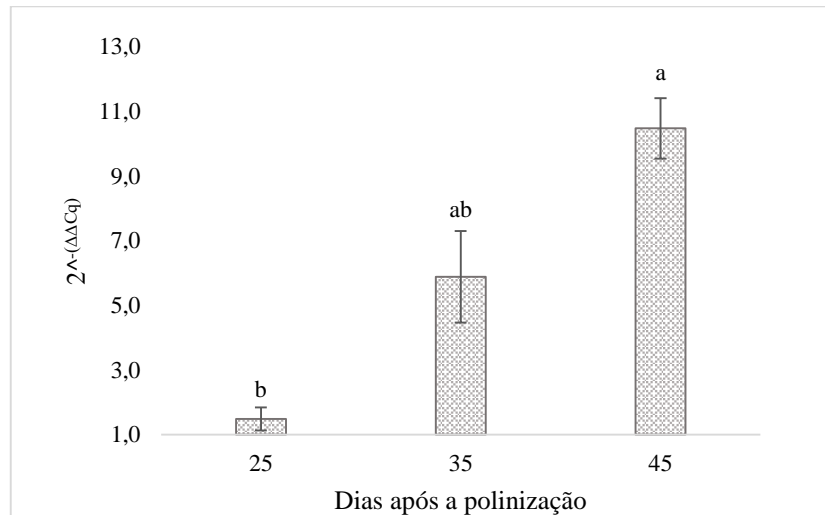
Um dos fatores determinantes para o acúmulo de açúcares em melão é a regulação da expressão de genes da via dos oligossacarídeos da rafinose. Assim, neste trabalho, estudou-se a expressão dos genes *CmSUS1*, *CmSUS2*, *CmINH1*, *CmNAG2* e representantes do metabolismo da trealose *CmTPS9*, *CmTPS7* e *CmTPS5* em frutos de meloeiro climatérico cv. Gaúcho e não-climatérico cv. Eldorado.

A sacarose sintase, uma glicosiltransferase, é responsável por catalisar a reação reversível de conversão de sacarose em UDPglc e frutose (LI *et al.*, 2006). Dai *et al.* (2011) identificaram três isoformas de *SUS* em *Cucumis melo*, sendo elas *CmSUS1*, *CmSUS2* e *CmSUS3*. Avaliou-se neste estudo a expressão de *CmSUS1* e *CmSUS2*, já reportados anteriormente para outras cultivares como candidatos importantes da regulação do acúmulo de açúcares.

A expressão de *CmSUS1* não apresentou interação significativa entre os fatores cultivar x dias de desenvolvimento e na análise individual de cada fator, foi significativamente

diferente apenas entre os dias de desenvolvimento, aumentando aproximadamente 7 vezes a expressão no estágio 25 D.A.P. para o fruto maduro (Figura 12).

**Figura 12.** Expressão relativa do gene *CmSUS1* ao longo da maturação de melões cvs. Gaúcho e Eldorado, determinada através de  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$ . Resultados expressos através da média obtida para as cultivares  $\pm$  erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.



Fonte: a autora.

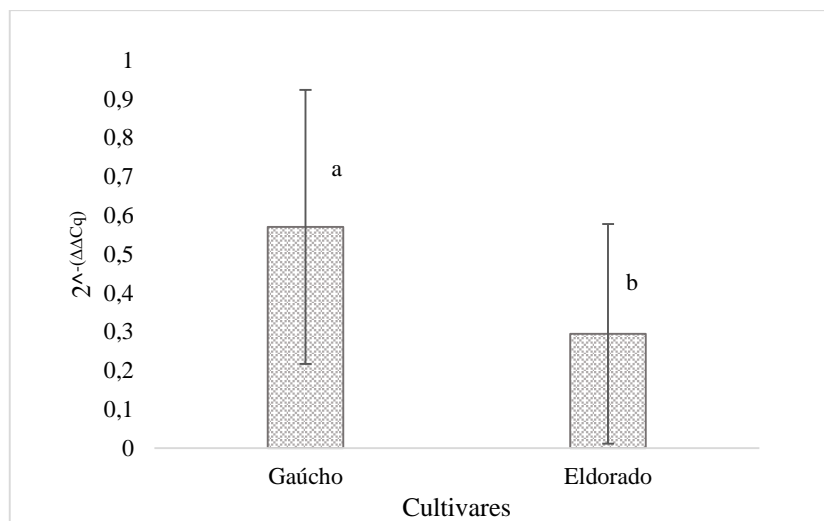
Por sua vez, para a isoforma *CmSUS2*, a interação dos fatores também não foi significativa, assim como a análise individual do fator dias de desenvolvimento, diferindo a expressão apenas entre as cultivares, onde o melão ‘Gaúcho’ apresentou valores superiores (Figura 13).

É de conhecimento que várias espécies possuem duas ou mais isoformas de *SUS* aumentando as possibilidades de interação com os substratos em diferentes momentos do desenvolvimento, ora clivando e ora sintetizando sacarose (KLOTZ *et al.*, 2003). Por exemplo, em pera japonesa, duas isoformas estão presentes, SSI e SSII. Tanase e Yamaki (2000) verificaram que SSI possui maior atividade em frutos verdes com função de degradação da sacarose, enquanto SSII é mais atuante em frutos maduros, atuando no sentido de síntese da reação. A maior afinidade por UDP-glicose do que por UDP em SSII indica atividade predominante de síntese de sacarose (favorecendo o acúmulo do açúcar no fruto maduro) ao invés de clivagem, enquanto SSI possui igual afinidade para ambos os substratos.

Em melão ‘Dulce’ (climatérico), Dai *et al.* (2011) relataram que a expressão de *CmSUS1* ocorre principalmente em frutos jovens, enquanto que a expressão de *CmSUS3* se dá de forma mais intensa no estágio maduro e *CmSUS2* se mantém com baixa expressão durante todo o desenvolvimento. Em frutos não-climatéricos (‘Amarelo’ e ‘Hami’), a expressão de *CmSUS1* se deu em altos níveis no estágio maduro, enquanto que *CmSUS2* apresentou perfil de

expressão contrário, com maior intensidade em frutos jovens (SCHEMBERGER *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2016). Com base nestes estudos prévios, supõe-se que *CmSUS1* estivesse diretamente ligado à síntese da sacarose para estocagem nas células, interferindo no gosto adocicado do fruto de ambas as variedades, ao passo que *CmSUS2* atuasse principalmente provendo a clivagem da sacarose para aumentar a disponibilidade de substratos utilizados na produção de energia e de parede celular (STROKA; SCHEMBERGER; AYUB, 2021).

**Figura 13.** Expressão relativa do gene *CmSUS2* para as cultivares de melão ‘Gaúcho’ e ‘Eldorado’ determinada através de  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$ . Resultados expressos através da média obtida dos dias de desenvolvimento  $\pm$  erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.



Fonte: a autora.

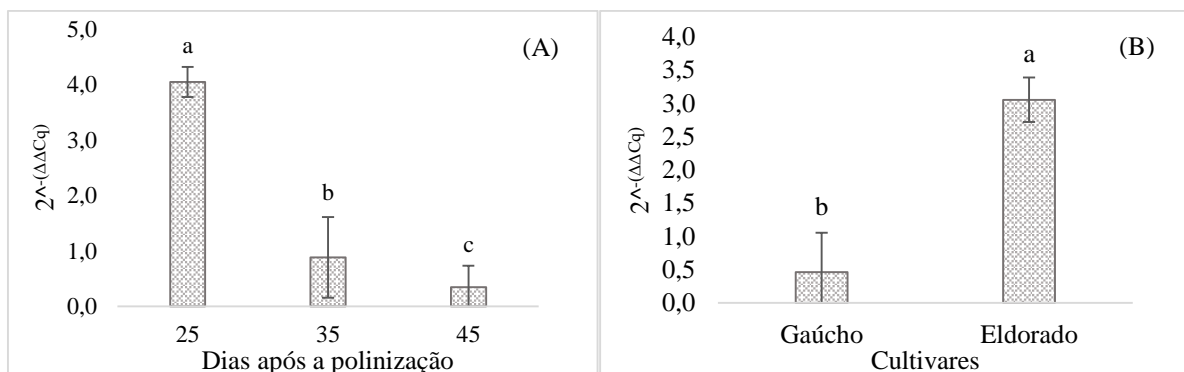
Nos resultados aqui apresentados, a hipótese de que *CmSUS1* esteja atuando como codificador de uma sacarose sintase que interage com os substratos no sentido de síntese para acúmulo de sacarose, é suportado pelo aumento da expressão ao longo da maturação para ambas as cultivares, bem como corrobora o aumento dos teores de sacarose durante o desenvolvimento, identificado por HPLC. No entanto, para *CmSUS2* não houve diferença de expressão ao longo da maturação, resultado discrepante ao apresentado por Zhang *et al.* (2016) e Schemberger *et al.* (2020), o que pode demonstrar que para estes frutos, outra isoforma pode estar contribuindo para a formação de substratos energéticos em fruto jovem. A expressão de *CmSUS2* em nível superior em frutos climatéricos (cv. Gaúcho) está de acordo com o menor teor de hexoses (frutose e glicose) nestes frutos em relação ao não-climatérico (cv. Eldorado), havendo a maior conversão para formação de sacarose.

Tais evidências podem ser esclarecidas em futuros trabalhos de avaliação da interação entre a estrutura das isoformas e os diferentes substratos, a fim de determinar o sentido da reação desempenhado por cada uma (síntese ou clivagem).

O aumento da expressão de *SUS* e o declínio da atividade de enzimas invertases são essenciais para o acúmulo da sacarose em melão. Uma das formas de regulação da ação das invertases se dá a partir de pequenas enzimas inibidoras da invertase. Dai *et al.* (2011) e Garcia-Mas *et al.* (2012) classificam os inibidores da invertase de acordo com a localização subcelular onde atuam, podendo ser de parede celular (CIN) ou de vacúolo (INH).

Quanto aos inibidores de invertase vacuolar, pelo menos três isoformas são descritas por Garcia-Mas *et al.* (2012) (*CmINH1*, *CmINH2*, *CmINH3*), além das formas putativas. Neste trabalho analisou-se a expressão de *CmINH1* e a interação entre os fatores cultivar e dias de desenvolvimento não foi significativa. Ao analisar-se os dados de forma isolada, observou-se que houve a expressão diferencial deste gene ao longo da maturação, diminuindo progressivamente a cada estágio (Figura 14a). Além disto, houve diferença significativa também quanto à cultivar, sendo *CmINH1* quase 7 vezes mais expresso em frutos de melão ‘Eldorado’ do que em ‘Gaúcho’ (Figura 14b).

**Figura 14.** Expressão relativa do gene *CmINH1* determinada através de  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$  para (A) dias de desenvolvimento dos frutos e (B) cultivares ‘Gaúcho e ‘Eldorado’. Resultados expressos através da média  $\pm$  erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.



Fonte: a autora.

Argyris *et al.* (2015) relataram que a expressão de *INH* é dependente do padrão de maturação em melão. Em frutos de melão ‘Piel de Sapo’ (não-climatérico), a expressão de *CmINH2* e *CmINH1* foi aproximadamente 30 vezes maior do que em frutos da cultivar ‘Védrantais’ (climatérico) (SALADIÉ *et al.*, 2015). Schemberger *et al.* (2020) identificaram a isoforma *CmINH-LIKE3* como altamente expressa em frutos jovens de melão ‘Amarelo’, enquanto que *CmINH2* apresentou maior expressão em frutos maduros para a mesma cultivar.

Para Dai *et al.* (2011), a inibição pós-traducional de INV por INH ocorre concomitantemente à expressão dos genes de INV, principalmente em sua forma ácida vacuolar. Como a expressão de *CmAIN2*, principal isoforma de invertase ácida vacuolar encontrada em melão, ocorre de forma decrescente ao longo do desenvolvimento do fruto,

independentemente da forma de maturação (DAI *et al.*, 2011; BURGER; SCHAFFER, 2007; SALADIÉ *et al.*, 2015; SCHEMBERGER *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2016), acredita-se que para ‘Gaúcho’ e ‘Eldorado’ aconteça da mesma forma. Com isto, a expressão de *CmINH1* está em concordância com a hipótese de Dai *et al.* (2011), com a expressão decrescendo ao longo da maturação. Além disto, a maior expressão de *CmINH1* em frutos de melão ‘Eldorado’ pode estar ligada a sua maior vida útil pós-colheita e maior estabilidade dos níveis de açúcares em pós-colheita em relação ao melão ‘Gaúcho’, sendo um alvo interessante para estudos de manipulação da perecibilidade dos frutos.

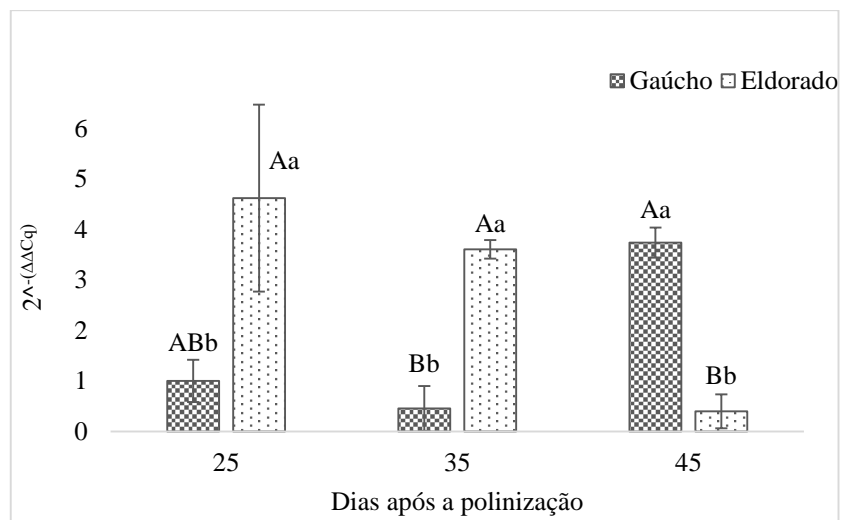
Qin *et al.* (2016) demonstram em seus resultados com tomate RIN (do inglês *ripening inhibitor*) mutante que o inibidor de invertase *SIVIF* é regulado por este regulador de maturação (RIN) e quando superexpresso aumenta em 10 vezes o teor de sacarose no fruto. Além disto, a superexpressão de *SIVIF* modifica outros aspectos da maturação como a promoção do rápido acúmulo de licopeno, alterando assim, a produção de carotenoides. A relação entre os inibidores de invertase, o acúmulo de sacarose e a maturação pode ser um aspecto chave no desenvolvimento de frutos climatéricos e não climatéricos e demanda novos estudos que esclareçam este processo.

Quando os OFR são descarregados para o fruto dreno, estes podem sofrer a ação de enzimas  $\alpha$ -galactosidases ( $\alpha$ -D-galactosidase galactohidrolase), que retiram seus terminais de galactose, e as quais compreendem uma família multigênica que codifica enzimas dependentes do pH (neutras e ácidas). Pelo menos quatro isoformas são reportadas por Garcia-Mas *et al.* (2012) para as  $\alpha$ -galactosidases neutras: *CmNAG1*, *CmNAG2*, *CmNAG3* e *CmNAG4*, além de uma isoforma putativa. Neste estudo, analisou-se a expressão de *CmNAG2* e conforme indicado na Figura 15, houve diferentes padrões de expressão deste gene ao longo da maturação para cada uma das cultivares. Para melão ‘Gaúcho’, *CmNAG2* aumenta de expressão de 35 D.A.P. para 45 D.A.P., onde alcança maior nível de expressão. Já para ‘Eldorado’, observa-se o padrão inverso, com decréscimo de expressão ao longo da maturação. Estes resultados são interessantes e demonstram que há uma diferença intraespecífica na expressão de *CmNAG2*.

Dai *et al.* (2011) citam que dois aspectos são importantes quanto às  $\alpha$ -galactosidases: a) a expressão das isoformas é variável entre frutos climatéricos e não-climatéricos; e b) a atividade das enzimas é dependente do pH celular. Trabalhos como o de Saladié *et al.* (2015), Schemberger *et al.* (2020) e Zhang *et al.* (2016) demonstram que para as  $\alpha$ -galactosidases ácidas, expressas principalmente em frutos jovens, a isoforma *CmAAG1* tem maior representatividade em frutos climatéricos, enquanto que *CmAAG2* é expressa de forma mais intensa em melão não-climatérico. Para frutos maduros, Dai *et al.* (2011) identificaram

*CmNAG2* como mais expressa em melão ‘Dulce’ (climatérico) e resultados similares foram encontrados por Schemberger *et al.* (2020) com a isoforma *CmNAG3* em melão ‘Amarelo’ e por Saladié *et al.* (2015) em melão ‘Piel de Sapo’ e ‘Védrantais’ para a isoforma *CmNAG-LIKE3*.

**Figura 15.** Expressão relativa do gene *CmNAG2* determinada através de  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$  para os frutos de melão ‘Gaúcho’ e ‘Eldorado’ em três estágios de desenvolvimento. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão, onde letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre dias de desenvolvimento do fruto para a mesma cultivar e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as cultivares para um mesmo estágio de amadurecimento, segundo Teste de Tukey a 5% de significância.



Fonte: a autora.

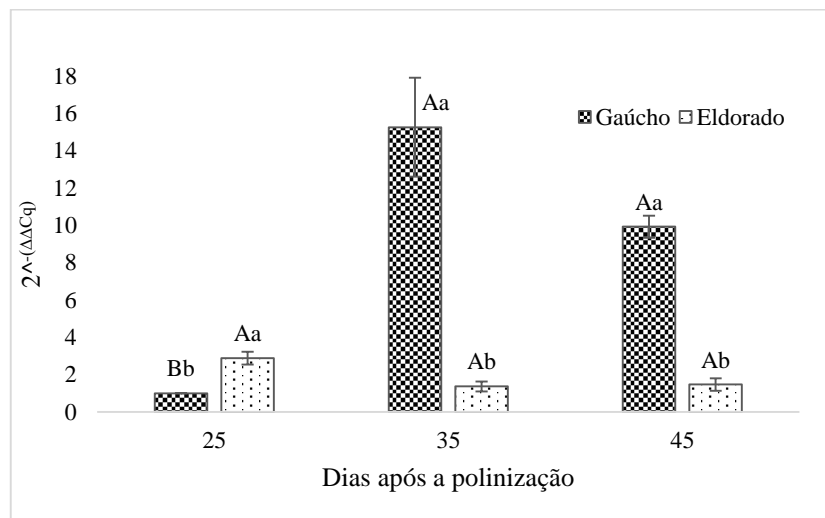
Com base nos resultados já registrados na literatura, sugere-se que as isoformas ácidas de  $\alpha$ -galactosidade estão relacionadas ao processo de crescimento do fruto, clivando os OFR principalmente para formação de substratos utilizados na síntese de parede celular, enquanto que as  $\alpha$ -galactosidades neutras funcionam para contribuir com o acúmulo de sacarose (STROKA; SCHEMBERGER; AYUB, 2021). No entanto, como é possível observar nos resultados deste trabalho e para Schemberger *et al.* (2020), *CmNAG2* obteve maior expressão em frutos jovens de melão ‘Amarelo’ (aqui representado pela cultivar Eldorado). Além disto, no trabalho de Schemberger *et al.* (2020) é possível verificar que a expressão de *CmUGE3* (UDP glicose-4-epimerase), que codifica uma enzima que tem como alvo a reação bioquímica subsequente a da  $\alpha$ -galactosidade, possui o mesmo padrão de expressão, indicando a importância destes genes para a etapa de crescimento do fruto. Para melão ‘Gaúcho’, os resultados deste trabalho estão em concordância com a maior expressão de *CmNAG2* em frutos maduros, já sugerido por outros autores citados acima. O motivo de *CmNAG2* ser expressa de forma contrária em frutos de melão ‘Amarelo’ em relação aos demais ainda não é claro e pode ser alvo de novos estudos.



No metabolismo da trealose, um dissacarídeo presente no fruto, um dos intermediários é a trealose-6-fosfato, resultado da reação de conversão de Glc6P e UDPGlc através da trealose-6-fosfato sintase. Neste estudo, observou-se a expressão de *CmTPS9*, *CmTPS7* e *CmTPS5*.

Quanto à expressão de *CmTPS9* (Figura 16), é possível identificar uma maior expressão deste gene em frutos de melão ‘Gaúcho’ nos dois últimos estágios de desenvolvimento em relação ao ‘Eldorado’, sendo que para o melão climatérico ocorre o aumento da expressão de 25 D.A.P. para 35 D.A.P. e se mantém constante até o estágio mais avançado de maturação e para não-climatérico não há mudança significativa da expressão ao longo do desenvolvimento. O melão ‘Eldorado’ apresenta valor superior de expressão de *CmTPS9* em relação ao ‘Gaúcho’ aos 25 D.A.P. apenas.

**Figura 16.** Expressão relativa do gene *CmTPS9* determinada através de  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$  para os frutos de melão ‘Gaúcho’ e ‘Eldorado’ durante três estágios de desenvolvimento. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão, onde letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre dias de desenvolvimento do fruto para a mesma cultivar e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as cultivares para um mesmo estágio de amadurecimento, segundo Teste de Tukey a 5% de significância.

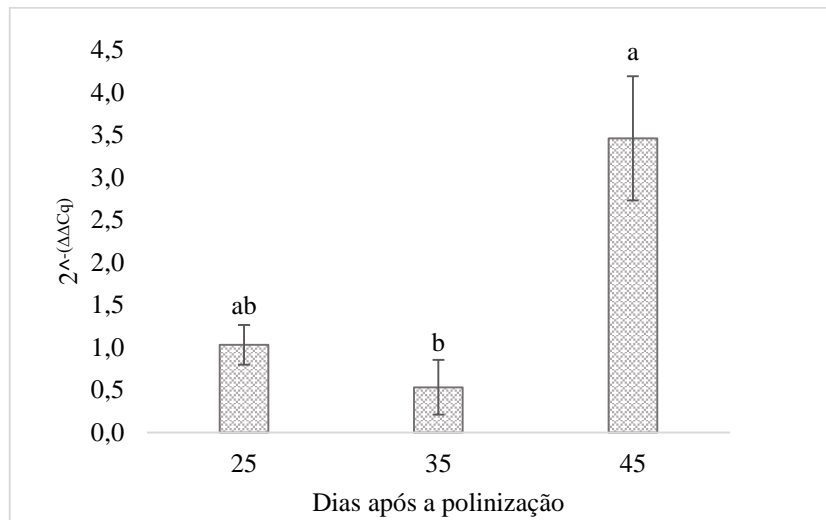


Fonte: a autora.

A avaliação da expressão gênica para *CmTPS7* (Figura 17) não resultou em interação significativa dos fatores (cultivar e dias após a polinização) e a análise isolada destes demonstrou que apenas para os dias de desenvolvimento do fruto houveram mudanças estatisticamente significativas. Para ambas as cultivares, observa-se o acréscimo da expressão de *CmTPS7* de 35 D.A.P. para 45 D.A.P., onde alcança os maiores valores.

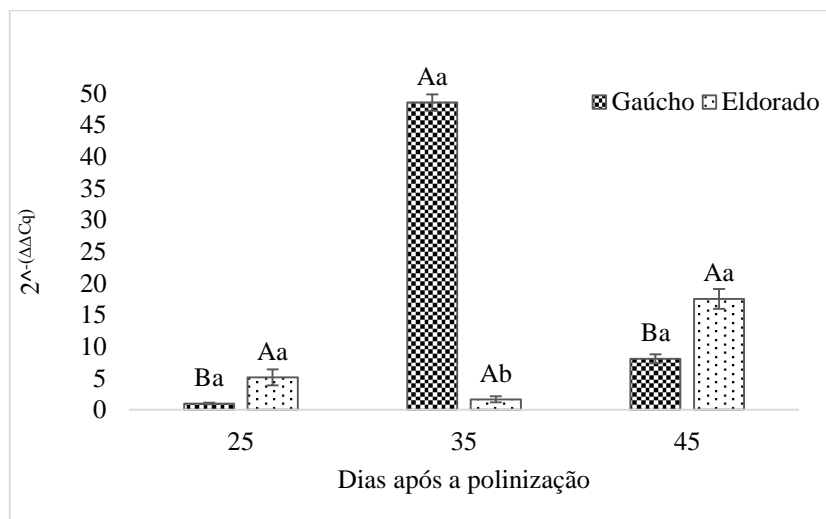
A expressão de *CmTPS5* também mostrou-se variável para cada cultivar ao longo da maturação (Figura 18). Em melão ‘Gaúcho’, observa-se um pico intenso de expressão aos 35 D.A.P., já para ‘Eldorado’ não há mudança de expressão ao longo da maturação. Além disto, constatou-se que para 25 D.A.P. e 45 D.A.P. não há diferença de expressão entre as cultivares.

**Figura 17.** Expressão relativa do gene *CmTPS7* ao longo da maturação determinada através de  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$ , resultados expressos através da média obtida para as cultivares  $\pm$  erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.



Fonte: a autora.

**Figura 18.** Expressão relativa do gene *CmTPS5* determinada através de  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$  para os frutos de melão ‘Gaúcho’ e ‘Eldorado’ durante três estágios de desenvolvimento. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão, onde letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre dias de desenvolvimento do fruto para a mesma cultivar e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as cultivares para um mesmo estágio de amadurecimento, segundo Teste de Tukey a 5% de significância.



Fonte: a autora.

Schemberger *et al.* (2020) foram pioneiros no estudo de melão em demonstrar através de rede de interação de proteínas uma alta interação entre genes *SUS* e *TPS*. Os autores encontraram, em frutos maduros de melão ‘Amarelo’, a interação de *CmSUS1*, *CmTPS7* e *CmTPS5*, co-expressos mais intensamente em frutos maduros, e em frutos jovens a interação entre *CmSUS2*, *CmTPS9* e *CmTPP1* (que codifica uma trealose-fosfato fosfatase), mais expressos nesta fase.

Nos resultados aqui apresentados, é possível verificar que a hipótese de co-expressão entre *CmTPS7* e *CmSUS1* pode ser validada para ambas as cultivares, de modo que ambos aumentaram os níveis durante a maturação. No entanto, para *CmTPS5* não houve mudanças significativas de expressão ao longo do desenvolvimento para ‘Eldorado’, enquanto que para ‘Gaúcho’ houve um pico de expressão aos 35 D.A.P., momento que coincide com o pico de produção de etileno e de mudança de coloração de casca, como já citado anteriormente. A expressão da isoforma *CmTPS9* não corroborou com os resultados encontrados por Schemberger *et al.* (2020), se manteve estável ao longo da maturação em ‘Eldorado’ e neste presente trabalho, indicam uma maior importância para melão ‘Gaúcho’, principalmente nos estágios 35 D.A.P. e fruto plenamente maduro.

Os níveis de açúcares no fruto são dependentes, entre outros fatores, das relações fonte-dreno (GUR *et al.*, 2016). Sabe-se que a T6P pode atuar como sinalizadora da disponibilidade de carbono e da homeostase, bem como pode atuar no desenvolvimento das plantas e na proteção contra estresses abióticos (DURÁN-SORIA *et al.*, 2020; O'HARA; PAUL; WINGLER, 2013; YADAV *et al.*, 2014). Yadav *et al.* (2014) propuseram um modelo sobre a interação de T6P e sacarose, de modo que os níveis de T6P aumentam de forma proporcional ao aumento de sacarose na célula, ao mesmo tempo que T6P age como um regulador negativo do conteúdo de sacarose, mantendo seus níveis em uma razão T6P:Sacarose apropriada. Estes mesmos autores citam que o aumento das hexoses frutose e glicose não promove a mesma relação de aumento de T6P como a sacarose. Os resultados de expressão apresentados aqui neste trabalho podem ser embasados por esta hipótese, pelo fato de que os estágios 35 D.A.P. e 45 D.A.P. de melão ‘Gaúcho’ apresentaram diferentes isoformas atuando para a síntese de T6P, em concordância com os estágios de maior produção e acúmulo de sacarose, como confirmado pelos resultados de açúcares. Em ‘Eldorado’, *CmTPS7* parece estar relacionado à este processo de homeostase, enquanto que *CmTPS9* e *CmTPS5* não apresenta uma relação clara com este processo.

Os níveis de T6P podem ser regulados também pela ação das proteínas sacarose quinase-1 não relacionada à fermentação (SnRK1) (FIGUEROA; LUNN, 2016), apesar deste processo ainda não estar completamente elucidado. Zhang *et al.* (2015) relatam que a maior força do dreno do primeiro fruto com pegamento em pepino está diretamente ligada ao maior teor de T6P acumulado no fruto e à diminuição da atividade de SnRK1 no pedúnculo. Sabe-se, atualmente, que a atividade de SnRK1 está ligada à sinalização por ABA gerando resultados ainda bastante discrepantes (COELLO *et al.*, 2012; RADCHUCK *et al.*, 2010) e que merecem atenção em futuros estudos com melão, já que em Schemberger *et al.* (2020) encontrou-se que

*CmNCED* (9-cis-epoxi-carotenoide dioxigenase), um precursor da síntese de ácido abscísico (ABA) é significativamente mais expresso em frutos maduros de melão ‘Amarelo’ do que em frutos jovens.

Além dos pontos apresentados, Schemberger *et al.* (2020) demonstraram que a interação entre *CmSUS1*, *CmTPS7* e *CmTPS5* em melão ‘Amarelo’ envolve também fatores de resposta de auxina como *CmAUXRF1* e *CmAUXRF2*, fitormônio este que já foi reportado como negativamente correlacionado com o acúmulo de açúcares. No momento, estudos voltados ao envolvimento da auxina na maturação, ou inibição desta, estão sendo realizados a fim de contribuir para a compreensão da relação TPS-auxina.

### 5.3.2 Metabolismo de carotenoides

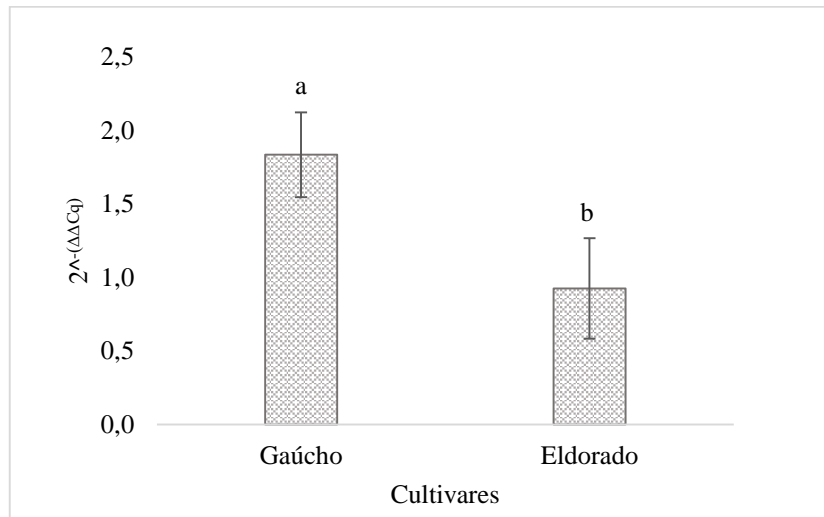
Uma das etapas mais importantes e decisivas para a via da carotenogênese está a reação catalisada pela enzima fitoeno sintase. Garcia-Mas *et al.* (2012) reportam três isoformas para PSY: *CmPSY1*, *CmPSY2* e *CmPSY3*. Neste trabalho, o enfoque foi dado para *CmPSY3*, na qual verificou-se que não houve interação significativa dos fatores (cultivar e dias de desenvolvimento). A análise estatística dos fatores isolados demonstrou que a expressão gênica de *CmPSY3* diferiu apenas quanto a cultivar, sendo superior em fruto de melão ‘Gaúcho’ (Figura 19).

Chayut *et al.* (2017) e Karvouni *et al.* (1995) citam que em melão de polpa alaranjada, assim como em diversos frutos, ocorre o aumento da expressão de *CmPSY* ao longo da maturação, resultado este que não se repetiu no presente estudo, pois *CmPSY3* não diferiu quanto aos dias de desenvolvimento do fruto. Tal achado não corrobora também os dados citados por Saladié *et al.* (2015), onde *CmPSY3* obteve expressão superior em frutos de melão ‘Piel de Sapo’ (não-climatérico) em relação ao melão ‘Védrantais’ (climatérico). O padrão de expressão de *CmPSY3*, superior em melão climatérico, é similar ao encontrado por Saladié *et al.* (2015) para a isoforma *CmPSY1*, demonstrando, portanto, que há diferenças intraespecíficas na expressão dos genes codificadores de PSY.

A máxima de que a superexpressão de genes *PSY* aumenta o nível de carotenoides em plantas (como no arroz dourado – YE *et al.*, 2000) não tem, necessariamente, uma correlação direta em melão. Tuan *et al.* (2019) ao analisarem genes da via carotenogênica em frutos de melão ‘Ohbokggul chamoe’ (polpa alaranjada) e ‘Gotgam’ (polpa verde clara), observaram a expressão de *CmPSY* superior neste último, contrariando achados de outras espécies. Ren *et al.* (2013) transformaram o melão ‘Honeydew’ (não-climatérico, grupo *Inodorus*) com o gene

*PSY-C* de melancia e observaram o aumento de produção de fitoeno e  $\beta$ -caroteno unicamente na casca do fruto, sem alterações significativas destes compostos na polpa do fruto transgênico em relação ao fruto selvagem, indicando que a regulação do acúmulo de carotenoides não ocorre necessariamente a nível transcricional para *Cucumis melo*.

**Figura 19.** Expressão relativa do gene *CmPSY3* para as cultivares de melão ‘Gaúcho’ e ‘Eldorado’ determinada através de  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ , resultados expressos através da média obtida ao longo dos dias de desenvolvimento  $\pm$  erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

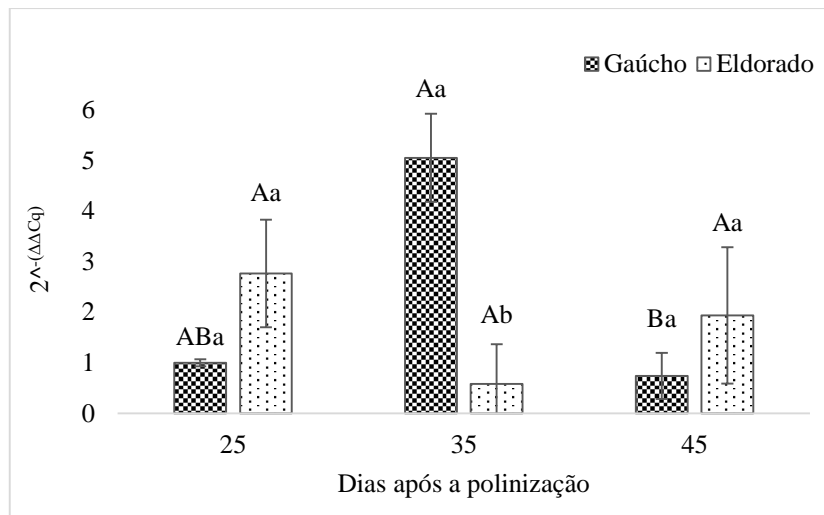


Fonte: a autora.

Sathasivam *et al.* (2020) relatam que a expressão de *PSY* sofre interferência de diversos fatores bióticos e abióticos, como a interação com ABA, estresses ambientais (luz excessiva, seca, estresse salino e de temperatura), além do controle pós-transcricional e pós-traducional. Em melão, a regulação da *PSY* a nível pós-traducional ocorre de forma única. Chayut *et al.* (2017) revelaram que a mutação no gene *CmOr* (que codifica uma proteína DnaJ da família das chaperonas), que contém a troca de uma arginina na posição 108 para uma histidina (também chamado de SNP dourado), é a determinante para que os frutos de melão acumulem altas quantidades de  $\beta$ -caroteno e por consequência, apresentem polpa alaranjada. Chayut *et al.* (2017) demonstra que *CmOr-His<sup>108</sup>* é capaz de estabilizar os níveis proteicos de *PSY* em frutos de polpa alaranjada, bem como, promove a diferenciação dos cloroplastos em cromoplastos, enquanto que frutos que carregam uma mutação induzida em *CmOr* (*low  $\beta$* ), sofrem inibição deste processo de biogênese. Portanto, os resultados aqui encontrados, com maior expressão de *CmPSY3* em melão ‘Gaúcho’, não são suficientes para determinar uma maior contribuição deste gene para o acúmulo de carotenoides no nível transcricional, já que a via metabólica pode estar sendo regulada em etapas subsequentes.

Outra etapa de fundamental importância para a produção de carotenoides está a reação de isomerização dos *cis* carotenoides para produção de todos os *trans* licopenos pela enzima caroteno isomerase. No genoma do melão (GARCIA-MAS *et al.*, 2012) verifica-se a presença de duas isoformas, *CmCRTISO1* e *CmCRTISO2*, e ambas foram estudadas quanto à expressão gênica neste trabalho. Para *CmCRTISO1* (Figura 20), observa-se um padrão invertido de expressão aos 35 D.A.P. para cada cultivar, onde ‘Gaúcho’ apresenta um pico de expressão enquanto para ‘Eldorado’ mantém-se baixa em todo o desenvolvimento. Para 25 D.A.P. e 45 D.A.P. não há diferença significativa dos níveis de *CmCRTISO1* entre as cultivares.

**Figura 20.** Expressão relativa do gene *CmCRTISO1* determinada através de  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$  para os frutos de melão ‘Gaúcho’ e ‘Eldorado’ durante três estágios de desenvolvimento. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão, letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre dias de desenvolvimento do fruto para a mesma cultivar e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as cultivares para um mesmo estágio de amadurecimento, segundo Teste de Tukey a 5% de significância.

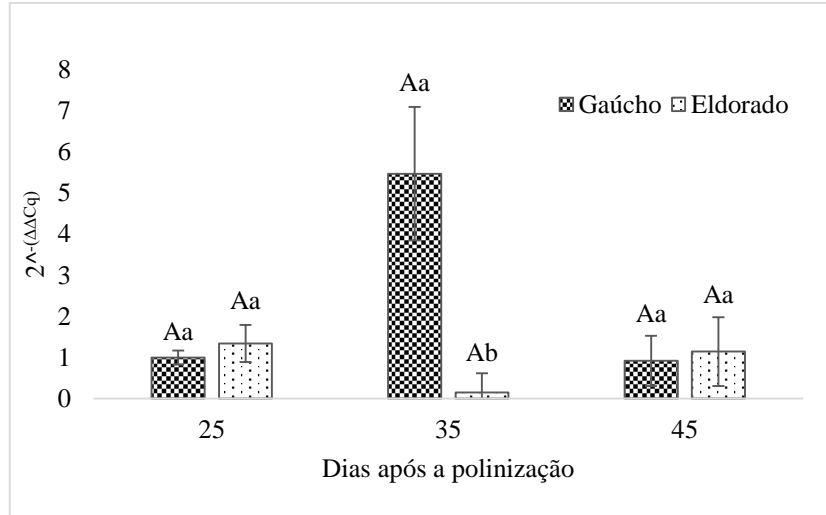


Fonte: a autora.

Para *CmCRTISO2* (Figura 21), observa-se que não houve diferença de expressão durante a maturação para nenhuma das duas cultivares quando analisado por Tukey a 5% de significância, no entanto, os níveis deste gene são superiores em melão ‘Gaúcho’ em relação ao ‘Eldorado’ aos 35 dias após a polinização, assim como em *CmCRTISO1*.

Saladié *et al.* (2015) observaram maior expressão de *CmCRTISO1* em frutos maduros de melão ‘Piel de Sapo’ (não-climatérico) em relação ao melão ‘Védrantais’ (climatérico), não se repetindo neste presente trabalho, onde a única diferença apresentada entre as cultivares, se dá aos 35 D.A.P. com maior expressão em ‘Gaúcho’ (climatérico). Garcia-Mas *et al.* (2012) reporta *CmCRTISO2* como não sendo expressa em frutos, discordando dos achados aqui descritos. Ademais, *CmCRTISO1* e *CmCRTISO2* parecem ter papéis semelhantes durante a produção de carotenoides nos estágios 25 D.A.P. e 45 D.A.P. nos melões estudados.

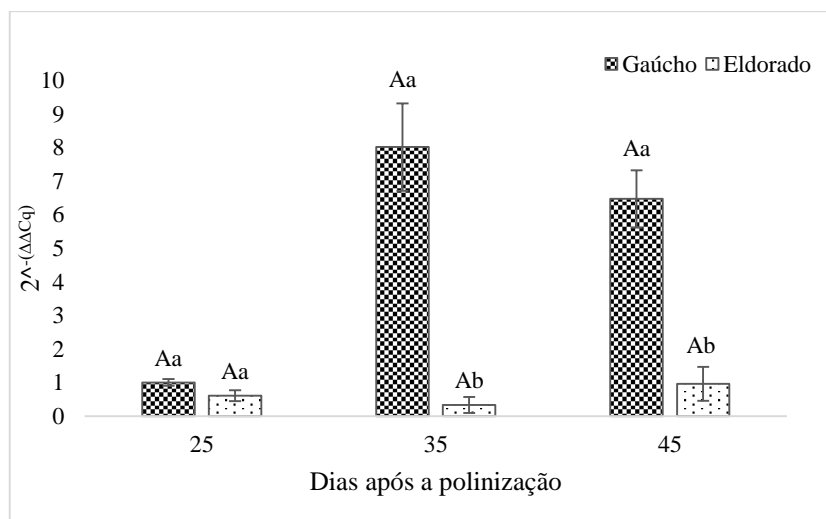
**Figura 21.** Expressão relativa do gene *CmCRTISO2* determinada através de  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$  para os frutos de melão ‘Gaúcho’ e ‘Eldorado’ durante três estágios de desenvolvimento. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão, onde letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre dias de desenvolvimento do fruto para a mesma cultivar e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as cultivares para um mesmo estágio de amadurecimento, segundo Teste de Tukey a 5% de significância.



Fonte: a autora.

No presente estudo, verificou-se também a expressão do gene *Cm $\beta$ OHase1*, que codifica uma enzima Beta-anel caroteno hidroxilase (Figura 22). Para este gene, a cultivar ‘Gaúcho’ apresentou níveis superiores de expressão em relação à ‘Eldorado’ aos 35 D.A.P. e 45 dias após a polinização.

**Figura 22.** Expressão relativa do gene *Cm $\beta$ OHase1* determinada através de  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$  para os frutos de melão ‘Gaúcho’ e ‘Eldorado’ durante três estágios de desenvolvimento. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão, onde letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre dias de desenvolvimento do fruto para a mesma cultivar e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as cultivares para um mesmo estágio de amadurecimento, segundo Teste de Tukey a 5% de significância.



Fonte: a autora.

Apesar da expressão de *Cm $\beta$ OHase1* em ‘Gaúcho’ aos 35 D.A.P. apresentar-se 8 vezes superior aos níveis de 25 D.A.P., não houve diferença estatística pelo teste de Tukey, com isto,

observa-se que não houve diferença de expressão ao longo da maturação para nenhuma das cultivares.

O pico de expressão encontrado para ambas as isoformas de caroteno isomerase, bem como a maior expressão de *CmβOHase1* em melão ‘Gaúcho’ nos últimos estágios de maturação em comparação com ‘Eldorado’ podem estar relacionados, além da contribuição direta para a produção de carotenoides e mudança de coloração do fruto, à formação de precursores para compostos voláteis e de fitormônios, principalmente ABA, já conhecido por seus níveis aumentados próximo ao pico de produção de etileno em fruto climatérico. Galpaz *et al.* (2013) avaliaram que um melão ‘Charentais’ (climatérico) com mutação induzida de perda de função de CRTISO (chamado de melão *yofI*) leva à produção de frutos de polpa amarela devido ao acúmulo de pró-licopeno (um composto amarelado), com intensa perda de aroma, já que a clivagem β-caroteno produz substratos para formação de compostos voláteis. Chayut *et al.* (2017) complementam que a mutação *yofI* causa o acúmulo de pró-licopeno independente da mutação do gene *CmOr*. Além disto, Los *et al.* (2021, *Preprint*) identificaram em melão ‘Gaúcho’ maior riqueza e concentração de voláteis do que em ‘Amarelo’, reforçando esta hipótese. Novos estudos estão sendo desenvolvidos com as cultivares de melão aqui citadas para compreensão da ação do ácido abscísico nos processos de formação de carotenoides e acúmulo de açúcares.



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base em resultados anteriores sobre atributos que formam a qualidade de frutos de meloeiros climatérico e não-climatérico, foram identificados como genes de interesse para o metabolismo de açúcares os candidatos *CmSUS1*, *CmSUS2*, *CmINH1*, *CmNAG2*, *CmTPS9*, *CmTPS7* e *CmTPS5* e para o metabolismo de carotenoides *CmPSY3*, *CmCRTISO1*, *CmCRTISO2* e *CmβOHase1*.

A expressão relativa destes genes foi analisada de forma integrativa com os resultados de qualidade pós-colheita e de quantificação de açúcares por HPLC, levando a algumas conclusões:

- A expressão *CmSUS1* pode contribuir significativamente para o aumento dos teores de sacarose ao longo da maturação para ambas as cultivares, enquanto que *CmSUS2* pode estar mais envolvida na conversão das hexoses glicose e frutose em frutos de melão ‘Gaúcho’, climatérico, indicado pelos menores teores destes compostos nos frutos;

- *CmINH1*, responsável pela inibição proteínica das invertases ácidas vacuolares, é um candidato importante como regulador da maturação provocada por açúcares, sendo mais expresso em frutos não-climatéricos, como o ‘Eldorado’, e em estágios iniciais de desenvolvimento;

- *CmNAG2* pode desempenhar papel de fornecimento de substratos para outras vias metabólicas em frutos jovens de ‘Eldorado’, enquanto que em melão maduro da cv. Gaúcho (climatérico) parece estar envolvido na síntese e acúmulo de sacarose;

- as *TPS* parecem estar mais envolvidas na regulação dos açúcares de melão ‘Gaúcho’ do que em ‘Eldorado’, salvo pela expressão de *CmTPS7*, principalmente nos estágios 35 e 45 D.A.P., podendo influenciar a força do dreno e a interação com fitormônios, como ABA, auxina e etileno, nestes frutos. Novos estudos devem ser realizados a fim de esclarecer a relação TPS:auxina e TPS:ABA;

- Quanto ao metabolismo de carotenoide e coloração do fruto, a cor da polpa e da casca de melão ‘Eldorado’ sofre mudanças progressivas ao longo de toda maturação, enquanto que para ‘Gaúcho’ há uma transição clara entre os estágios 25 D.A.P. (polpa) e 35 D.A.P. (casca). Este fenômeno pode estar relacionado ao aumento da expressão dos genes *CmCRTISO1*, *CmCTRISO2* e *CmβOHase1*, principalmente no estágios mais avançados da maturação, no entanto, esta via sofre forte regulação pós-transcricional e pós-traducional, não explicando completamente este processo. A expressão mais alta de genes da via dos carotenoides em ‘Gaúcho’ pode estar ligada, principalmente, à maior formação de compostos voláteis nesta

cultivar em relação à ‘Eldorado’, e a formação de fitormônios como ABA. Estudos mais aprofundados da relação deste fitormônio com a formação de carotenoides em frutos de melão climatérico e não-climatérico podem ajudar a esclarecer esta hipótese.

Esta é a primeira vez que a expressão destes genes é reportada para a cultivar ‘Gaúcho’, de importância comercial para o Brasil. Com isto, tais resultados contribuem para o conhecimento do metabolismo de açúcares e carotenoides e suas diferenças intraespecíficas entre frutos climatéricos e não-climatéricos, abrindo portas para novos estudos da regulação hormonal e para modificações no manejo e pela engenharia genética nestas cultivares.

## REFERÊNCIAS

- ABRAFRUTAS. **Dados de exportação 1ª Semestre/2021**. 2021. Disponível em: <https://abrafrutas.org/2021/08/dados-de-exportacao-1a-semester-2021-2/>. Acesso em: 10 set. 2021.
- AMANULLAH, S. *et al.* QTL mapping for melon (*Cucumis melo* L.) fruit traits by assembling and utilization of novel SNPs based CAPS markers. **Scientia Horticulturae**, v. 236, p.18-29, jun. 2018.
- ARGYRIS, J. M. *et al.* Combined use of genetic and genomics resources to understand virus resistance and fruit quality traits in melon. **Physiologia Plantarum**, v. 155, n. 1, p. 4–11, 2015.
- AYUB, R. *et al.* Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. **Nature Biotechnology**, v. 14, n. 7, p.862-866, jul. 1996.
- BALDWIN, E. A. *et al.* Quantitative Analysis of Flavor and Other Volatiles and for Certain Constituents of Two Tomato Cultivars during Ripening. **Journal Of The American Society For Horticultural Science**, v. 116, n. 2, p.265-269, mar. 1991.
- BURGER, Y. *et al.* The Contribution of sucrose to total sugar content in melons. **Acta Horticulturae**, n. 510, p.479-486, mar. 2000.
- BURGER, Y.; SCHAFFER, A. A. The contribution of sucrose metabolism enzymes to sucrose accumulation in *Cucumis melo*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 132, n. 5, p. 704–712, 2007.
- CAMPOS, G. S. de *et al.* High-quality total RNA isolation from melon (*Cucumis melo* L.) fruits rich in polysaccharides. **Semina Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 4, p.10-15, ago. 2017.
- CHAYUT, N. *et al.* A bulk segregant transcriptome analysis reveals metabolic and cellular processes associated with Orange allelic variation and fruit  $\beta$ -carotene accumulation in melon fruit. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 1, 2015.
- CHAYUT, N. *et al.* Distinct Mechanisms of the ORANGE Protein in Controlling Carotenoid Flux. **Plant Physiology**, v. 173, n. 1, p. 376-389, jan. 2017.
- CHAYUT, N. *et al.* Comparative transcriptome analyses shed light on carotenoid production and plastid development in melon fruit. **Horticulture Research**, v. 8, n. 112, p. 1-13, maio 2021.
- CHROST, B.; SCHMITZ, K. Changes in soluble sugar and activity of  $\alpha$ -galactosidases and acid invertase during muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruit development. **Journal of Plant Physiology**, v. 151, n. 1, p. 41–50, 1997.
- CLOTAULT, J. *et al.* Differential Selection on Carotenoid Biosynthesis Genes as a Function of Gene Position in the Metabolic Pathway: A Study on the Carrot and Dicots. **Plos One**, v. 7, n. 6, p. 1-13, jun. 2012.
- COELLO, P. *et al.* Evidence that abscisic acid promotes degradation of SNF1-related protein kinase (SnRK) 1 in wheat and activation of a putative calcium-dependent SnRK2. **Journal Of Experimental Botany**, v. 63, n. 2, p. 913-924, jan. 2012.
- COSTA, N. D.. **A cultura do melão**. 3. ed. Brasília: Embrapa, 2017. 202 p.

- DAI, N. Cloning and Expression Analysis of a UDP-Galactose/Glucose Pyrophosphorylase from Melon Fruit Provides Evidence for the Major Metabolic Pathway of Galactose Metabolism in Raffinose Oligosaccharide Metabolizing Plants. **Plant Physiology**, v. 142, n. 1, p. 294–304, 2006.
- DAI, N. *et al.* Metabolism of soluble sugars in developing melon fruit: A global transcriptional view of the metabolic transition to sucrose accumulation. **Plant Molecular Biology**, v. 76, n. 1–2, p. 1–18, 2011.
- DURÁN-SORIA, S. *et al.* Sugar Signaling During Fruit Ripening. **Frontiers In Plant Science**, v. 11, p. 1-18, ago. 2020.
- ESTERAS, C. *et al.* Fruit flesh volatile and carotenoid profile analysis within the *Cucumis melo* L. species reveals unexploited variability for future genetic breeding. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, v. 98, n. 10, p.3915-3925, 24 mar. 2018.
- FAO. **FAOSTAT: statistics database.** 2019. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>>. Acesso em: 20 jul. 2020.
- FERNÁNDEZ-TRUJILLO, J. P. *et al.* Breeding for Fruit Quality in Melon. **Breeding For Fruit Quality**, p.261-278, 16 mar. 2011.
- FIGUEROA, C. M.; LUNN, J. E.. A Tale of Two Sugars: trehalose 6-phosphate and sucrose. **Plant Physiology**, v. 172, n. 1, p. 7-27, ago. 2016.
- FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças.** 3. ed. Viçosa: UFV, 2013. 421 p.
- FREILICH, S. *et al.* Systems approach for exploring the intricate associations between sweetness, color and aroma in melon fruits. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 1–16, 2015.
- GALPAZ, N. *et al.* Genetic and chemical characterization of an EMS induced mutation in *Cucumis melo* *CRTISO* gene. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, v. 539, n. 2, p. 117-125, nov. 2013.
- GARCÍA, L. P. **Genetic dissection of fruit quality and ripening traits in melon.** 2018. 289 f. Tese (Doutorado) - Biology and Plant Biotechnology, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, 2018.
- GARCIA-MAS, J. *et al.* The genome of melon (*Cucumis melo* L.). **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 109, n. 29, p.11872-11877, 2 jul. 2012.
- GIOVANE, A. *et al.* Pectin methylesterase inhibitor. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Proteins And Proteomics**, v. 1696, n. 2, p.245-252, fev. 2004.
- GREINER, S. *et al.* Ectopic expression of a tobacco invertase inhibitor homolog prevents cold-induced sweetening of potato tubers. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 7, p. 708–711, 1999.
- GUIS, M. *et al.* Ripening-associated Biochemical Traits of Cantaloupe Charentais Melons Expressing an Antisense ACC Oxidase Transgene. **Journal Of The American Society For Horticultural Science**, v. 122, n. 6, p.748-751, 1997.
- GUR, A. *et al.* Genomic Aspects of Melon Fruit Quality. *In*: GRUMET, R.; KATZIR, N.; GARCIA-MAS, J. (ed.). **Plant Genetics and Genomics: crops and models.** Springer, 2016. p. 377-408.

- IBGE. **Produção Agrícola Municipal (PAM)**. 2020. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>>. Acesso em: 20 jul. 2020.
- JIN, Y. *et al.* Posttranslational Elevation of Cell Wall Invertase Activity by Silencing Its Inhibitor in Tomato Delays Leaf Senescence and Increases Seed Weight and Fruit Hexose Level. **The Plant Cell Online**, v. 21, n. 7, p. 2072–2089, 2009.
- KANO, Y. Effects of Mechanically Restricting Melon (*Cucumis melo* L.) Fruit Growth on Cell Size and Sugar Accumulation. **Environment Control In Biology**, v. 47, n. 1, p.13-19, 2009.
- KARVOUNI, Z. *et al.* Isolation and characterisation of a melon cDNA clone encoding phytoene synthase. **Plant Molecular Biology**, v. 27, n. 6, p. 1153-1162, mar. 1995.
- KIILL, L. H. P. *et al.* **Polinização do meloeiro**: biologia reprodutiva e manejo de polinizadores. Rio de Janeiro: Funbio, 2015. 32 p.
- KLOTZ, K. L. *et al.* Characterization of two sucrose synthase isoforms in sugarbeet root. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 107–115, 2003.
- KONG, Q. *et al.* Assessment of Suitable Reference Genes for Quantitative Gene Expression Studies in Melon Fruits. **Frontiers In Plant Science**, v. 7, p.1-10, 3 ago. 2016.
- KONICA MINOLTA. **Precise color communication**: color control from perception to instrumentation. Japão: Konica Minolta, 2007. 62 p.
- KOU, X. *et al.* Different regulatory mechanisms of plant hormones in the ripening of climacteric and non-climacteric fruits: a review. **Plant Molecular Biology**, v. 107, n. 1, p. 477-497, out. 2021.
- KOUONON, L. C. *et al.* Reproductive biology of the andromonoecious *Cucumis melo* subsp. *agrestis* (Cucurbitaceae). **Annals Of Botany**, v. 104, p. 1109-1129, jan. 2009.
- LEIDA, C. *et al.* Variability of candidate genes, genetic structure and association with sugar accumulation and climacteric behavior in a broad germplasm collection of melon (*Cucumis melo* L.). **BMC Genetics**, v. 16, n. 1, p. 1–17, 2015.
- LI, Z. *et al.* Transgenic approach to improve quality traits of melon fruit. **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 3, p. 268-277, maio 2006.
- LINGLE, S. E.; DUNLAP, J. R. Sucrose Metabolism in Netted Muskmelon Fruit during Development. **Plant physiology**, v. 84, n. 2, p. 386–9, 1987.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D.. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{(-\Delta\Delta C(T))}$  Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, dez. 2001.
- LOS, K. K. de S. *et al.* Comparative Analyses of Volatile Metabolites Associated With Gene Expression From Non-climacteric and Climacteric Melon. **Research Square**, p. 1-26, ago. 2021. Disponível em: <https://www.researchsquare.com/article/rs-831571/v1>. Acesso em: 20 set. 2021.
- LV, Pin *et al.* Changes in carotenoid profiles and in the expression pattern of the genes in carotenoid metabolisms during fruit development and ripening in four watermelon cultivars. **Food Chemistry**, v. 174, n. 1, p. 52-59, maio 2015.
- MARTIN, A. *et al.* A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. **Nature**, v. 461, n. 7267, p. 1135 – 1237, set. 2009.

- MELONOMICS. **Melonomics**. Disponível em: <<http://www.melonomics.net/>>. Acesso em: 10 dez. 2020.
- MORABITO, C.; SECCHI, F.; SCHUBERT, A.. Grapevine TPS (trehalose-6-phosphate synthase) family genes are differentially regulated during development, upon sugar treatment and drought stress. **Plant Physiology And Biochemistry**, v. 164, n. 1, p. 54-62, jul. 2021.
- NEUMAN, H. *et al.* The tomato mutation *nxd1* reveals a gene necessary for neoxanthin biosynthesis and demonstrates that violaxanthin is a sufficient precursor for abscisic acid biosynthesis. **The Plant Journal**, v. 78, p. 80-93, fev. 2014.
- NOOKARAJU, A. *et al.* Molecular approaches for enhancing sweetness in fruits and vegetables. **Scientia Horticulturae**, v. 127, n. 1, p. 1–15, 2010.
- O'HARA, L. E.; PAUL, M. J.; WINGLER, A.. How do sugars regulate plant growth and development? New insight into the role of trehalose-6-phosphate. **Molecular Plant**, v. 6, n. 2, p. 261-274, mar. 2013.
- OHKAWA, W. *et al.* Metabolic process of the <sup>14</sup>C-sugars on the translocation pathways of cucumber plants. **Scientia Horticulturae**, v. 124, n. 1, p. 46–50, 2010.
- OHMIYA, A. *et al.* Molecular Basis of Carotenoid Accumulation in Horticultural Crops. **The Horticulture Journal**, v. 88, n. 2, p.135-149, 2019.
- OLIVEIRA, F. I. C. de *et al.* A cultura do melão. In: FIGUEIRÊDO, M. C. B. de *et al.* (ed.). **Produção de melão e mudanças climáticas: sistemas conservacionistas de cultivo para redução das pegadas de carbono e hídrica**. Brasília: Embrapa, 2017. p. 17-31.
- PARIS, H.S. *et al.* Cucurbitaceae Melons, Squash, Cucumber. **Encyclopedia Of Applied Plant Sciences**, p.209-217, 2017.
- PECH, J. C. *et al.* Climacteric fruit ripening: Ethylene-dependent and independent regulation of ripening pathways in melon fruit. **Plant Science**, v. 175, n. 1–2, p. 114–120, 2008.
- PECH, J. C; BOUZAYEN, M.; LATCHÉ, A. Cellular, metabolic and molecular aspects of the chloroplast differentiation in ripening fruit. In: NATH, P *et al.* **Fruit Ripening: Physiology, Signalling and Genomics**. Londres: Cab International, 2014. p. 28-47.
- PITRAT, M. Melon Genetic Resources: Phenotypic Diversity and Horticultural Taxonomy. In: GRUMET, R. *et al.* **Genetics and Genomics of Cucurbitaceae**: Springer International Publishing, 2017. p. 25-60. (20).
- PRESSEY, R. Invertase inhibitor in tomato fruit. **Phytochemistry**, v. 36, n. 3, p. 543–546, 1994.
- QIN, G. *et al.* A Tomato Vacuolar Invertase Inhibitor Mediates Sucrose Metabolism and Influences Fruit Ripening. **Plant Physiology**, v. 172, n. 3, p. 1596-1611, nov. 2016.
- RADCHUK, R. *et al.* Sucrose non-fermenting kinase 1 (SnRK1) coordinates metabolic and hormonal signals during pea cotyledon growth and differentiation. **The Plant Journal**, v. 61, n. 2, p. 324-338, jan. 2010.
- RAUSCH, T.; GREINER, S. Plant protein inhibitors of invertases. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Proteins And Proteomics**, v. 1696, n. 2, p.253-261, fev. 2004.
- REN, Y. *et al.* Levels of phytoene and  $\beta$ -carotene in transgenic honeydew melon (*Cucumis*

- melo* L. *inodorus*). **Plant Cell, Tissue And Organ Culture**, v. 113, p. 291-301, 2013.
- SALADIÉ, M. *et al.* Comparative transcriptional profiling analysis of developing melon (*Cucumis melo* L.) fruit from climacteric and non-climacteric varieties. **BMC genomics**, v. 16, p. 440, 2015.
- SATHASIVAM, R. *et al.* An update on biosynthesis and regulation of carotenoids in plants. **South African Journal Of Botany**, v. 140, p. 290-302, ago. 2021.
- SCHEMBERGER, M. O. *et al.* Transcriptome profiling of non-climacteric 'yellow' melon during ripening: insights on sugar metabolism. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 1-20, mar. 2020.
- SOUSA, A. L. *et al.* Modificação química da pectina do melão caipira (*Cucumis melo* var. *Acidulus*). **Química Nova**, v. 5, n. 40, p. 554-560, jan. 2017.
- STROKA, M. A.; SCHEMBERGER, M. O.; AYUB, R. A.. Sugar Metabolism in Climacteric and Non-Climacteric Melon. **Annual Plant Reviews Online**, v. 4, n. 1, p. 243-262, mar. 2021.
- SUN, T.; LI, L.. Toward the 'golden' era: the status in uncovering the regulatory control of carotenoid accumulation in plants. **Plant Science**, v. 290, n. 1, p. 1-11, jan. 2020.
- SUN, T.; TADMOR, Y.; LI, L.. Pathways for Carotenoid Biosynthesis, Degradation, and Storage. *In*: RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; WELSCH, R. (ed.). **Plant and Food Carotenoids: methods and protocols**. Humana Press, 2020. p. 3-23.
- TADMOR, Y. *et al.* Genetics of flavonoid, carotenoid, and chlorophyll pigments in melon fruit rinds. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 58, n. 19, p. 10722-10728, out. 2010.
- TANASE, K.; YAMAKI, S. Purification and characterization of two sucrose synthase isoforms from Japanese pear fruit. **Plant Cell Physiology**, v. 41, n. 4, p. 408-414, 2000.
- TESTONE, G. *et al.* Insights into sucrose pathway of chicory stems by integrative transcriptomic and metabolic analyses. **Phytochemistry**, v. 167, n. 1, p. 1-12, nov. 2019.
- TUAN, P. A. *et al.* Carotenoid Biosynthesis in Oriental Melon (*Cucumis melo* L. var. *makuwa*). **Foods**, v. 77, n. 8, p. 1-9, fev. 2019.
- TZURI, G. *et al.* A 'golden' SNP in *CmOr* governs the fruit flesh color of melon (*Cucumis melo*). **The Plant Journal**, v. 82, n. 2, p.267-279, abr. 2015.
- YADAV, U. P. *et al.* The sucrose-trehalose 6-phosphate (Tre6P) nexus: specificity and mechanisms of sucrose signalling by Tre6P. **Journal Of Experimental Botany**, v. 65, n. 4, p. 1051-1068, mar. 2014.
- YANO, R.; EZURA, H.. Fruit Ripening in Melon. *In*: GRUMET, R.; KATZIR, N.; GARCIA-MAS, J. (ed.). **Genetics and Genomics of Cucurbitaceae**. Springer, 2016. p. 345-375.
- YANO, R.; NONAKA, S.; EZURA, H.. Melonet-DB, a Grand RNA-Seq Gene Expression Atlas in Melon (*Cucumis melo* L.). **Plant Cell Physiology**, v. 1, n. 59, p. 1-15, jan. 2018.
- YE, X. *et al.* Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. **Science**, v. 287, n. 5451, p. 303-305, jan. 2000.

- YURI, J. E.; RESENDE, G. M. de; COSTA, N. D. (Org.). Escolha ideal: Que aspectos levar em consideração antes de decidir sobre qual cultivar de melão utilizar para melhor atender às condições locais de plantio. **Cultivar**, p.21-23, jan. 2019.
- ZHANG, C. *et al.* The Origin and Composition of Cucurbit “Phloem” Exudate. **Plant Physiology**, v. 158, n. 4, p. 1873–1882, 2012.
- ZHANG, H. *et al.* Transcriptome profiling of *Cucumis melo* fruit development and ripening. **Horticulture Research**, v. 3, p.1-10, 27 abr. 2016.
- ZHANG, H. *et al.* A High-Quality Melon Genome Assembly Provides Insights into Genetic Basis of Fruit Trait Improvement. **iScience**, v. 22, n. 1, p. 16-27, dez. 2019.
- ZHANG, Z. *et al.* Trehalose-6-phosphate and SNF1-related protein kinase 1 are involved in the first-fruit inhibition of cucumber. **Journal Of Plant Physiology**, v. 177, n. 1, p. 110-120, abr. 2015.
- ZHENG, X.; KUIJER, H.N.J.; AL-BABILI, S.. Carotenoid Biofortification of Crops in the CRISPR Era. **Trends In Biotechnology**, v. 39, n. 9, p. 857-860, set. 2021.
- ZHENG, X. Y.; WOLFF, D. W. Ethylene production, shelf-life and evidence of RFLP polymorphisms linked to ethylene genes in melon (*Cucumis melo* L.). **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, n. 4, p. 613–624, 2000.
- ZHONG, S. *et al.* Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 154–159, 2013.