

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

FLÁVIA MARIA GUSTANI

**EXPRESSÃO DE GENES E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PAREDE CELULAR
DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE MELÕES NÃO-CLIMATÉRICOS (*Cucumis
melo L.*)**

PONTA GROSSA

2024

FLÁVIA MARIA GUSTANI

**EXPRESSÃO DE GENES E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PAREDE CELULAR
DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE MELÕES NÃO-CLIMATÉRICOS (*Cucumis
melo L.*)**

Tese apresentada para obtenção do título
de Doutora em Agronomia na
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Área de Concentração: Fitotecnia e
Fitossanidade

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio
Ayub.

PONTA GROSSA

2024

Gustani, Flávia Maria
G982 Expressão de genes e atividade enzimática da parede celular durante o desenvolvimento de melões não-climatéricos (*Cucumis melo* L) / Flávia Maria Gustani. Ponta Grossa, 2024.
83 f.

Tese (Doutorado em Agronomia - Área de Concentração: Fitotecnia e Fitossanidade), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub.

1. Expressão gênica. 2. Firmeza. 3. Estádios - desenvolvimento. 4. Enzimas - degradação. 5. Frutos não- climatéricos. I. Ayub, Ricardo Antonio. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fitotecnia e Fitossanidade. III.T.

CDD: 634



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bairro Uvaranas - CEP 84030-900 - Ponta Grossa - PR - <https://uepg.br>

TERMO DE APROVAÇÃO FLÁVIA MARIA GUSTANI

“EXPRESSÃO DE GENES E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PAREDE CELULAR DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE MELÕES NÃO-CLIMATÉRICOS (*Cucumis melo L*)”.

Tese apresentada para obtenção do título de doutor em Agronomia na
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Agricultura.

Ponta Grossa, 30 de abril de 2024.

Prof. Dr. Ricardo Antônio Ayub
Doutor em Biologia Celular e Molecular
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof. Dr. Rafael Mazer Etto
Doutor em Ciências
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi Doutor em Biologie
Moléculaire Végétale Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Silvanda de Melo Silva Doutor em
Horticultura Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Maria Raquel Alcântara de Miranda Doutor
em Agronomia Universidade Federal do Ceará

04/07/2024, 04:42

SEI/UEPG - 1966625 - Termo



Documento assinado eletronicamente por Ricardo Antonio Ayub, Professor(a), em 17/05/2024, às 16:08, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por Rafael Mazer Etto, Professor(a), em 05/06/2024, às 16:08, 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 06/06/2024, às 11:57, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por MARIA RAQUEL ALCANTARA DE MIRANDA, Usuário Externo, em 06/06/2024, às 13:11, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por Cesar valmor rombaldi, Usuário Externo, em 12/06/2024, às 16:04, 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 1966625 e o código CRC D670C25C.

Dedico esse trabalho a minha mãe
Lúcia Eva de Oliveira Gustani por ser
minha maior incentivadora na pesquisa,
por todo amor, apoio e carinho dedicados
a mim durante minha jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente a Deus pela oportunidade acadêmica, por todas as pessoas boas que encontrei durante essa jornada, pela saúde e por todo conhecimento adquiridos nessa jornada.

Gostaria de expressar minha mais profunda gratidão a minha mãe Lucia Eva de Oliveira Gustani e meu pai Luiz Carlos Gustani por todos os valores que me ensinaram, por todo apoio emocional e financeiro ao longo dos anos, foram muitos os sacrifícios para que eu pudesse chegar longe tão longe nos estudos e realizar meus sonhos, cada conquista minha também é uma vitória de vocês. Agradeço também a minha irmã Emanuele Cristina Gustani Buss por ser minha inspiração como mulher e profissional, por todo incentivo acadêmico e por colaborar com a estatística nesse trabalho. Agradeço a minha avó Terezinha Kostek Gustani, por todo carinho e atenção e a toda minha família.

Agradeço também ao meu amor, Kaique Paz Correia de Medeiros, por todo carinho, compreensão, apoio, companheirismo, por me incentivar na pesquisa, por escolher dividir a vida comigo e tornar tudo mais alegre, você é fundamental em minha caminhada.

Agradeço ao meu orientador Dr. Ricardo Antônio Ayub pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, pela orientação, amizade e confiança ao me entregar esse projeto e me colocar em uma equipe de trabalho de excelência. Agradeço aos professores Dr. Rafael Mazer Etto e a Dra. Carolina Weigert Galvão por todo suporte científico e pelos valiosos conselhos. Agradeço a professora Dra. Mareci Mendes de Almeida por toda paciência e ajuda no desenvolvimento dos protocolos enzimáticos. Agradeço a professora Dra. Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz pelos reagentes doados para a realização do meu trabalho enzimático. Agradeço também ao Dr. Miguel Fuentes Guevara por todo auxílio nas análises estatísticas.

Agradeço à Universidade Estadual de Ponta Grossa, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), código de financiamento 001, pela concessão de bolsa e ao Programa de Pós- Graduação em Agronomia -PPAgro pela oportunidade.

Agradeço as minhas amigas Marília Stroka Kremer e Calistene Aparecida Pinto por todo suporte técnico, científico, pelo tempo e paciência dedicados a mim durante o meu aprendizado, agradeço também pela amizade, conselhos, parceria, irmandade, vocês são grandes presentes da pós-graduação que levarei para a vida. Estendo o meu agradecimento a

todos os integrantes do Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Fruticultura e do Laboratório de Biologia Molecular Microbiana, pelos anos de convivência e assistência prestados a mim, em especial Willian Y. Takahashi, Cristiane Colodel e Ranyelly Coutrim,.Agradeço também aos meus amigos, Christian Lopes e Marcos Moraes pela amizade aos longos dos anos.

Gostaria de agradecer também aos meus companheiros de quatro patas Fred e Bambino. Fred que me acompanhou desde a graduação, durante o mestrado só não aguentou finalizar essa etapa comigo e partiu para o céu dos cachorrinhos. E Bambino que me acompanha desde filhotinho com lealdade e sua energia contagiante, por estarem presentes em todos os momentos, por me tornarem um ser humano melhor e por deixarem a vida mais leve.

Por fim gostaria de expressar o meu mais profundo agradecimento todos que, de forma direta ou indireta, me ajudaram a tornar esse trabalho realidade, á todos os professores e professoras que participaram da minha trajetória acadêmica, cada um vocês desempenharam um papel essencial em minha jornada e suas contribuições jamais serão esquecidas

Muito obrigada!

RESUMO

O melão (*Cucumis melo* L.) é uma cultura de grande importância agrícola e econômica, uma das características marcantes do melão é possuir alta variabilidade genética, apresentando fenótipos climatéricos e não climatéricos, influenciando diretamente na maturação dos frutos. O processo de amadurecimento do melão influencia no aroma, sabor, concentração de açúcares, cor e textura, sendo essa relacionada a textura e durabilidade pós-colheita do fruto devido à presença da parede celular. A perda de firmeza dos frutos não climatéricos está relacionada a regulação da expressão de genes que regulam componentes da parede celular. Assim o objetivo desse trabalho elucidar o padrão expressão dos genes: *CmAGL1*, (α -galactosidase), *CmCEL* (Endoglucanase), (*CmXGT* (xiloglucano glycosiltransferase), *CmXYL* (β -D-xilosidase família de proteínas) *CmXTH1* e *CmXTH2* (Xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase), *CmPGL1* e *CmPGL2* (Poligacturonases), *CmPGN* (Poligalacturonase-1 não-catalítica subunidade beta) e *CmEXP* (Expansina-like A2), em função dos estádios de maturação 15, 25, 35 e 45 dias após a polinização (D.A.P) no metabolismo da parede celular em frutos de melão não- climatérico cv. ‘Eldorado’, utilizando a técnica de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR). Os frutos foram cultivados em casa de vegetação, colhidos aos 15, 25, 35 e 45 (D.A.P). Foram feitas análises pós-colheita, desenho de primers, extração de RNA total, conversão para cDNA e análises de RT-qPCR, os dados foram submetidos a análise de variância, ANOVA e teste de Tukey a 5% de significância. Os primers dos genes *CmPGL1* e *CmPGL2* não foram aptos para as análises de RT-qPCR. Os genes *CmAGL1*, *CmCEL*, *CmXYL*, *CmXTH1*, *CmXTH2*, *CmEXP* e *CmPGN* foram mais expressos nos estádios iniciais da maturação, especialmente aos 25 dias após a polinização (D.A.P), período em que ocorre a atividade das enzimas de degradação dos componentes da parede celular, resultando em aumento de peso e firmeza dos frutos. O gene *CmXGT* foi mais expresso aos 45 D.A.P. Aos 35 e 45 D.A.P, observou-se uma diminuição na firmeza dos frutos devido à solubilização da celulose, hemicelulose e pectina. A atividade das enzimas poligalacturonases e β -D-xilosidase iniciou-se aos 25 D.A.P e permaneceu alta até a completa maturação dos frutos. Observaram-se correlações positivas entre a expressão de *CmAGL1* e *CmPGN*, *CmAGL1* e *CmXTH1*, *CmXTH1* e *CmPGN*, *CmXTH1* e *CmXTH2*, , bem como entre a expressão de *CmEXP* e a atividade de poligalacturonases, e entre a atividade das β -D-xilosidases e a atividade de poligalacturonases. Por outro lado, foram identificadas correlações negativas entre a expressão de *CmCEL* e *CmXGT*, entre a expressão de *CmXGT* e a firmeza dos frutos, e entre a atividade das β -D-xilosidases e a firmeza. Conclui-se que os genes relacionados à parede celular são mais expressos aos 25 D.A.P e estão associados à expansão celular, sendo sua expressão regulada por diversos fatores.

Palavras chaves: Frutos não- climatéricos; Expressão gênica; Firmeza; Estádios de desenvolvimento; Enzimas de degradação.

ABSTRAT

The melon (*Cucumis melo* L.) is a crop of significant agricultural and economic importance. One of its most notable characteristics is its high genetic variability, presenting both climacteric and non-climacteric phenotypes, which directly influence fruit ripening. The ripening process of the melon affects its aroma, flavor, sugar concentration, color, and texture, the latter being related to the post-harvest texture and durability of the fruit due to the presence of the cell wall. The loss of firmness in non-climacteric fruits is associated with the regulation of gene expression that controls cell wall components. Thus, the aim of this study is to elucidate the expression pattern of the following genes: *CmAGL1* (α -galactosidase), *CmCEL* (Endoglucanase), *CmXGT* (xyloglucan glycosyltransferase), *CmXYL* (β -D-xylosidase protein family), *CmXTH1* and *CmXTH2* (Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase), *CmPGL1* and *CmPGL2* (Polygalacturonases), *CmPGN* (Polygalacturonase-1 non-catalytic beta subunit), and *CmEXP* (Expansin-like A2) at the maturation stages of 15, 25, 35, and 45 days after pollination (D.A.P) in the cell wall metabolism of non-climacteric melon fruits cv. 'Eldorado', using reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-qPCR). The fruits were cultivated in a greenhouse and harvested at 15, 25, 35, and 45 D.A.P. Post-harvest analyses, primer design, total RNA extraction, conversion to cDNA, and RT-qPCR analyses were conducted, and the data were subjected to variance analysis (ANOVA) and Tukey's test at 5% significance. The primers for genes *CmPGL1* and *CmPGL2* were not suitable for RT-qPCR analyses. The genes *CmAGL1*, *CmCEL*, *CmXYL*, *CmXTH1*, *CmXTH2*, *CmEXP*, and *CmPGN* were more highly expressed at the early stages of maturation, especially at 25 days after pollination (D.A.P), during which the activity of cell wall component degradation enzymes occurs, resulting in increased fruit weight and firmness. The *CmXGT* gene was more highly expressed at 45 D.A.P. At 35 and 45 D.A.P, a decrease in fruit firmness was observed due to the solubilization of cellulose, hemicellulose, and pectin. The activity of polygalacturonase and β -D-xylosidase enzymes began at 25 D.A.P and remained high until full fruit maturation. Positive correlations were observed between the expression of *CmAGL1* and *CmPGN*, *CmAGL1* and *CmXTH1*, *CmXTH1* and *CmPGN*, *CmXTH1* and *CmXTH2*, as well as between the expression of *CmEXP* and the activity of polygalacturonases, and between the activity of β -D-xylosidases and the activity of polygalacturonases. Conversely, negative correlations were identified between the expression of *CmCEL* and *CmXGT*, between the expression of *CmXGT* and fruit firmness, and between the activity of β -D-xylosidases and firmness. It is concluded that the genes related to the cell wall are more highly expressed at 25 D.A.P and are associated with cell expansion, with their expression regulated by various factors.

Keywords: Non-climacteric fruits; gene expression; firmness; developmental stages; enzymes of degradation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação de Microfibrilas de Celulose. A molécula de sitosterol se liga à glicose, resultando na formação de β -glicosídeo de sitosterol. Este processo é catalisado e direcionado para as rosetas. A sacarose, que se origina do ciclo do açúcar e é catalisada pela sacarose sintase, gera UDP-GLC e frutose. As moléculas de UDP-glicose são posteriormente incorporadas ao complexo conhecido como rosetas, facilitando a formação de microfibrilas de celulose. 23

Figura 2. Estrutura dos xiloglucanos composta por D- glicosil conectados entre si por ligações β -(1-4), podem se ligar a xilose por ligações α - (1-6), a xilose pode estar associada a d- galactose via ligações β -(1-2), e a galactose pode unir-se a L- fucose por ligações α - (1-6), o terminal redutor é onde outras moléculas de xiloglucano podem se ligar via transglicolise. Fonte: a autora em adaptação de Gavande; Goyal; Fontes (2023). 25

Figura 3. Atuação dos genes candidatos que atuam despolimerizando componentes da parede celular. *CmAGL1*: α -galactosidase; *CmCEL*: Endoglucanase; *CmXGT*: Xiloglucano glycosiltransferase 4; *CmXYL*: Beta-D-xilosidase família proteíca; *CmXTH1*: Xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase; *CmXTH2*: Xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase; *CmPGN*: Poligalacturonase-1 não- catalítica subunidade beta; *CmEXP*: Expansina tipo 2 GalP galactose-1- fosfato; UDP gal uracil difosfato galctose; UDPglc: glicose difosfato de uracila. Fonte: A autora. 34

Figura 4. Plantas de meloeiro em casa de vegetação com 27 dias após o plantio, conduzido com fitilho vertical. Fonte: A autora 39

Figura 5. Frutos de melão “Eldorado”, durante os estádios de maturação baseados nos dias após a polinização (D.A.P) cultivar Eldorado. Fonte: A autora. 40

Figura 6. Mudança na coloração da cor da casca de melão amarelo cv. Eldorado a) coordenada a^* : $-a^*$ representa a cor verde e $+a^*$ a cor vermelha; b) coordenada b^* : sendo $-b^*$ tons em azul e $+b^*$ tons em amarelo; c) atributo L^* para o brilho/luminosidade da casca; d) ângulo Hue. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ao longo do

desenvolvimento para cor da casca e letra minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) ao longo do desenvolvimento para cor de polpa, ambos por teste de Tukey. Fonte: A autora. 48

Figura 7. Diagrama CIELAB com sequência de nuances de cores e orientação do ângulo de Hue (BOVI, 2016). 49

Figura 8. Medidas relacionadas ao tamanho dos frutos de melão amarelo cv. Eldorado. a) Comprimento horizontal (mm); b) Comprimento vertical (mm); c) Peso dos frutos (g); d) Firmeza dos frutos (N). Fonte: A autora. 50

Figura 9. Medidas de acidez, sólidos solúveis de melão amarelo cv. Eldorado, indicadores de maturidade fisiológica dos frutos. a) valores de pH do suco da fruta; b) acidez titulável em porcentagem de ácido cítrico; c) quantidade de sólidos solúveis (SS) em escala de °Brix. Fonte: A autora. 51

Figura 10. Expressão gênica relativa do gene *CmAGL1* responsável pela codificação da α -galactosidase. Foram utilizadas as médias dos tratamentos, apresentando o erro padrão, letra diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) a teste de Tukey a 5%. Fonte: A autora. 52

Figura 11. Análise de expressão genica diferencial para o gene *CmCEL* responsável pela sinalização das endoglucanases. Foram utilizadas as médias dos tratamentos, apresentando o erro padrão, letra diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) a teste de Tukey a 5%. Fonte: A autora. 53

Figura 12. Análise de expressão gênica relativa do gene *CmXGT* responsável pela codificação da enzima xiloglucano glicosiltransferases-4. Fonte: A autora. Foram utilizadas as médias dos tratamentos, apresentando o erro padrão, letra diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) a teste de Tukey a 5%. Fonte: A autora. 55

Figura 13. Análise de expressão gênica relativa do gene *CmXYL*, responsável pela codificação da enzima β -d-xilosidase. Foram utilizadas as médias dos tratamentos,

apresentando o erro padrão, letra diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) a teste de Tukey a 5%. Fonte: A autora. 56

Figura 14. Análise de expressão genica diferencial para o gene *CmXTH1* responsável pela sinalização da enzima xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase. Foram utilizadas as médias dos tratamentos, apresentando o erro padrão, letra diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) a teste de Tukey a 5%. Fonte: A autora. 57

Figura 15. Análise de expressão gênica relativa para o gene *CmXTH2* responsável pela codificação da enzima xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase. Foram utilizadas as médias dos tratamentos, apresentando o erro padrão, letra diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) a teste de Tukey a 5%. Fonte: A autora. 58

Figura 16. Análise de expressão gênica relativa do gene *CmPGN*, responsável pela codificação da poligacturonase subunidade 1 não catalítica. Foram utilizadas as médias dos tratamentos, apresentando o erro padrão, letra diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) a teste de Tukey a 5%. Fonte: A autora. 60

Figura 17. Análise da expressão gênica relativa do gene *CmEXP*, responsável pela codificação das expansinas. Foram utilizadas as médias dos tratamentos, apresentando o erro padrão, letra diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) a teste de Tukey a 5%. Fonte: A autora. 62

Figura 18. Atividade enzimática das poligacturonases (PG) em frutos de melão cv. Eldorado ao longo da maturação. quantidade de ácido galacturônico liberado μmol por minuto. Foram utilizadas as médias dos tratamentos, apresentando o erro padrão, letra diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) a teste de Tukey a 5%. Fonte: A autora. 63

Figura 19. Atividade enzimática das β -d-xylosidases em frutos de melão ‘Eldorado’ aos 15, 25, 35 e 45 D.A.P. A unidade de enzima é medida em quantidade de xilose liberado $\mu\text{mol}/\text{minuto}$ Foram utilizadas as médias dos tratamentos, apresentando o erro padrão, letra diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) a teste de Tukey a 5%. Fonte: A autora. 65

Figura 20. Análise de correlação de Spearman entre o padrão de expressão de genes de parede celular, atividade enzimática e firmeza em frutos de melão amarelo ‘Eldorado’. Os números nos quadrados indicam se as correlações são positivas, muito fracas (0,2), fracas (0,2 a 0,4), moderadas (0,4 a 0,6), fortes (0,6 a 0,8) ou muito fortes (0,8 a 1,0) ou negativas, muito fracas (-0,2), fracas (-0,2 a -0,4), moderadas (-0,4 a -0,6), fortes (-0,6 a -0,8) ou muito fortes (-0,8 a -1,0)..... 68

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Tabela de genes candidatos que atuam na síntese e despolimerização de parede celular em melão amarelo cv. Eldorado. 33
- Tabela 2:** Genes de interesse para o estudo da parede celular de frutos de melão durante o amadurecimento. Sequências forward (5'-3') e reverse (5'-3') de primers, utilizados como iniciadores da transcrição dos genes de transdução de sinal. Contendo o tamanho dos fragmentos em pares de base (amplicons) e a temperatura adequada para anelamento do primer (Tm). 42
- Tabela 3:** Novos primers desenhados para os genes onde os primers anteriormente desenhados não eram adequados. 43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 HIPÓTESES	18
3 OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4 REFERÊNCIAL TEÓRICO	20
4.1 CULTURA DO MELÃO	20
4.2 COMPONENTES DE PAREDE CELULAR	21
4.2.1 CELULOSE	22
4.2.2 HEMICELULOSES	24
4.2.3 PECTINAS	26
4.2.4 EXPANSINAS	29
4.3 DIMINUIÇÃO DE FIRMEZA DURANTE A MATURAÇÃO EM MELÃO	30
4.4 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DE PAREDE CELULAR	33
5 METODOLOGIA	38
5.1 MATERIAL VEGETAL	38
5.2. COR, SÓLIDOS SOLÚVEIS (SS) E pH	40
5.3 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E CONVERSÃO PARA cDNA	41
5.4 DESENHO DOS PRIMERS	42
5.4. RT-qPCR E ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA	43
5.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA	44
5.5.1 ATIVIDADE DA POLIGACTURONASE	44
5.5.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA β - D- XILOSIDASE	45
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6.1 PÓS- COLHEITA	47
6.2 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR	51
6.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE POLIGACTURONASE	63
6.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA β -D-XYLOSIDASE	64
6.5 INTERAÇÕES ENTRE GENES, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E FIRMEZA	66

7 CONCLUSÕES.....	71
REFERENCIAS	72
ANEXO A- PREPARO DE SOLUÇÕES E DE CURVAS PADRÃO PARA ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	81

1 INTRODUÇÃO

O melão (*Cucumis melo* L.) é uma cultura de significativa importância agrícola e econômica. Conforme o último relatório emitido pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2022), o melão ocupou uma área plantada de 27.457 hectares no Brasil, com uma produção total de 699.281 toneladas. Uma característica distintiva do melão é sua alta variabilidade genética, manifestada por fenótipos climáticos e não climáticos, com impactos específicos na maturação dos frutos. O amadurecimento do melão é um fenômeno complexo, influenciado por fatores ambientais, genéticos e bioquímicos. (Saladié *et al.*, 2015; Schemberger *et al.*, 2020)

É de extrema importância entender o processo de amadurecimento, uma vez que influencia positivamente nos atributos como aroma, sabor, concentração de açúcares, cor e textura (Giovannoni, 2004). A textura ou firmeza está correlacionada com uma maior durabilidade pós-colheita do fruto, devido à parede celular. (Bianchi *et al.*, 2016).

A parede celular é composta por camadas, a parede primária, a secundária e lamela média (Wang *et al.*, 2019), composta por polissacarídeos, proteínas e enzimas, unidos por ligações covalentes e não covalentes. As principais funções estruturais da parede celular incluem: resistência mecânica, adesão celular, responsável pela manutenção dos espaços intercelulares através dos quais ocorrem as trocas gasosas; exoesqueleto celular; turgor celular; controle do fluxo de água na transpiração; barreira de difusão, onde as moléculas são filtradas por meio de interações iônicas e hidrofóbicas; e a cutícula, que protege a célula contra o ataque de patógenos (Wu *et al.*, 2014).

A parede celular é composta principalmente por celulose, pectina, hemicelulose, enzimas, além de proteínas estruturais e de defesa. A celulose é um polissacarídeo formado por monômeros de α -D-glicose unidas por ligações β (1 $\rightarrow$ 4), conectadas por pontes de hidrogênio, originam-se as microfibrilas, responsáveis por fortalecer a parede celular (Uenojo; Pastore, 2007). As pectinas são compostas principalmente por ácido galacturônico, tendo a função de fornecer estrutura à parede celular. Quando as pectinases atuam sobre as pectinas, causam o afrouxamento da parede, levando à perda de firmeza durante a maturação. As hemiceluloses são compostas por xilanos, glucanos e mananos, conferindo capacidade de impermeabilização às células, rigidez e resistência mecânica (Taylor-Teeple *et al.*, 2015).

A perda de firmeza em frutos não climatéricos está associada à regulação da expressão gênica de componentes da parede celular, seja pelo perfil transcricional de algumas proteínas envolvidas na biossíntese da parede celular, ou pela expressão de certas enzimas relacionadas à solubilização e degradação de celulose, hemicelulose e pectinas durante os estágios de maturação (Saladié *et al.*, 2015; Schemberger *et al.*, 2020).

Segundo os estudos de transcriptômica do RNA-Seq de melão amarelo cv “Eldorado” de Schemberger *et al.* (2020) em comparação com o estudo de Saladié *et al.* (2015) os genes que atuam síntese e degradação da parede celular são *CmAGL1*, (α -galactosidase), *CmCEL* (Endoglucanase), *CmXGT* (xiloglucano glycosiltransferase), *CmXYL* (Xiloglucano (β -D-xilosidase família de proteínas), *CmXTH1* (Xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase), *CmXTH2* (Xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase) *CmPGL1* (Poligalacturonase-1) *CmPL2* (Poligacturonase-2), *CmPGN* (Poligalacturonase-1 não-catalítica subunidade beta), *CmEXP* (Expansina-tipo A2).

A α -galactosidase (*CmAGL1*) atua no metabolismo dos açúcares, transformando a rafinose e a estaquiose em α -D-galactose, que pode ser direcionada para os polissacarídeos que compõem a parede celular (Saladié, *et al.*, 2015). As endo β -1,4 glucanases (*CmCEL*) são enzimas de degradação que atuam catalisando as ligações glicosídicas da celulose, originando celodextrina

A Xiloglucano glycosiltransferase (*CmXGT*) atuam na biossíntese de xiloglucano, transformando UDP- α -D-glicose em 1,4- β -D-glicosil, a molécula responsável pelo esqueleto de xiloglucano (Gibeaut, 2000). A β -D-xilosidase (*CmXYL*), é uma enzima responsável pela despolimerização das hemiceluloses da parede primária, principalmente do xiloglucano, conhecido por conferir extensibilidade e integridade aos tecidos da parede celular (Saladié *et al.*, 2006). As enzimas Xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase (*CmXTH1* e *CmXTH2*) Atuam realizando transglicosilação, ligando o xiloglucano a outras moléculas de xiloglucano, ou quando exercem a função de hidrólise, clivam as moléculas de xiloglucano (Atkinson *et al.*, 2009; Saladié *et al.*, 2006).

Entre as principais enzimas responsáveis pela solubilização da pectina encontram-se as Poligalacturonases (*CmPG1* e *CmPG2* e *CmPGN*), que desempenham um papel crucial no declínio da firmeza observado durante os estágios finais da maturação. Esse fenômeno ocorre devido à hidrólise da pectina promovida pelas pectinases, resultando na formação de pectato (Lionetti *et al.*, 2010). Por outro lado, as expansinas (*CmEXP*), que são proteínas

remodeladoras da parede celular, são responsáveis pela extensão das células e dependem do pH da parede celular (Saladié *et al.*, 2006; Sampedro; Cosgrove, 2005).

Tendo em vista que a maturação de frutos não climatéricos, como o melão ‘Eldorado’ ocorrem independentemente de picos de etileno e respiração (Schemberger *et al.*, 2020; Stroka *et al.*, 2024), é necessário entender quais são os fatores que afetam padrão expressão de genes relacionados ao metabolismo da parede celular, durante os estádios de maturação de 15 D.A.P (dias após a polinização) frutos verdes, o 25 D.A.P frutos em expansão, 35 D.A.P frutos em expansão e o 45 D.A.P frutos maduros, determinar a atividade enzimáticas de poligacturonases e β -d- xilosidase e perda a firmeza dos frutos durante a maturação.

2 HIPÓTESES

Hipótese 1: A expressão dos genes *CmAGL1*, (α -galactosidase), *CmCEL* (Endoglucanase), *CmXGT* (xiloglucano glycosiltransferase), *CmXYL* (Xiloglucano (β -D-xilosidase família de proteínas), *CmXTH1* (Xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase), *CmXTH2* (Xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase) *CmPGL1* (Poligalacturonase-1) *CmPL2* (Poligalacturonase-2), *CmPGN* (Poligalacturonase-1 não-catalítica subunidade beta), *CmEXP* (Expansina-tipo A2), estão associados à expansão celular no processo de amadurecimento de melão não-climatérico cv. Eldorado.

Hipótese 2: A atividade enzimática de poligalacturonases e β -d-xilosidases estão associadas ao processo de expansão celular durante a maturação amadurecimento do melão cv. Eldorado.

Hipótese 3: A firmeza dos frutos de melão sugere o aumento na expressão de genes de parede celular associados a expansão celular e maturação.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi analisar o padrão de expressão dos genes responsáveis pela biossíntese e degradação da parede celular, bem como a atividade enzimática, em frutos de melão não-climatérico da variedade 'Eldorado', ao longo dos diversos estágios de maturação.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Selecionar possíveis genes da parede celular envolvidos no amadurecimento do melão com bases nos estudos anteriores de transcriptômica realizados de Schemberger *et al.* (2020) e Saladié *et al.* (2015).
- Desenhar primers específicos para os genes de interesse identificados;
- Investigar o padrão de expressão dos genes: *CmAGL1*, *CmCEL*, *CmXGT*, *CmXYL*, *CmXTH1*, *CmXTH2*, *CmPGL1*, *CmPGL2*, *CmPGN* e *CmEXP* em função dos estádios de maturação de 15, 25, 35 e 45 dias após a polinização (D.A.P), em frutos não climatéricos 'Eldorado', utilizando a técnica de RT-qPCR;
- Estabelecer protocolo e determinar a atividade enzimática da poligacturonases e β -d-xilosidase envolvidas no processo de despolimerização da parede celular;
- Estabelecer correlações entre o padrão de expressão dos genes e a atividade enzimática para elucidar as mudanças que ocorrem na parede celular durante o processo de maturação.

Os objetivos delineados neste estudo têm são esclarecer os processos envolvidos na expressão de genes que regulam a parede celular durante o amadurecimento do melão não-climatérico. Fornecendo uma base sólida para estudos futuros sobre a maturação de melões não-climatéricos, permitindo a formulação de novas estratégias pós-colheita, e auxiliando futuros programas de melhoramento genético.

4 REFERÊNCIAL TÉORICO

4.1 CULTURA DO MELÃO

O melão (*Cucumis melo* L.) é um fruto originário da Ásia, composto por aminoácidos, β -caroteno, ácido ascórbico (vitamina C), ácidos graxos e antioxidantes, principalmente polifenóis. É uma cultura altamente adaptada a climas tropicais (Chikh-rouhou *et al.*, 2021; Endl *et al.*, 2018; Paris; Tadmor; Schaffer, 2016; Schemberger *et al.*, 2020; Stroka *et al.*, 2024).

O melão possui relevância econômica global, ocupando uma área plantada de 27.457 hectares no Brasil, com uma produção total de 699.281 toneladas (FAO, 2022). Os principais estados brasileiros produtores são Rio Grande do Norte e Ceará (ABRAFRUTAS, 2024). Na safra de 2023, a cidade de Mossoró-RN destacou-se como a maior produtora de melão do país, alcançando mais de 400 mil toneladas, o que resultou em um impacto econômico significativo de aproximadamente 1 bilhão de reais na região. A maior parte da produção de melão em Mossoró é destinada à exportação, com a União Europeia, China, Chile, Estados Unidos, Argentina, Holanda, Portugal e Dubai sendo os principais consumidores da fruta. Em 2024, os produtores estão finalizando acordos de exportação com a Malásia (ABRAFRUTAS, 2024).

O meloeiro pertence à família das cucurbitáceas e é uma planta monoica, podendo apresentar flores perfeitas (hermafroditas), estaminadas (masculinas) ou pistiladas (femininas). É uma cultura extremamente sensível à temperatura e umidade, sendo ideal uma amplitude térmica entre 20-35 °C. Temperaturas acima de 37 °C resultam na formação de mais flores masculinas e podem causar problemas fisiológicos na maturação (Schaffer; Paris, 2016).

Existe uma ampla diversidade de grupos de melão, totalizando aproximadamente 19 grupos botânicos, que apresentam fenótipos tanto climatéricos quanto não climatéricos. Essa variação nos padrões respiratório na maturação torna o melão um modelo útil para compreender os processos envolvidos na maturação dos frutos e as alterações que ocorrem nesse processo (Ayub *et al.*, 1996; Li; Han; Liu, 2019; Ma *et al.*, 2021; Schemberger *et al.*, 2020; Xin *et al.*, 2019). O melão mais cultivado no Brasil é o amarelo cv. Eldorado, caracterizado como não-climatérico e pertencente ao grupo *Inodorus*. Este fruto apresenta baixa taxa de abscisão, polpa esverdeada e não produz aroma característico devido à ausência

de ésteres voláteis. Em frutos climatéricos a expressão genica é controlada principalmente pelo etileno, hormônio chave da maturação, mas em frutos não climatéricos, não ocorre picos produção de etileno e aumento na taxa respiratória por tanto a maturação é regulada por uma interação de fatores, entre hormônios, principalmente ácido abscísico (ABA), auxinas (AUX), fatores epigenéticos e expressão genica (Schemberger *et al.*, 2020).

Durante a maturação do melão, ocorrem alterações significativas nos atributos sensoriais, como sabor, aroma, cor, brilho e quantidade de açúcares, além de mudanças na textura dos frutos, devido à despolimerização dos constituintes da parede celular (PC) (Stroka *et al.*, 2024). Essas alterações têm um impacto direto na vida útil pós-colheita do melão, destacando a importância de compreender os processos bioquímicos e moleculares que ocorrem durante a maturação para desenvolver estratégias eficazes de manejo pós-colheita e garantir a qualidade dos frutos ao longo do armazenamento e comercialização (Pujol; Garcia-Mas, 2023; Shi *et al.*, 2023).

4.2 COMPONENTES DE PAREDE CELULAR

Parede celular está presente em todas as plantas, cerca de 45% do carbono assimilado através da fotossíntese fica retido na PC (Pottier; Roitsch; Persson, 2023). Aproximadamente 90% da parede celular é composta por açúcares, presente em todas as plantas, desempenhando diversas funções. Entre elas, destacam-se fornecer resistência mecânica, atuar como exoesqueleto, regular a pressão osmótica e controlar a adesão durante a expansão celular. Além disso, a parede celular funciona como uma barreira de difusão, protegendo e prevenindo a ruptura da membrana plasmática, e também atua como uma barreira contra patógenos (Taiz *et al.*, 2017).

Nas células, a parede celular se organiza em camadas da seguinte maneira: a parede primária, caracterizada por possuir paredes mais finas, formadas durante o crescimento celular; as paredes secundárias, que se formam após a estabilização da expansão celular; e a lamela média, composta por pectinas enriquecidas com glicoproteínas (Taiz *et al.*, 2017). A espessura da parede varia dependendo da composição, configuração celular e número de plasmodesmos, que são canais que permitem o transporte passivo de moléculas curtas e o transporte ativo de ácidos nucleicos e conteúdo proteico no citoplasma (Taiz *et al.*, 2017).

A parede celular dos frutos de melão é composta por celulose e hemicelulose, conferindo rigidez, e formando um domínio cristalino estrutural. Esses componentes são envolvidos por uma matriz de pectinas, onde estão presentes proteínas estruturais solúveis e enzimas que atuam na expansão celular durante o crescimento dos frutos (Figura 1) (Kerbaudy, 2008). Durante o processo de amadurecimento, ocorrem alterações bioquímicas, genéticas, físicas e fisiológicas nos componentes da parede, causando o amolecimento do fruto (Paniagua *et al.*, 2014).

A despolimerização da parede celular ocorre devido à ação de enzimas controladas por genes, que promovem o afrouxamento, clivagem e solubilização dos componentes da parede celular (PL). Essas alterações interferem diretamente na colheita e no período pós-colheita dos frutos (Brummell, 2006; Li *et al.*, 2022). Uma compreensão abrangente dos intrincados mecanismos moleculares envolvidos na perda de firmeza devido às alterações dos componentes da parede celular durante o amadurecimento é crucial para aprimorar a qualidade pós-colheita e assegurar a satisfação do consumidor com os frutos de melão.

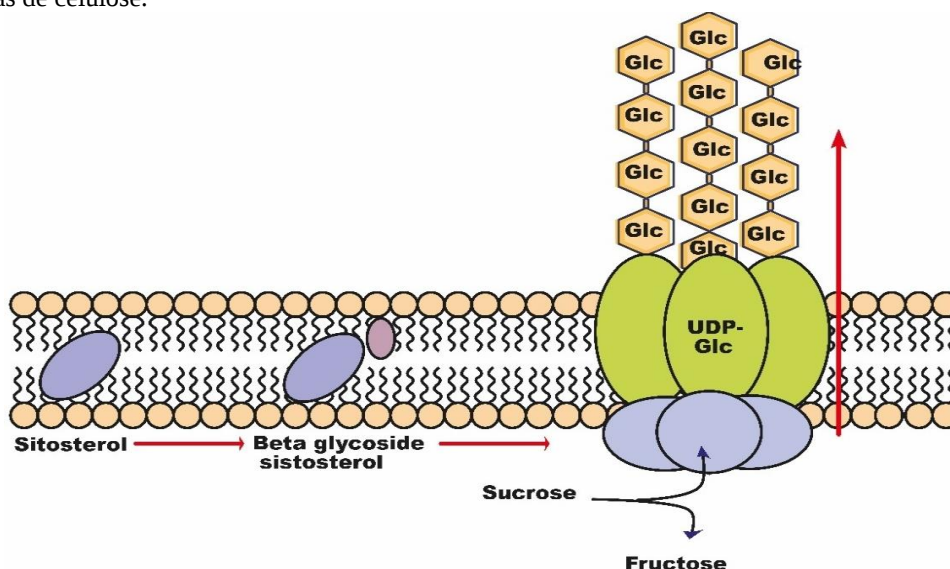
4.2.1 CELULOSE

A celulose é o polissacarídeo mais abundante da PC, é composta por unidades α -D-glicose unidas por ligações β (1 $\rightarrow$ 4). A molécula de celulose forma cadeias antiparalelas unidas por ligações de hidrogênio e formam as microfibrilas (Kerbaudy, 2008). A principal característica da celulose é a sua cristalinidade, na qual as ligações de hidrogênio competem pelos grupos hidroxila da água, reduzindo a quantidade de água na estrutura e resultando em um perfil cristalino pouco hidratado e resistente (Kerbaudy, 2008; Lerouxel *et al.*, 2006; Polko; Kieber, 2019).

Dentro do citosol, a sacarose produzida durante a fotossíntese é catalisada pela sacarose sintase para formar Uridina difosfato glicose (UDP-GLC). No citosol, a sacarose produzida durante a fotossíntese é convertida em Uridina difosfato glicose (UDP-GLC) pela sacarose sintase. Na membrana (Figura 1), ocorre a ligação entre uma molécula de sitosterol e glicose, formando sitosterol- β -glicosídeo. Esse processo é catalisado e direcionado para as rosetas, onde moléculas de UDP-GLC são adicionadas para a formação de celulose (Lerouxel *et al.*, 2006).

Esses complexos terminais, localizados na membrana plasmática e denominados rosetas, são compostos por subunidades proteicas, nas quais a subunidade catalítica da celulose sintase (CESA) forma cadeias de celulose que são unidas por pontes de hidrogênio para formar microfibrilas (Lerouxel *et al.*, 2006).

Figura 1. Formação de Microfibrilas de Celulose. A molécula de sitosterol se liga à glicose, resultando na formação de β -glicosídeo de sitosterol. Este processo é catalisado e direcionado para as rosetas. A sacarose, que se origina do ciclo do açúcar e é catalisada pela sacarose sintase, gera UDP-Glc e frutose. As moléculas de UDP-glicose são posteriormente incorporadas ao complexo conhecido como rosetas, facilitando a formação de microfibrilas de celulose.



Fonte: a autora.

A celulose é caracteristicamente desidratada e, devido às ligações β -(1,4) glicosídicas extremamente fortes entre as glicoses, o gasto energético é elevado para o ataque das enzimas que hidrolisam a celulose (Kerbaux, 2008; Zavyalov *et al.*, 2019). Endocelulases (ENDs) São enzimas que degradam a celulose, catalisando a hidrólise e a clivagem das ligações β -(1,4) glicosídicas, gerando fragmentos de celodextrina (Jara *et al.*, 2019; Kerbaux, 2008; Shrotri; Kobayashi; Fukuoka, 2017).

Durante o metabolismo do açúcar, a trealose fosfato sintase (TPS) pode reagir com UDP-Glc para formar trealose-6-fosfato (T6P) (Stroka; Schemberger; Ayub, 2018). T6P é um açúcar que afeta o crescimento e é um agente sinalizador para a síntese de CW (Pottier; Roitsch; Persson, 2023).

Outro obstáculo à degradação da celulose por enzimas é o revestimento e a ligação de microfibrilas por hemiceluloses (HCs). As cadeias altamente ramificadas da HM, compostas principalmente por grupos galactose, fucose e acetil, aumentam a solubilidade e a vulnerabilidade à hidrólise, diminuindo assim as interações com a celulose (Kerbaudy, 2008).

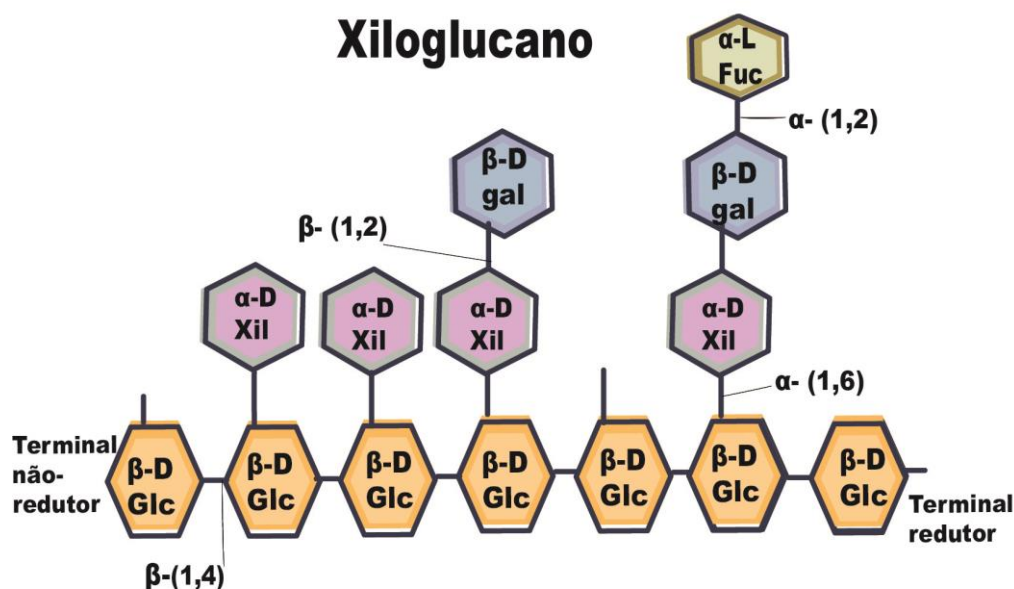
Elhassan e Abu-goukh, (2016) analisaram a atividade da enzima celulase durante o amadurecimento de três cultivares comerciais de melão almiscarado, 'Galeeb', 'Screen' e 'Green Star'. Eles observaram uma correlação muito alta ($r^2 = 0,981$) entre a perda progressiva de firmeza e o aumento da atividade da celulase durante esse período. Isso ocorre porque a celulase é capaz de clivar as ligações β -(1,4) glicosídicas, resultando na desestruturação da parede celular. Além disso, os pesquisadores demonstraram que a perda de firmeza nos frutos é iniciada pela ação combinada de enzimas celulolíticas e pectolíticas, que degradam os componentes da parede celular.

4.2.2 HEMICELULOSES

As hemiceluloses (HC) atuam como revestimentos e estão presentes nos espaços entre as microfibrilas, formando uma rede de suporte que protege a celulose do ataque enzimático e da hidrólise (Taiz *et al.*, 2017). O xiloglucano (XG) é o HC mais abundante nas plantas. Este componente está presente na parede primária, lamela média e parede secundária (Hayashi e Kaida, 2011). A função do XG é revestir e ligar microfibrilas de celulose por meio de pontes de hidrogênio, formando uma rede para suportar a tensão causada durante o turgor e a expansão celular (Kerbaudy, 2008). O XG é mais solúvel em água que a celulose, é um polissacarídeo suscetível ao ataque enzimático e pode sofrer remodelação durante a extensão celular, controlando o crescimento (Pauly; Keegstra, 2016; Zavyalov *et al.*, 2019).

A composição do xiloglucano consiste em esqueletos de D-glicosil conectados entre si por ligações β -(1-4), que podem se ligar à xilose por ligações α -(1-6). A xilose, por sua vez, pode estar associada à D-galactose via ligações β -(1-2), e a galactose pode unir-se à L-fucose por ligações α -(1-6). Os resíduos β -D-Glc (1 $\rightarrow$ 4) podem ser substituídos por unidades α -D-Xilose, ligadas na posição O-6. As cadeias α -D-Xil podem ser substituídas em O-2 por β -D-Galactose (1 $\rightarrow$ 2), α -L-Arabinose ou α -L-Fucose (Figura 2) (Kerbaudy, 2008; Rashmi; Siddalingamurthy, 2018; Sun; Tadmor; Li, 2020; Zavyalov *et al.*, 2019).

Figura 2. Estrutura dos xiloglucanos composta por D- glicosil conectados entre si por ligações β -(1-4), podem se ligar a xilose por ligações α - (1-6), a xilose pode estar associada a d- galactose via ligações β -(1-2), e a galactose pode unir-se a L- fucose por ligações α - (1-6), o terminal redutor é onde outras moléculas de xiloglucano podem se ligar via transglicosilise.



Fonte: a autora em adaptação de Gavande; Goyal; Fontes (2023).

A hidrólise do xiloglucano ocorre pela ação de enzimas como xiloglucanases, endoglucanases, β -D-glucosidase, β -D-galactosidase, α -D-xilosidase e α -L-fucosidase, que catalisam a quebra das ligações de glicose, xilose, fucose e galactose (Zavyalov *et al.*, 2019). O aumento no número de cadeias ramificadas diminui a afinidade do xiloglucano pela celulose, levando ao afrouxamento e ao comprometimento da tensão e da rede formada nas microfibrilas; assim, esse processo facilita o acesso das celulasas, que hidrolisam a celulose e comprometem a estrutura da parede (Yu *et al.*, 2022).

A enzima xiloglucano glicosiltransferase -4 atua na biossíntese de xiloglucano transformando $\text{UDP-}\alpha\text{-D-glicose} + 1,4\text{-}\beta\text{-D-glicosil} \rightarrow 1,4\text{-}\beta\text{-D-glicosil} + \text{UDP}$, é muito semelhante as glicosiltransferases que atuam na formação da celulose (Gibeau, 2000). A UDP-xilose é formada como resultado da ação das enzimas UDP-xilose sintase e pode ser produzida no citosol, onde as moléculas são direcionadas para o complexo de Golgi, participando diretamente da biossíntese de xilana e xiloglucano (Pauly; Keegstra, 2016; Zabolina *et al.*, 2012). As moléculas de xiloglucano são acondicionadas em vesículas

secretoras e gradualmente liberadas na membrana plasmática, onde são direcionadas para a matriz extracelular (Pauly; Keegstra, 2016; Zabortina *et al.*, 2012).

As enzimas xiloglucano endotransglucosilase hidrolases (XTHs) são responsáveis por catalisar a transglicosilação do xiloglucano, atuando por meio de mecanismos secundários para clivar e conectar outras moléculas de xiloglucano ou hidrolisar as ligações β -(1-4) (Ishida; Yokoyama, 2022). As enzimas XTHs não apenas realizam transglicosilação, mas também podem hidrolisar as ligações β -(1,2) glicosídicas do xiloglucano, promovendo expansão, quebra e reparo da parede (Li *et al.*, 2023). A expansão celular não é realizada apenas pelas XTHs; pelo contrário, desempenham papéis vitais neste processo, especialmente em resposta a tensões bióticas e abióticas (Ishida; Yokoyama, 2022).

Existem dois outros polímeros hemicelulósicos, semelhantes ao xiloglucano: os Glucuronoarabinoxilanos (GAX) e os Glucomananos (GMN). Os Glucuronoarabinoxilanos (GAXs) pertencem ao grupo dos xilanos e são polímeros ácidos compostos de xilose ligada por β -(1,4) entre si, com galactose ligada por ligações α -(1,6) e arabinose ligada por α -(1,3). Nas eudicotiledóneas, a xilana ácida predominante são as glucuronoxilanas, enquanto nas monocotiledóneas, glucuronoarabinoxilanas são as xilanas predominantes (Kerbaudy, 2008; Peng *et al.*, 2022).

Glucomananos (GMNs) possuem uma cadeia principal composta por glicose e manose ligadas por ligações β -(1,4) e podem apresentar ligações acetil nas posições 4 e 6 da glicose. Por fim, mananas (MNs) puras são compostas de manose ligada por ligações β -(1,4) e possuem alta resistência física. Essas formas coexistem nas plantas de acordo com a espécie e geralmente estão presentes nas paredes secundárias (Anderson, 2015; Kerbaudy, 2008).

4.2.3 PECTINAS

As pectinas constituem aproximadamente 35% da parede primária em dicotiledóneas e desempenham funções na estruturação da parede celular, na expansão celular, na sinalização de vias metabólicas e na porosidade da parede. Na indústria, são utilizadas como agentes gelificantes e estabilizantes (Mohnen, 2008). A função das pectinas é envolver a rede tridimensional formada por celulose e hemicelulose para criar uma matriz que regula a porosidade, a hidratação e a adesão celular (Anderson, 2015; Yang *et al.*, 2018). Durante o processo de amadurecimento dos frutos, as propriedades estruturais e químicas das pectinas

sofrem solubilização e degradação devido à ação enzimática (Zdunek; Pieczywek; Cybulska, 2021).

As pectinas são um grupo complexo de polissacarídeos sintetizados no complexo de Golgi. Elas são produzidas por glicosiltransferases, responsáveis pela transferência de resíduos glicosil para oligossacarídeos ou polissacarídeos receptores (Mohnen, 2008). Os resíduos glicosil podem ser metil esterificados por enzimas chamadas metiltransferases e acetiltransferases, utilizando S-adenosilmetionina (SAM) e acetil coenzima A. Esses resíduos são então transportados para o lúmen do complexo de Golgi. (Mohnen, 2008). De acordo com sua estrutura química, as pectinas são divididas principalmente em homogalacturano (HGs), ramnogalacturonano I (RGIs) e ramnogalacturonano II (RGIIs) (Zdunek; Pieczywek; Cybulska, 2021).

HG é o domínio linear que corresponde a aproximadamente 65% das pectinas e é caracterizado por ácido galacturônico com ligações α -(1,4) parcialmente metiladas no carbono 6 e acetiladas nos carbonos 2 e 3 (Mohnen, 2008). Resíduos de ácido galacturônico não esterificado podem se ligar a íons de Ca^{2+} e Mg^{2+} , que são nutrientes pouco móveis dentro da planta, formando os chamados complexos "caixa de ovo". Consequentemente, o gel resultante aumenta a rigidez da parede celular (Mohnen, 2008).

A degradação de homogalacturonano depende do grau de desmetilação promovido pelas enzimas pectinametilesterases (PMEs), responsáveis por removerem os grupos metil do esqueleto de ácido poligacturônico. O grau de esterificação metílica do HG diminui durante o amadurecimento dos frutos devido à quebra do HG pelas enzimas PMEs (Mohnen, 2008).

RG I é um domínio péctico composto por uma espinha dorsal do dissacarídeo repetitivo ácido α -D-galacturônico (1,2) α -L-ramnose, no qual os resíduos de ramnose possuem cadeias laterais de arabinanos, galactanos e/ou arabinogalactanos. (Barnes *et al.*, 2021). O RGII, é derivado da estrutura HG, composta de ácido D-galacturônico (Begum e Fry, 2023), suas ramificações são mais complexas devido à esterificação com metila e à acetilação de resíduos glicosídicos, podendo se ligar à apiose, metilfucose e metilxilose. (Barnes *et al.*, 2021; Zhai *et al.*, 2021).

Pectinas são degradadas por enzimas pectinametilesterases (PMEs), poligalacturonases (PGs), pectato liases (PLs) e β -galactosidase (β -GAL), que geralmente respondem a hormônios vegetais e fatores ambientais, para formar oligossacarídeos pécticos (Mohnen, 2008; Kohli *et al.*, 2015;).

As enzimas PME desesterificam as cadeias de HG no carbono 6 e são acionadas pela expressão de genes e seus fatores de transcrição específicos, catalisando vários ciclos de reação antes da dissociação do complexo enzima e substrato (Kohli *et al.*, 2015). A ação dos PMEs promove a desmetilação dos polímeros pécticos, liberando ácido galacturônico carboxilado. Isso favorece a quelação com Ca^{2+} e forma redes que estabilizam o gel de pectina (caixa de ovo), aumentando a firmeza em frutas (Kerbaudy, 2008). As PMEs inibem a desmetilação do HG, mantendo a integridade da parede e protege consequentemente a planta do ataque de patógenos e aumenta a tolerância aos estresses abióticos (Wormit; Usadel, 2018).

Uma família multigênica coordena as enzimas PG, e a expressão desses genes em frutas correlaciona-se com a degradação da pectina e a modulação da expansão, resultando na redução da rigidez da parede celular (Yang *et al.*, 2018). As PGs são divididas em endopoligalacturonases (Endo-PG), exopoligalacturonases (Exo-PG) e Ramnopoligalacturonases (Ramno-PG). As Exo-PG hidrolisam as ligações glicosídicas do ácido α -(1,4) -D-galacturônico, clivam o HG e reduzem a adesão celular (Yang *et al.*, 2018; Zdunek; Pieczywek; Cybulska, 2021). As endo-PGs ligam-se internamente em cadeias de ácido galacturônico em qualquer direção da cadeia, quebram polissacarídeos e formam oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização, enquanto os exo-PGs possuem um sítio ativo específico e se ligam às extremidades não redutoras (Yang *et al.*, 2018). Os Ramno-PGs atuam na hidrólise das ligações do ácido galacturônico com a ramnose e são mais ativos no RGI (Yang *et al.*, 2018).

As pectato liases (PLs) são enzimas que catalisam a clivagem de ligações β -(1,4) entre resíduos de galacturonosila, além de formar oligossacarídeos insaturados, tendo o HG como principal substrato. Elas atuam de forma semelhante às PGs, clivando a pectina (Shi *et al.*, 2023; Uluisik; Seymour, 2020).

O β -GAL uma enzima glicosil hidrolase, desempenha um papel crucial no amolecimento de frutas durante o amadurecimento, principalmente associada à remodelação da parede celular (Pan *et al.*, 2022). Ela atua clivando resíduos β -D-galactosil das extremidades não redutoras de pectina e polímeros de hemicelulose, como rhamnogalacturonan-I (RG-I), bem como cadeias laterais de galactano, xiloglucano, galactolipídios e glicoproteínas. Essa ação enzimática aumenta a porosidade da parede celular, facilitando o acesso de outras enzimas degradadoras da parede celular, acelerando assim o

processo de perda de firmeza da fruta (Pan *et al.*, 2022). A expressão do gene CmGal1 em melão resultou na perda de firmeza. Supapvanich e Tucker (2013) observaram baixa atividade de PG e alta atividade de duas isoformas de β -galactosidases, β -Gal I e β -Gal II, durante o armazenamento de frutas climatéricas, o que foi relacionado à perda de firmeza em melões (Supapvanich; Tucker, 2013). Porém no RNA-Seq obtido por Schemberger *et al.* (2020) e comparado com o de Saladié *et al.* (2015) não foram observados expressão de genes de β -GAL, PMEs e PLs.

4.2.4 EXPANSINAS

A expansão celular é coordenada por proteínas chamadas expansinas (EXPs), que atuam diretamente no afrouxamento da parede celular. A atividade das EXPs depende de um pH ácido, e a expressão do gene *EXP* induz o relaxamento da parede celular ao quebrar as ligações de hidrogênio entre o xiloglucano e as celulosas. Essas proteínas podem ser reguladas transcricionalmente por estresses abióticos e pela presença de hormônios como etileno, ABA e AUX (Cosgrove, 2022).

As expansinas foram classificadas em dois grupos distintos: α -expansinas e β -expansinas. Essas expansinas exibem diferentes propriedades de ligação, com as α -expansinas se ligando ao xiloglucano (XG) e as β -expansinas se ligando ao glucuronoarabinosilano (GAX). A atividade dessas expansinas é regulada pela atividade da enzima H⁺-ATPase atuante na membrana plasmática das células vegetais (Valenzuela-Riffo; Morales-quintana, 2019).

A enzima H⁺-ATPase desempenha um papel crucial na regulação do pH da parede celular, idealmente mantido entre 4,5 e 5,5. Esse equilíbrio é alcançado pelo bombeamento de prótons, influenciando a acidez do ambiente da parede celular. A manutenção desse pH ideal contribui para o relaxamento celular, destacando as complexas interações entre as expansinas, a H⁺-ATPase e o pH da parede celular dentro do contexto da fisiologia celular vegetal (Valenzuela-Riffo; Morales-quintana, 2019).

A sinalização da síntese da parede celular também está associada à expressão de duas proteínas cinases: a rapamicina quinase (TOR), que responde à presença de açúcar e aos sinais de crescimento, e a quinase não fermentativa 1 de sacarose (SnRK1), que desempenha um papel na regulação negativa dos açúcares na síntese da parede celular (Pottier; Roitsch;

Persson, 2023). A quinase TOR desempenha um papel na sinalização da expansão celular, induzindo a atividade das expansinas (EXPs), regulando o crescimento e inibindo a síntese de etileno. Além disso, ela estimula tanto a transcrição quanto a tradução do RNA mensageiro (mRNA) (Pottier; Roitsch; Persson, 2023).

4.3 DIMINUIÇÃO DE FIRMEZA DURANTE A MATURAÇÃO EM MELÃO

A firmeza, juntamente com a cor, aroma, sabor e teor de açúcar, é um fator crucial na avaliação da qualidade do melão pelo consumidor e é influenciada durante o processo de maturação (Li; Han; Liu, 2019; Pontes *et al.*, 2021; Pujol; Garcia-Mas, 2023). O processo de amadurecimento é complexo e influenciado por fatores ambientais, genéticos e bioquímicos, tornando o melão um excelente modelo para estudos de amadurecimento (Ayub *et al.*, 1996; Pech; Bouzayen; Latché, 2008; Pujol; Garcia-Mas, 2023; Saladié *et al.*, 2015; Schemberger *et al.*, 2020).

Os melões apresentam dois padrões principais de maturação: frutos climatéricos e frutos não climatéricos (Ayub *et al.*, 1996). Nos frutos de melão climatéricos, o amadurecimento é impulsionado por um aumento acentuado na síntese de etileno, que coincide com um pico na taxa. Um exemplo ilustrativo é o melão (*Cucumis melo*) var. Cantalupensis, caracterizado por polpa alaranjada, textura macia e aroma pronunciado, que deve ser colhido antes de atingir a maturidade completa. Isso ocorre porque o melão continua a amadurecer após a colheita e, portanto, deve ser consumido rapidamente (Ayub *et al.*, 1996; Los *et al.*, 2024).

Esses genes e seus padrões de amadurecimento influenciam diretamente a redução da firmeza devido a mudanças coordenadas durante o processo de maturação, reguladas por interações entre fatores de transcrição (TFs), fatores epigenéticos e elementos ambientais. Esses TFs são proteínas que atuam como ativadores ou inibidores da expressão de genes associados a diversos aspectos da composição da parede celular, como celulose, hemicelulose e síntese de pectina (Shi *et al.*, 2023). Eles também controlam enzimas envolvidas na clivagem, hidrólise, transglicosilação e manipulação de açúcares neutros da parede, resultando coletivamente em diminuição de firmeza nos frutos (Shi *et al.*, 2023). Notavelmente, alguns genes respondem a sinais hormonais, assim como a estresses abióticos e bióticos, causando variações na expressão gênica e nas atividades enzimáticas. (Shi *et al.*, 2023).

Em frutos climatéricos, a metilação do DNA e das histonas influencia a expressão gênica em regiões promotoras do gene do etileno, regulando negativamente a expressão de expansinas (EXP), o que resulta no afrouxamento da parede celular (Li *et al.*, 2022). Por outro lado, em frutas não climatéricas, a metilação do DNA afeta as regiões promotoras do ácido abscísico (ABA), regulando positivamente a expressão da enzima xiloglucano glicosiltransferase (XGT) e regiões responsáveis pela expressão de AUX, que regulam negativamente EXP e XGT (Li *et al.*, 2022).

O etileno exerce um forte impacto na expressão de vários genes, durante o processo de amadurecimento, incluindo os genes que codificam as poligalacturonases. No entanto, é importante destacar que existem vias de sinalização independentes do etileno que também estão envolvidas nesse processo (Pech; Bouzayen; Latché, 2008). Ayub *et al.* (1996) investigaram melões da variedade Charentais transgênicos, nos quais o gene antisense responsável por codificar a ACC oxidase, uma enzima chave na biossíntese do etileno, foi introduzido. Nos frutos transgênicos, foi observada uma redução significativa na produção de etileno, retardando o processo natural de amadurecimento. No entanto, esse efeito foi potencialmente reversível por meio da aplicação de etileno exógeno.

Nishiyama *et al.*, (2007) também investigaram linhagens transgênicas da variedade de melão 'Charentais' com supressão da expressão do gene da 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase (ACO). Em frutos não tratados, foram observados picos de etileno aos 43 dias após a polinização (D.A.P), momento em que ocorreu o amadurecimento completo dos frutos. Esses frutos exibiam pectinas de baixo peso molecular e eram excessivamente macios. Por outro lado, nos frutos transgênicos com supressão de ACO, não foram observados picos de etileno, houve um atraso, que ocorreu aos 46 D.A.P, apresentou frutos mais firmes que os não tratados, com pectinas de maior peso molecular, confirmando a dependência das enzimas degradadoras de pectina em relação ao etileno.

Nishiyama *et al.* (2007) observaram a expressão de duas isoformas de PG (*CmPG1*, *CmPG3*) em frutos de melão 'Charentais', relataram que a expressão desses genes foi proporcional ao pico de etileno, ocorrendo entre 46 e 50 D.A.P. Outros genes também relevantes e dependentes de etileno foram *CmXTH1*, *CmXTH3*, *CmEXP* e *CmGAL*, foram observados em melões 'Charentais' altamente expressos aos 46 D.A.P (Nishiyama *et al.*, 2007). Em frutos transgênicos, o aumento da expressão foi observado apenas quando os frutos

transgênicos foram tratados com etileno exógeno, demonstrando que são dependentes de etileno durante o amadurecimento. (Nishiyama *et al.*, 2007).

Dos-Santos *et al.* (2011) investigaram genes candidatos para loci de características quantitativas (QTLs) nos melões não climatéricos "Piel de Sapo" (PS) e no melão coreano PI 161375 'Shongwan Charmi' (SC), bem como em linhagens isogênicas (NILs) SC₃-5 -1 e SC₇-2, e observaram 5 QTLs envolvidos na perda de firmeza. Identificaram genes *CmACS5* e *CmEIL4*, sensíveis à síntese e sinalização de etileno, fortemente associados à perda de firmeza, uma vez que o etileno é sinalizador chave da maturação. A ação do etileno resulta em baixos níveis de ácido urônico devido ao aumento da atividade do PG, promovendo a perda de firmeza associada à degradação da pectina (Dos-Santos *et al.*, 2011).

Frutos não-climatéricos não possuem picos na taxa respiratória e nem aumento de etileno, dependendo exclusivamente de outros fatores que regulam a expressão genética diferencial, como a ação hormonal, promovida pelo ácido abscísico (ABA) e auxina (AUX), fatores epigenéticos e de transcrição, para controle de amadurecimento (Abuqamar *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2012; Cosgrove, 2000). Exemplos incluem melões não-climatéricos do grupo *Inodorus*, requerem maturação completa antes da colheita e apresentam uma vida útil pós-colheita prolongada (Stroka *et al.*, 2024).

Crucialmente, as auxinas e as giberelinas desempenham papéis fundamentais na regulação da divisão e expansão celular (Catalá, Rose e Bennett, 2000). A aplicação de auxinas exógenas, podem reduzir o acúmulo de ABA e suprimir a expressão das enzimas PME, PG e PL, atrasando o processo de amadurecimento (Jia *et al.*, 2017; Peng *et al.*, 2022). O aumento do ABA promove a diminuição da produção de etileno, regulando negativamente a expressão de poligalacturonases (PGs), pectato liase (PL) e expansina (EXP). Este fenômeno resulta no atraso do amaciamento e aumenta a vida útil dos frutos (Mattus-Araya *et al.*, 2022).

4.4 GENES ASSOCIADOS À ENZIMAS, DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DE PAREDE CELULAR

Em uma busca minuciosa para identificar genes candidatos que atuam no metabolismo da parede celular e foram diferencialmente expressos em melão não climatérico (Tabela 1) cv. Eldorado, foram usados os estudos transcriptômicos de Saladiê *et al.* (2015) e Schemberger *et al.* (2020). A expressão diferencial do gene *CmAGL1* (α -galactosidase) desempenham um papel crucial no ciclo do açúcar, hidrolisando a rafinose e a estaquiose em D-galactose (Figura 3). Esta D-galactose pode então ser desviada do metabolismo da sacarose e direcionada para a síntese de xiloglucano e pectinas da parede celular (Mohnen, 2008; Pontes *et al.*, 2021).

No ciclo da sacarose, a D-galactose é convertida em galactose-1-fosfato (GAL1P) pelas galactoquinases, seguida pela ação da uridina difosfato galactose pirofosfatase, que produz uridina difosfato galactose (UDP-GAL). A UDP-GAL é então transformada em UDP-GLC pela UDPglicose-4-epimerase. O UDP-GLC pode ser direcionado para o metabolismo do açúcar, com uma fração convertendo-se em UDP-glicose (UDPglc) para a formação de sacarose (Schemberger *et al.*, 2020). Outra fração pode se ligar ao sitosterol, formando sitosterol- β -glicosídeo, que é transportado para as rosetas. Lá, as unidades CESA utilizam o UDP-GLC para sintetizar cadeias de celulose, que são unidas por pontes de hidrogênio para formar as microfibrilas. (Lerouxel *et al.*, 2006). Segundos os estudos de Schemberger *et al.* (2020) o gene *CmAGL1* foi mais expresso em frutos verdes. O gene *CmCEL* responsável pelas expressão das enzimas endoglucanases promovem o afrouxamento da parede celular e amaciamento de frutos durante a maturação (Jara *et al.*, 2019).

Tabela 1: Tabela de genes candidatos que atuam na síntese e despolimerização de parede celular em melão amarelo cv. Eldorado.

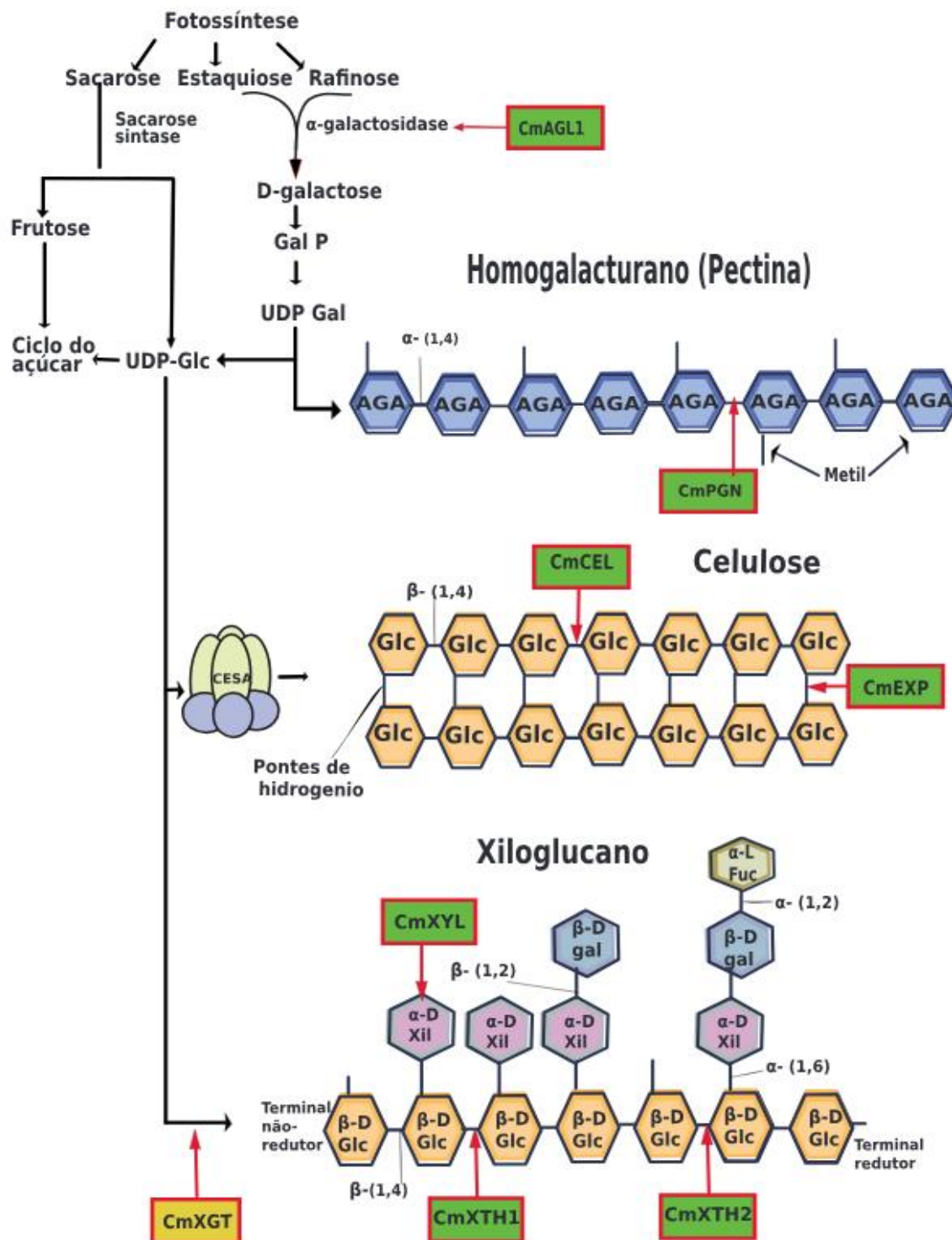
Melanomics	Nome do gene	Função	log2fold
MELO3C010698.2	<i>CmAGL1</i>	α -galactosidase	2.185301547
MELO3C014430	<i>CmCEL</i>	Endoglucanase	1.544350137
MELO3C016842	<i>CmXGT</i>	Xiloglucano glicosiltransferase 4	-0.840302809
MELO3C021281	<i>CmXYL</i>	β -D-xilosidase família de proteínas	2.785799228
MELO3C023556	<i>CmXTH1</i>	Xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase	2.894877656
MELO3C017478	<i>CmXTH2</i>	Xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase	1.919644889

MELO3C010662	<i>CmPGN</i>	Poligalacturonase-1 não-catalítica subunidade β	-0.763561461
MELO3C016494	<i>Cm PGL1</i>	Poligalacturonase- 1	2.209709970
MELO3C023556	<i>CmPGLC2</i>	Poligalacturonase- 2	-2.388986389
MELO3C013289	<i>CmEXP</i>	Expansina-tipo A2	2.564505383

*log2fold > 0 = genes mais expressos em fruto verde; log2fold < 0 = genes mais expressos em fruto maduro.

Fonte: a autora.

Figura 3. Atuação dos genes candidatos que atuam despolimerizando componentes da parede celular. *CmAGL1*: α -galactosidase; *CmCEL*: Endoglucanase; *CmXGT*: Xiloglucano glycosiltransferase 4; *CmXYL*: Beta-D-xilosidase família proteica; *CmXTH1*: Xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase; *CmXTH2*: Xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase; *CmPGN*: Poligalacturonase-1 não- catalítica subunidade beta; *CmEXP*: Expansina tipo 2 GalP galactose-1- fosfato; UDP gal uracil difosfato galctose; UDPglc: glicose difosfato de uracila



Fonte: A autora.

Segundo Schemberger *et al.*, (2020) observaram a expressão diferencial do gene *CmCEL* ocorreu nos estádios iniciais da maturação em frutos não- climatéricos ‘Amarelo’, promovendo amaciamento da polpa (Tabela 1). As endoglucanases (*CmCEL*), também

conhecidas como celulasas, são enzimas que participam da degradação da celulose, catalisando a hidrólise e clivagem das ligações β -(1,4) glicosídicas presentes na celulose, resultando na produção de fragmentos menores conhecidos como celodextrinas (Figura3). Esses fragmentos menores ficam mais facilmente expostos à ação de outras enzimas, como as glicosiltransferases, facilitando assim a subsequente modificação ou degradação da celulose. (Jara *et al.*, 2019; Shrotri; Kobayashi; Fukuoka, 2017).

A xiloglucano glicosiltransferase-4 (*CmXGT*) atua na biossíntese do xiloglucano, convertendo UDP- α -D-glicose + 1,4- β -D-glicosil em 1,4- β -D-glicosil + UDP, apresentando semelhanças com as glicosiltransferases envolvidas na formação da celulose (Figura 3) (Gibeaut, 2000). Estudos de RNA-seq realizados em melões amarelos não climatéricos *Cucumis melo* var. *Inodorus* durante o amadurecimento revelaram que uma isoforma do gene *CmXGT* (xiloglucano glicosiltransferase 4) (MELO3C016842) foi diferencialmente expressa em frutos maduros (Schemberger *et al.*, 2020).

O gene *CmXYL* é responsável pela síntese das proteínas que compõem as enzimas β -D-xilosidase, as quais catalisam a hidrólise da β -D-xilose (Figura3) (Falara *et al.*, 2011). A xilose é o principal componente das hemiceluloses, que desempenham um papel crucial na expansão celular, conferindo extensibilidade e integridade aos tecidos da parede celular (Falara *et al.*, 2011). No estudo de transcriptoma realizado por Schemberger *et al.* (2015), observou-se que o gene *CmXYL* foi mais expresso em frutos verdes.

O xiloglucano desempenha um papel crucial na coesão das microfibrilas de celulose na parede celular. As enzimas XTH (xiloglucano endotransglucosilase/hidrolases) são responsáveis pelo afrouxamento da parede celular, alterando a distância entre as fibrilas de celulose (Figura3) (Ishida; Yokoyama, 2022). Além disso, foi relatado que diferentes isoformas de XTH conferem à planta maior resistência a temperaturas baixas, tolerância ao estresse salino e a íons de alumínio, além de proporcionar maior resistência a insetos da família dos afídeos (Ishida; Yokoyama, 2022). Nos frutos não- climatéricos de melão, *Cucumis melo*, var. *Inodorus*, as isoformas correspondentes da enzima xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase são os genes *CmXTH1* (MELO3C023556) e *CmXTH2* (MELO3C017478) e segundo os estudos conduzidos por Saladié *et al.*, (2015) e Schemberger *et al.* (2020) são mais altamente expressas em frutos jovens durante o amadurecimento.

O processo de amadurecimento, caracterizado pelo declínio na firmeza, é resultado da hidrólise da pectina pelas pectinases, que gera pectato como produto (Figura 3). As

poligalacturonases (CmPGN) são responsáveis pela degradação do homogalacturano, um componente da pectina que confere plasticidade e adesão celular. (Lionetti *et al.*, 2010).

A subunidade não catalítica da poligalacturonase isoenzima 1 (PGN) converte a PG2 em sua forma monomérica, onde uma única unidade de proteína forma uma enzima. A forma heterodimérica catalítica PG1 é então formada pela associação da PG2 com a PGN, resultando em uma enzima funcional composta por diferentes unidades de proteína (Moore; Bennett, 1994). Enquanto a PG2 consiste em um único polipeptídeo catalítico, a PG1 é constituída pela associação da PG2 com a PGN, sendo funcional a partir dessa interação entre as poligalacturonases (Watson; Zheng; DellaPenna, 1994). A Poligacturonase-1 *CmPGL1* foi mais expressa em frutos verdes, enquanto a poligacturonase-2 *CmPGL2* e a isoforma poligacturonase -1 não catalítica subunidade beta (*CmPGN*) foram mais expressa em frutos maduros em melões não-climatéricos (Schemberger *et al.*, 2020).

Em estudos sobre genes candidatos para locos de características quantitativas relacionadas à firmeza (QTLs) em uma variedade não climatérica de melão, PI161375, e observaram a presença de três isoformas de poligalacturonases (*CmPG1*, *CmPG2* e *CmPG4*) (Moreno *et al.*, 2008)

Em frutos não-climatéricos, a presença de etileno é reduzida, o que impacta diretamente a expressão dos genes PL. Em um estudo de RNA-seq realizado em melões não-climatéricos, Schemberger *et al.* (2020) não observaram diferenças na expressão dos genes PLs ou PMEs ao longo do processo de amadurecimento, e os genes PG foram expressos em níveis muito baixos.

As expansinas (*CmEXP*), embora não possuam atividade enzimática, são caracterizadas como proteínas que induzem a extensão celular e são fundamentais no crescimento de frutos. Elas atuam rompendo as ligações de hidrogênio entre as microfibrilas (Figura3) e o xiloglucano, promovendo o amaciamento dos frutos (Belfield *et al.*, 2005).

A atividade das expansinas é determinada pela H⁺-ATPase na membrana plasmática, que bombeia prótons, ajustando o pH da parede celular entre 4,5 e 5,5 e induzindo o relaxamento celular. Além disso, a atividade das expansinas pode ser regulada por hormônios como ácido abscísico (ABA), auxina (AUX), brassinosteroides (BLs), giberelinas (GAs), citocininas (CKs), ácido salicílico (SA), jasmonato (JA) e etileno (ET) (Cosgrove, 2000; Chen *et al.*, 2012; Abuqamar *et al.*, 2013).

Em um estudo conduzido por Schemberger *et al.* (2015), observou-se que o gene *CmEXP* estava mais expresso em frutos verdes. A expressão da isoforma A2 da expansina foi detectada em frutos de melão, tanto climatéricos quanto não-climatéricos, em estágios imaturos, principalmente durante a fase de expansão celular do fruto (Saladié *et al.*, 2015; Schemberger *et al.*, 2020).

5. METODOLOGIA

5.1 MATERIAL VEGETAL

O genótipo selecionado para este estudo foi o melão da cultivar ‘Eldorado’, pertencente ao grupo *Inodorus*, caracterizada por produzir frutos não climatéricos, de cor amarela e polpa verde clara. Foram utilizados vinte vasos com capacidade de 15 litros, nos quais foram semeadas aproximadamente quatro a cinco sementes por vaso, em 20 de outubro de 2021.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação localizada na Universidade Estadual de Ponta Grossa (Ponta Grossa, PR). Foram conduzidas verticalmente utilizando-se fitilho (Figura 4). Desbrotas de ramos secundários foram realizadas até o sexto nó, e podas de manutenção foram feitas para promover o desenvolvimento de frutos saudáveis e evitar competição entre eles. A adubação de base foi feita com NPK na proporção 4-14-8. Além disso, foram realizados controles de oídio e mosca-branca.

Figura 4. Plantas de meloeiro em casa de vegetação com 27 dias após o plantio, conduzido com fitilho vertical.



Fonte: A autora.

As flores monoicas do melão foram polinizadas manualmente de forma cruzada, sempre pela manhã, para garantir a obtenção de pólen viável. Cada planta foi permitida a

desenvolver apenas um fruto viável. Os dias após a polinização (D.A.P) foram registrados (Figura 5) e a colheita dos frutos ocorreu em quatro estágios de maturação.

Conforme ilustrado na Figura 5, o primeiro estágio de colheita correspondeu aos 15 D.A.P, quando os frutos ainda estavam imaturos. O segundo estágio de colheita ocorreu aos 25 D.A.P, momento em que os frutos estavam em plena expansão. O terceiro estágio correspondeu aos frutos plenamente expandidos aos 35 D.A.P, enquanto o último estágio envolveu a colheita de frutos maduros, realizada aos 45 D.A.P. Após a colheita, os frutos foram medidos quanto ao comprimento horizontal utilizando-se um paquímetro digital, pesados, cortados e congelados com nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenados em um ultrafreezer (80°C).

Figura 5. Frutos de melão “Eldorado”, durante os estádios de maturação baseados nos dias após a polinização (D.A.P) cultivar Eldorado.



Fonte: A autora.

5.2. COR, SÓLIDOS SOLÚVEIS (SS) E pH

Foram realizadas análises de cor da casca e polpa dos diferentes estágios de maturação utilizando um colorímetro digital Minolta. As coordenadas avaliadas incluíram L^* (luminosidade), a^* (indicativo de tons de verde e vermelho), b^* (indicativo de tons de azul e amarelo) e o ângulo Hue, calculado utilizando as equações $h^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*)$ quando $a^* > 0$ e $b^* > 0$, e $h^\circ = 180 + \tan^{-1}(b^*/a^*)$ quando $a^* < 0$ ou $b^* > 0$.

A firmeza dos frutos foi medida utilizando um penetrômetro com ponteira cilíndrica e os dados foram registrados como a força aplicada ao fruto, medida em Newtons (N). Para determinar os sólidos solúveis, o mesocarpo foi processado e uma gota do suco filtrado foi colocada em um refratômetro marca DIGIT, expressando os resultados em °Brix.

Uma alíquota de 5 mL do suco filtrado foi diluída em 45 mL de água destilada para a medição do pH, utilizando um pHmetro Hanna pH 21 pH/mV meter (Sigma-Aldrich®). Esta solução foi então utilizada para determinar a acidez titulável, utilizando uma solução de NaOH 0,1 M e três gotas de fenolftaleína. Os dados de acidez foram registrados em mL da solução de NaOH 0,1 M utilizados até o ponto de viragem e foram transformados utilizando a fórmula: $\text{Acidez da solução} = \frac{V \times f \times 100}{P \times c}$, onde V é o volume de mL da solução de NaOH a 0,1 M, f é o fator da solução de hidróxido de sódio 0,1 M, P é o volume em mL da amostra utilizado na titulação, e c é a correção de 10 para a solução de NaOH a 0,1 M.

5.3 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E CONVERSÃO PARA cDNA

Para cada estágio de maturação 15, 25, 35 e 45 D.A.P. foram extraídas amostras de RNA total de pelo menos três frutos (triplicata biológica), seguindo o método adaptado do perclorato de sódio (Campos *et al.*, 2017). Foram utilizados 4 g de mesocarpo para a purificação do RNA total, empregando soluções de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Em seguida, o tratamento com DNase foi realizado utilizando o kit TURBO™ DNase (Invitrogen) para remover possíveis contaminações por DNA genômico. A integridade do RNA total foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE. Considerou-se como amostras íntegras aquelas que apresentaram bandas nítidas dos genes 18S e 28S, correspondentes ao RNA ribossomal.

A quantificação do RNA foi realizada utilizando o espectrofotômetro Nanovue™, avaliando as razões de absorbância A260/A280 nm para verificar a presença de contaminação por proteínas, fenóis ou outros compostos que absorvem luz a 280 nm (valores aceitáveis: 1,8-2,0), e A260/A230 nm para detectar contaminantes como polissacarídeos, sais e outros compostos orgânicos (valores aceitáveis: 2,0-2,2). As amostras contendo RNA total íntegro foram submetidas à transcrição reversa, necessária para a síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA), utilizando 2 µg de RNA e o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™).

5.4 DESENHO DOS PRIMERS

Os dados de RNA-Seq obtidos por Schemberger *et al.* (2020) foram comparados com as descrições do RNA- Seq de Saladié *et al.* (2015), gerando a tabela 2 com os genes diferencialmente expressos estudados por RT-qPCRf foram: *CmAGL1*, *CmCEL*, , *CmXGT* *CmXYL*, *CmXTH1*, *CmXTH2*, *CmPGL1*, *CmPGL2*, *CmPGN*, , *CmEXP*,

Tabela 2: Genes de interesse para o estudo da parede celular de frutos de melão durante o amadurecimento. Sequências forward (5'-3') e reverse (5'-3') de primers, utilizados como iniciadores da transcrição dos genes de transdução de sinal. Contendo o tamanho dos fragmentos em pares de base (amplicons) e a temperatura adequada para anelamento do primer (Tm).

<i>Gene</i>	Função	Amp (pb)	Tm (C°)	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
<i>CmAGL1</i>	A- galactosidase	181	63°	FTGTATTCTCTGTCCCCTA	RGCAGTAGCAAAATCCCTGGT
<i>CmCEL</i>	Endoglucanase	118	64,7°	F TCAACAAGAACAACGCCAGC	R TCCATCCATCCATCCCCTTAT
<i>CmXGT</i>	Xiloglucano glicosiltransferase 4	126	64 °	F CGATGACCCAACTACCCAGT	R GCGGATTTGAGATTGCCAGC
<i>CmXYL</i>	Beta-D-xilosidase família de proteínas	117	64,7°	F TATGAGTGGTGGTCGGAAGC	R AGAAGCAGCGGTTGTGATGA
<i>CmXTH1</i>	Xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase	114	64,7°	FCCAAGGACCAGCCAATGAGA	RTGTAGGAAGCAGTGAAAGGC
<i>CmXTH2</i>	Xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase	168	64,8 °	F GCGTAGCCTTCCCCAAAAATC	R ACTGTCCCGATGACCAAATGC
<i>CmPGLC1</i>	Poligalacturonase	207	63,1°	F GCCCCTGCCAATAGTCCAAA	R GACCCCATTTCTCTCTCTCTCT
<i>CmPGLC2</i>	Poligalacturonase	204	63°	FGAGGTTTCTAATGTGGTG	R TACTGCGTCTGCCTGTTGT

<i>CmPGN</i>	Poligalacturonase-1 não-catalítica subunidade β	151	65,7°	F CTAAAGCCACCATCAACCACG R TCAAGAGCCACATCCTCCGA
<i>CmEXP</i>	Expansina-tipo A2	113	62,2°	F CGACTCAACTCCTCCATCAAC R GCAGTAGCAAAATCCCTGGT

Fonte: a autora.

Os primers foram desenhados no software PrimerBlast e Beacon Designer4. Foram realizadas PCR (reação em cadeia da polimerase) convencionais em termociclador com gradiente de temperatura para testar qual temperatura era mais adequada ao primer. Os genes de referência utilizados para normalização foram *CmRPL-60S* (proteína ribossomal L) e *CmRPS15* (proteína ribossômica citosólica S15), (Kong *et.al.*, 2014; Kong *et.al.*, 2016).

Inicialmente os gradientes de temperatura dos primers foram testados por PCR convencionais com gradientes de temperatura, para descobrir a temperatura de anelamento mais adequada para cada um, nesse processo os primers dos genes *CmPGN* e *CmXTH2* se mostraram não adequados para as análises, apresentando dímeros e alguns nem apareceram no gel de agarose, portanto foram redesenhados novamente na tabela 3.

Tabela 3: Novos primers desenhados para os genes onde os primers anteriormente desenhados não eram adequados.

Melanomics	Nome do gene	Função	5'3'Forward 5'-3'Reverse
MELO3C016494	<i>CmPGL1</i>	α-galactosidase	F TTTACGGGACATCGGCGT R AACAGTAGAGCCTTGAGT FGGAGTGAGAATAAAAAGTTGGG R ACGCCGATGTCCCGTAAAT
MELO3C017478	<i>CmXTH2</i>	Xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase	F :GTTTTTGGGAAATCTGAGCGGC R :GTGGAAATCGGCAGTTGGGT
MELO3C023556	<i>CmPGLC2</i>	Poligalacturonase	F : GAGCAATGGGTGACGGAGAA R :ACAAGGACCAGAGAAGGTGAT
MELO3C010662	<i>CmPGN</i>	Poligalacturonase-1 não-catalítica subunit beta	F :CGTGGGTTCCGTGGAAGATA R :ACGGAGTGGCAGTAGTAGAGT

Fonte: a autora.

5.4. RT-qPCR E ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

As RT-qPCRs foram conduzidas utilizando o termociclador AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies) e o kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR q-PCR Master Mix (Agilent Technologies®). Foram utilizados 60 ng de cDNA, 0,8 µL de cada primer (forward e reverse) na concentração de 10 µM e 6,4 µL de água.

O protocolo de amplificação consistiu em uma etapa inicial de 10 minutos a 95 °C (Hot Start) para ativar a enzima, seguida por 40 ciclos de amplificação com 15 segundos a 95 °C, 20 segundos na temperatura ideal de anelamento de cada primer (conforme Tabela 2) e 30 segundos a 72 °C. Após a etapa de amplificação, foi realizada a curva de melting com as seguintes configurações: 95 °C por 30 segundos, 65 °C por 30 segundos, 95 °C por 30 segundos, com um aumento gradativo (ramp) de 0,5 °C a cada 5 segundos.

A quantificação da expressão gênica foi realizada por meio dos valores de ciclo de quantificação (Cq) dos genes de interesse em comparação com os genes de referência. O fold change para cada gene, conforme os estádios de maturação dos frutos, foi calculado utilizando o método de Livak ou $2^{-\Delta(\Delta Cq)}$, onde $\Delta Cq = Cq(\text{gene alvo}) - Cq(\text{gene housekeeping})$ e $\Delta(\Delta Cq) = \Delta Cq(\text{amostra de estudo}) - \Delta Cq(\text{amostra controle})$.

5.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para obtenção do extrato enzimático foi adaptado o método de Gross (1982) onde foi preparada uma solução extratora de NaCl 0,9%. Em um liquidificador foram utilizados 40 g de mesocarpo de melão que estava congelado à -80 °C, foi previamente descongelado e adicionou-se 40 mL da solução de NaCl 0,9%. Em seguida a amostra foi colocada em tubos falcon e centrifugada por 30 minutos à 4°C com rotação de 3885 x g, as enzimas estavam no sobrenadante que constituiu o extrato enzimático.

5.5.1 ATIVIDADE DA POLIGACTURONASE

Esse protocolo foi adaptado de Gross (1982), Stock, (2013) e Yao *et al.* (2014) o guia de preparo de soluções se encontra no anexo 1. O substrato para enzima foi preparado usando uma solução de ácido poligacturônico (1%) em tampão acetado pH 5,6 contendo NaCl 0,1M. Em um tubo de ensaio foi colocado 250 µL de substrato, 200 µL de água destilada e 50 µL do extrato enzimático diluído (400 µL de extrato bruto em 600 µL de água destilada). Em

seguida foi encubado por 37°C por 2 horas em banho-Maria, após esse período a reação foi interrompida com a adição de 500 µL de DNS, e os tubos foram colocados em banho-Maria e mantido em ebulição por 10 minutos. Em seguida os tubos foram resfriados e adicionou-se 4 mL de água. As leituras de absorbância foram obtidas á 540 nm e a unidade de enzima refere-se à quantidade de ácido galacturônico liberado µmoL por minuto. A curva padrão foi feita com ácido D- galacturônico nas concentrações de 0,0, 0,2, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8 mg.mL⁻¹.

5.5.2 ATIVIDADE ENZIMATICA DA β- D- XILOSIDASE

O Protocolo foi adaptado de Yao *et al.* (2014). O substrato foi preparando usando 0,25% de xiloglucano de tamarindo em água destilada por 2h30min à 40°C. Em um tubo de ensaio foi adicionado 250 µL de substrato, 200 µL de água destilada e 50 µL de extrato diluído (200 µL de extrato enzimático e 800 µL de água destilada). Os tubos incubados em banho-maria por 37°C por 2h, a reação foi interrompida por 500 µL de DNS, e levado a banho-maria fervente e mantido em ebulição por 10 min. Em seguida as amostras foram resfriadas e foi adicionado 4 mL de água destilada. As leituras de absorbância foram obtidas á 540 nm e a unidade de enzima refere-se à quantidade de xilose liberado µmoL por minuto. A curva padrão foi feita com xilose nas concentrações de 0,0, 0,2, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8 mg.mL⁻¹.

5.6 ANÁLISE ESTATISTICA

O experimento foi conduzido sob um delineamento experimental inteiramente casualizado. Os valores obtidos da equação de Livack para cada gene e os dados de pós-colheita foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Em seguida, foram realizados testes de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com um nível de significância de 5%.

Para as enzimas poligalacturonase e xiloglucanase, os dados não apresentaram distribuição normal mesmo após transformação, portanto, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste pós-hoc de Bonferroni. As análises de correlação foram

conduzidas utilizando o teste de correlação de Spearman. Todas as análises foram realizadas utilizando o software RStudio.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 QUALIDADE PÓS- COLHEITA

A qualidade sensorial, que engloba atributos como firmeza, cor, sabor, teor de açúcares, acidez, além de peso e tamanho, são elementos decisivos na escolha de frutas pelos consumidores (Stroka *et al.*, 2024). Neste estudo foram conduzidas análises colorimétricas na casca e na polpa dos frutos de melão 'Eldorado', cujos resultados podem ser visualizados na Figuras 6.

Em relação ao atributo a^* , valores negativos indicam uma tendência para a cor verde, enquanto valores positivos tendem para tons de vermelho. Na Figura 6 os valores de a^* para a cor da casca são negativos, indicando uma tonalidade verde nos estádios de 15 e 25 D.A.P. em comparação com os outros estádios (Figura 6a). Aos 45 D.A.P houve uma diferença estatisticamente significativa em relação aos demais estádios, com os frutos apresentando uma coloração menos verde.

Quanto ao atributo a^* da cor da polpa, os frutos aos 15, 25 e 35 D.A.P se apresentaram mais esverdeados e não diferiram entre si. No entanto, aos 45 D.A.P houve uma diferença significativa em comparação com os outros estádios, indicando uma mudança da cor da polpa, tornando-se verde mais clara, assegurando que os frutos estão aptos a colheita.

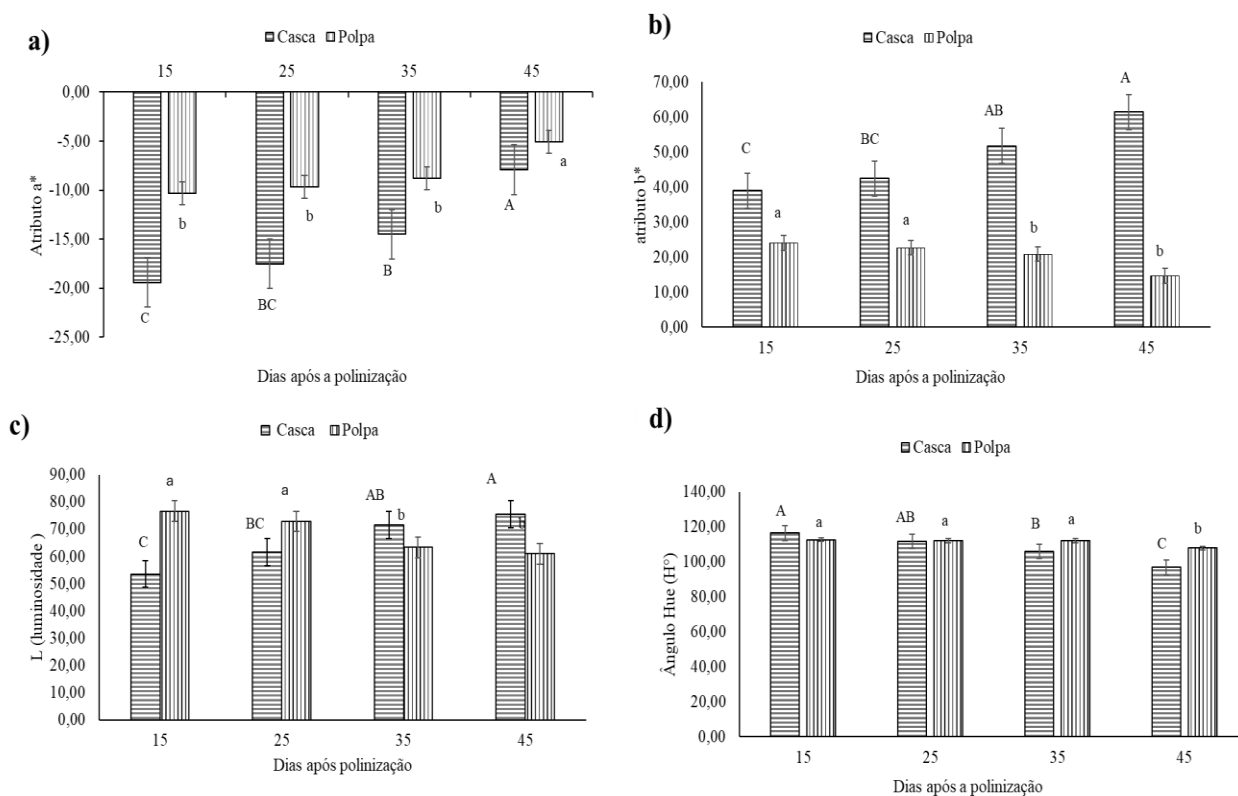
Para a coordenada b^* , valores negativos correspondem à cor azul, enquanto valores positivos indicam tendência à cor amarela. O atributo b^* para a cor da casca foi positivo (Figura 6b), aos 15 D.A.P os frutos estavam mais verdes e diferiram significativamente dos frutos aos 45 D.A.P. Isso indica que a cor da casca também muda e se torna amarela durante o estágio final de maturação.

Quanto à cor da polpa, o atributo b^* não apresentou diferenças significativas entre os estádios de 15 e 25 D.A.P. A Figura 6b mostra que a alteração na cor da polpa ocorreu aos 35 D.A.P e permaneceu até a colheita.

O atributo L^* (Figura 6c) refere-se ao brilho, com uma variação de 0 (escuro) a 100 (claro). Para a cor da casca, observa-se que os frutos aos 15 D.A.P apresentavam coloração mais escura, enquanto aos 45 D.A.P estavam mais claros, e essa diferença é estatisticamente significativa. Quanto à cor da polpa, nos estádios de 15 e 25 D.A.P, os frutos apresentaram-se verde- escura e não diferiram entre si. Já nos estágios de 35 e 45 D.A.P, os frutos

apresentaram cor verde-claro, evidenciando que a mudança na cor da polpa ocorreu próximo aos dias de colheita aos 45 D.A.P. Essa característica de polpa verde em frutos maduros é típica de frutos de ‘Eldorado’.

Figura 6. Mudança na coloração da cor da casca de melão amarelo cv. Eldorado a) coordenada a^* : $-a^*$ representa a cor verde e $+a^*$ a cor vermelha; b) coordenada b^* : sendo $-b^*$ tons em azul e $+b^*$ tons em amarelo; c) atributo L^* para o brilho/luminosidade da casca; d) ângulo Hue. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ao longo do desenvolvimento para cor da casca e letra minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) ao longo do desenvolvimento para cor de polpa, ambos por teste de Tukey.



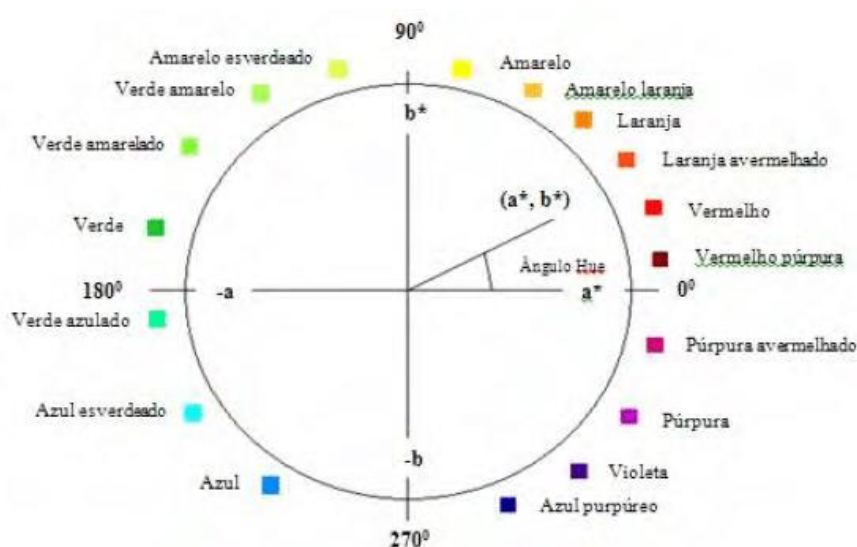
Fonte: A autora.

Los *et al.* (2024), ao analisarem frutos de melão amarelo, citam que o atributo a^* para a casca e polpa aumentou ao longo do amadurecimento. Já a atributo b^* aumentou ao longo dos estádios de maturação para a casca, enquanto na polpa ocorreu diminuição dos valores dos 15 até os 45 D.A.P. Quanto ao L^* , houve aumento dos 15 até os 45 D.A.P na casca, e diminuição ao longo da maturação na polpa. Os mesmos padrões de mudança de cor durante a maturação também foram visualizados neste trabalho.

Quanto ao ângulo Hue da casca (Figura 6d), seguindo a escala proposta por Bovi (2015) (Figura 7), os frutos com 15 D.A.P se aproximam do espectro verde e não sofrem alteração da cor até os 25 D.A.P. Já os frutos com 35 D.A.P, estes tendem para um verde-

amarelo, e em seguida, aos 45 D.A.P, migram para o tom amarelo. Sugerindo que a mudança de cor mais significativa ocorre aos 35 D.A.P e permanece sem alterações até a colheita. Quanto à polpa, a mudança mais significativa ocorreu aos 45 D.A.P, quando a polpa se torna verde-clara e está pronta para consumo. Los *et al.*(2024) também estudaram melões ‘Eldorado’ e observaram que o ângulo de tonalidade da cor da polpa permaneceu representando a cor verde-escuro ao longo dos 15, 25 e aos 35 e 45 D.A.P mudou para verde amarelado.

Figura 7. Diagrama CIELAB com sequência de nuances de cores e orientação do ângulo de Hue .



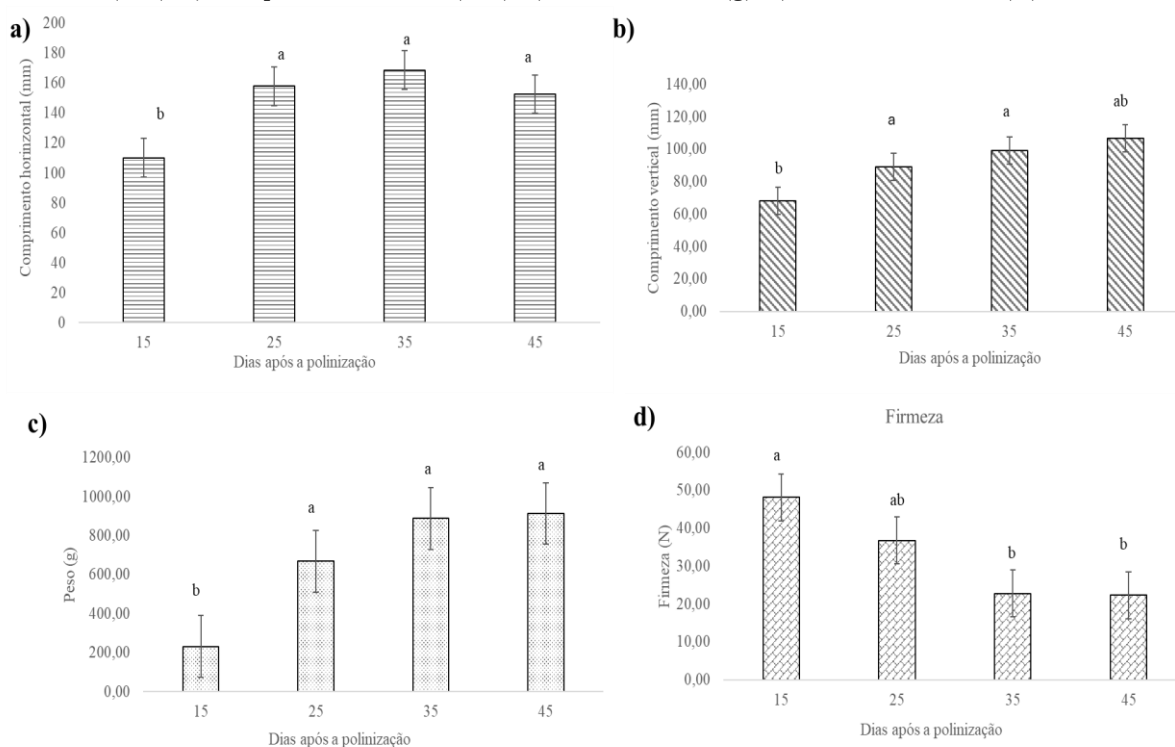
Fonte: BOVI, 2016.

Outros aspectos que impactam a qualidade dos frutos, como tamanho e massa fresca, também influenciam na escolha dos consumidores. Aumento no diâmetro horizontal foram observados no estágio 25 D.A.P, conforme demonstrado na figura 8a, não havendo novas mudanças nos estágios seguintes.

O crescimento vertical (Figura 8b), demonstrou diferenças entre os frutos de 15 e 25 D.A.P, mas não foram observadas diferenças em relação aos estágios de 35 e 45 D.A.P, evidenciando o alongamento dos frutos no estágio dos 25 D.A.P do seu desenvolvimento. Na figura *C o peso aumentou aos 25 D.A.P, indicando que durante os 25 dias após a polinização ocorre uma alta taxa de divisão e expansão celular, determinando assim o tamanho final do fruto. Esta constatação também pode ser visualizada na Figura 5, a qual demonstra as distinções entre os estágios de maturação dos frutos de melão amarelo

A firmeza dos frutos (Figura 8d) está intimamente ligada com os componentes da parede celular, pois nos estádios finais da maturação ocorre um amaciamento dos frutos, em decorrência da degradação da parede celular (Jara *et al.*, 2019). Nos estágios iniciais, quando os frutos estão verdes, a polpa é mais rígida, sendo necessária uma aplicação maior de força, como observado para 15 D.A.P. Por outro lado, aos 35 D.A.P, os frutos maduros já ofereciam menos resistência, devido à solubilização dos componentes da parede celular, resultando no declínio da firmeza, a qual manteve-se estável até os 45 D.A.P.

Figura 8. Medidas relacionadas ao tamanho dos frutos de melão amarelo cv. Eldorado. a) Comprimento horizontal (mm); b) Comprimento vertical (mm); c) Peso dos frutos (g); d) Firmeza dos frutos (N).



Fonte: A autora.

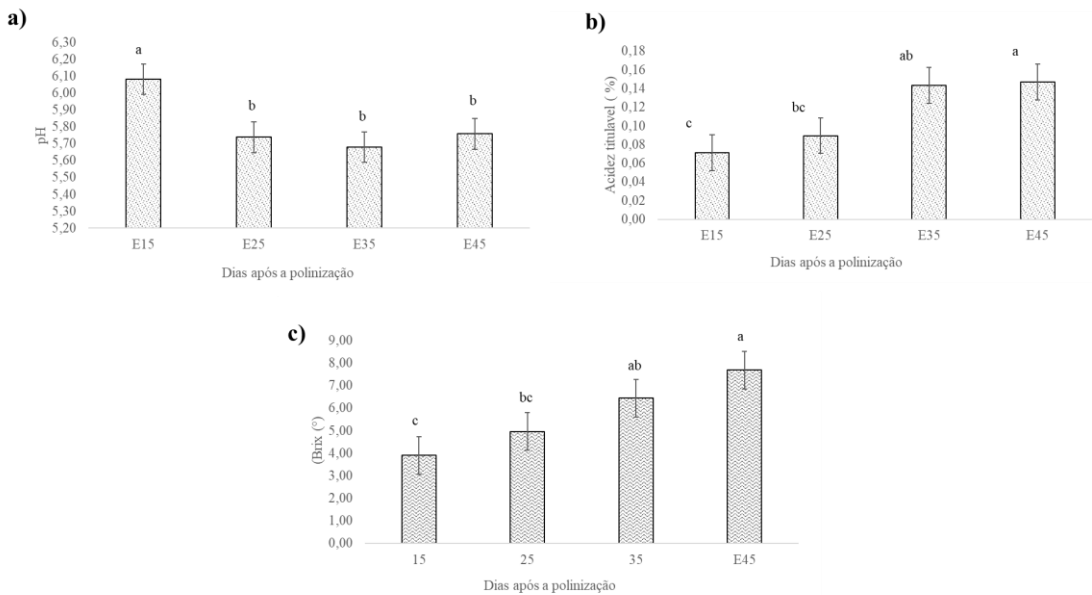
Rose *et al.* (1998) conduziram um estudo sobre melões 'Charentais' (Climatérico) ao longo de três safras, e observaram que a firmeza dos frutos diminuiu à medida que a concentração interna de etileno aumentou durante o processo de amadurecimento. Os frutos transitaram de estádios intermediários para completamente maduros em um intervalo de 24 a 48 horas, o que coincidiu com um aumento na concentração de ácido urônico. Durante o amadurecimento, as pectinas presentes na parede celular dos melões 'Charentais' foram solubilizadas e despolimerizadas, especialmente nos estádios finais da maturação. Isso

resultou na liberação de resíduos de galactosila das cadeias ricas em galactose de RGI e RGII, comprometendo a coesão entre a matriz de pectina e a hemicelulose.

Durante o amadurecimento dos frutos de melão, ocorrem transformações de ácidos em açúcares, em consequência aumentam a palatabilidade e atratividade do frutao. No melão amarelo ‘Eldorado’ a concentração de ácidos orgânicos é baixa (Ayub *et al.*, 1996; Stroka *et al.*, 2024).

Quanto aos açúcares, na Figura 9c é possível observar um aumento no teor de sólidos solúveis (°Brix%), aos 35 D.A.P. em relação ao fruto com 15 D.A.P., alcançando o maior teor nos frutos maduros. Os sólidos solúveis são compostos por carboidratos, sacarose, frutose e glicose, e durante os estágios finais da maturação de melão, ocorre o acúmulo dessas substâncias, contribuindo para o aumento do sabor do fruto (Stroka *et al.*, 2024).

Figura 9. Medidas de acidez, sólidos solúveis de melão amarelo cv. Eldorado, indicadores de maturidade fisiológica dos frutos. a) valores de pH do suco da fruta; b) acidez titulável em porcentagem de ácido cítrico; c) quantidade de sólidos solúveis (SS) em escala de °Brix.



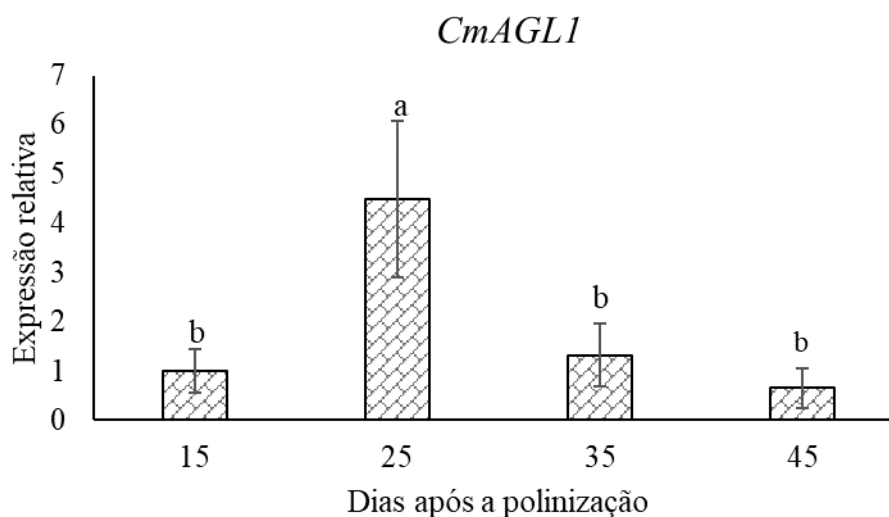
] Fonte: A autora.

6.2 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR

Prevvia-se uma expressão maior do gene *CmAGL1*, responsável pela codificação da enzima α -galactosidase, em frutos jovens. Na Figura 10 é possível observar que aos 25 D.A.P gene *CmAGL1* foi 4 vezes mais expresso que aos 15 D.A.P ($p<0,05$). Posteriormente, aos 35 D.A.P, a expressão diminuiu, e não foi significativa diferentes dos 15 D.A.P., houve uma

expressão de apenas 0,6 vezes. Com base em estudos transcriptômicos conduzidos por Schemberger *et al.* (2020) e Saladié *et al.* (2015).

Figura 10. Expressão gênica relativa do gene *CmAGL1* responsável pela codificação da α -galactosidase. Foram utilizadas as médias dos tratamentos, apresentando o erro padrão, letra diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) a teste de Tukey a 5%.



Fonte: A autora.

As α -galactosidases desempenham um papel crucial no metabolismo do açúcar em frutos de melão amarelo, caracterizando-se por serem enzimas dependentes do pH (Schemberger *et al.*, 2020). Essas enzimas atuam na clivagem da rafinose em sacarose, removendo as galactoses terminais dos oligossacarídeos da rafinose e clivando a galactose e a estaquiose em galactose e rafinose, fornecendo energia para o crescimento dos frutos jovens (Schemberger *et al.*, 2020; Stroka *et al.*, 2024).

Observou-se neste trabalho que o gene *CmAGL1* foi mais expresso durante o processo de expansão celular aos 25 D.A.P. Saladié *et al.* (2015) identificaram várias isoformas que codificam α -galactosidases altamente expressas em frutos verdes de melão climatérico *Cantalupensis* 'Védrantais' e em melões não-climatéricos do grupo *Inodorus* 'Piel de sapo'. Zhang *et al.* (2022) constataram que o nível de expressão da α -galactosidase 2 (MELO3C011771) em frutos de melão 'Hami' do grupo *Inodorus* foi mais elevado em frutos jovens e diminuiu ao longo da maturação, atingindo o nível mais baixo em frutos maduros.

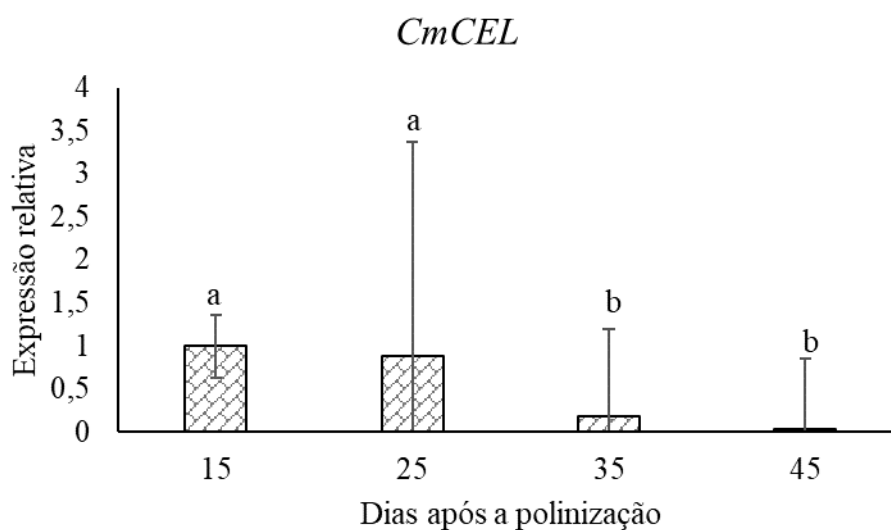
Garcia- Mas *et al.* (2012) ao estudarem o genoma do melão, observaram isoformas neutras da α -galactosidase *CmNAG1*, *CmNAG2*, *CmNAG3* e *Cm-NAG4*. Posteriormente,

Schemberber *et al.* (2020), identificaram três isoformas de α -galactosidases neutras denominadas *CmNAG2* (α -galactosidase alcalina), *CmAAG2* (α -galactosidase ácido tipo 2) e *CmNAGLIKE2* (galactino-sacarose galactosiltransferase tipo 5) em frutos de melão amarelo, que foram mais expressas em frutos verdes.

Em um estudo sobre os genes do metabolismo da sacarose em melão, Stroka *et al.* (2024) observaram que a isoforma *CmNAG2* foi mais expressa em frutos maduros de melão não-climatérico ‘Eldorado’. Em contraste, em frutos climatéricos ‘Gaúcho’, acredita-se que essa isoforma contribua para a sinalização de etileno e o acúmulo de sacarose e galactose.

As endoglucanases atuam na quebra das ligações β -(1,4) glicosídicas da celulose, resultando no amaciamento dos frutos (JARA *et al.*, 2019), o gene *CmCel* (Figura 11) foi 0,89 vezes mais expresso aos 25 D.A.P ($p < 0,05$) do que aos 15 D.A.P e essa diferença não foi significativa, estádios iniciais nos quais ocorre a expansão e divisão celular. como evidenciado pela Figura 8D que mostra que a firmeza aos 15 e 25 D.A.P era maior do que nos estádios finais da maturação, indicando sua ação nos estádios iniciais, causando a despolimerização da celulose. Concordando com este trabalho, Schemberger *et al.* (2020) observaram uma maior expressão de endoglucanases em frutos imaturos.

Figura 11. Análise de expressão genica diferencial para o gene *CmCEL* responsável pela sinalização das endoglucanases. Foram utilizadas as médias dos tratamentos, apresentando o erro padrão, letra diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) a teste de Tukey a 5%.



Fonte: A autora.

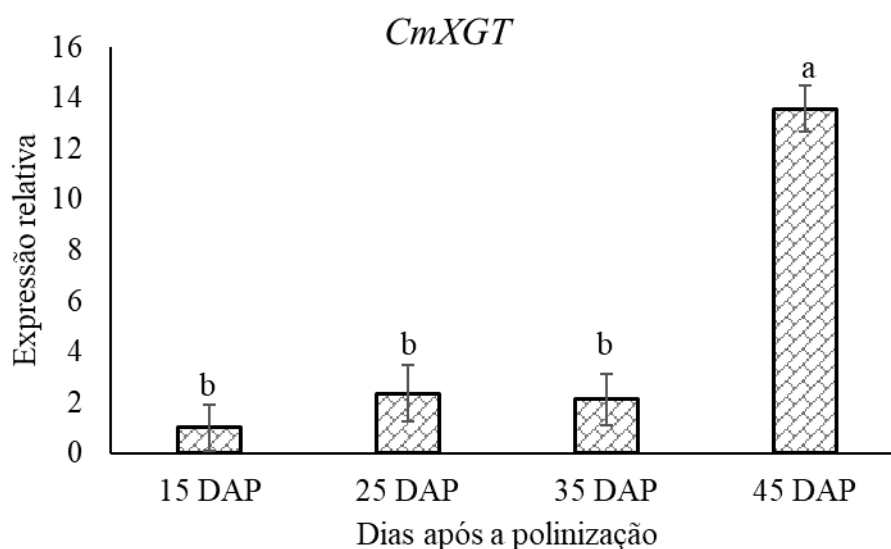
Segundo Chourasia *et al.* (2008), a expressão gênica e atividade das endoglucanases aumentam em estágios intermediários da maturação e isto está correlacionado com a diminuição da firmeza em frutos de manga (climatéricos) tratados com etileno exógeno. Em frutos controle (sem etileno), a expressão foi baixa, devido à ausência de etileno exógeno, atrasando o amadurecimento em três dias, sugerindo que as endoglucanases são responsivas ao etileno.

Jara *et al.* (2019) estudaram duas isoformas de endoglucanase denominadas de *FaGE1* em morangos. *FaEG1* foi mais expressa em frutos em estágios de maturação intermediários, com 50% de vermelhidão. Isso corrobora com os resultados encontrados neste estudo, onde a redução da firmeza está associada às enzimas que atuam na desmontagem da parede celular, em função do afrouxamento das redes de celulose-xiloglucano.

Mejía-Mendoza *et al.* (2022) estudaram o gene *PgE17*, codificante de endoglucanase em goiabas, em diferentes estágios de maturação. Os autores observaram que a expressão foi cinquenta vezes maior na fase intermediária da maturação, denominada de "*breaker*", onde os frutos se apresentavam verdes com subtom amarelado, correspondente à fase de expansão celular. Já em frutos maduros, a expressão foi vinte vezes menor em comparação com os frutos verdes.

O xiloglucano é sintetizado por glicosiltransferases (GTs) e acetiltransferases no aparelho de Golgi antes de ser modificados por glicosidases e transglicosilases na parede celular (Pauly; Keegstra, 2016). No presente estudo, o gene *CmXGT* responsável pela expressão da Xiloglucano glicosiltransferase conforme mostrado na Figura 12, apresentou baixos níveis de expressão durante os 15, 25 e 35 D.A.P, e um pico de expressão em frutos maduros (13 vezes mais do que aos 15 D.AP., $p < 0,05$).

Figura 12. Análise de expressão gênica relativa do gene *CmXGT* responsável pela codificação da enzima xiloglucano glicosiltransferases-4. Fonte: A autora. Foram utilizadas as médias dos tratamentos, apresentando o erro padrão, letra diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) a teste de Tukey a 5%.

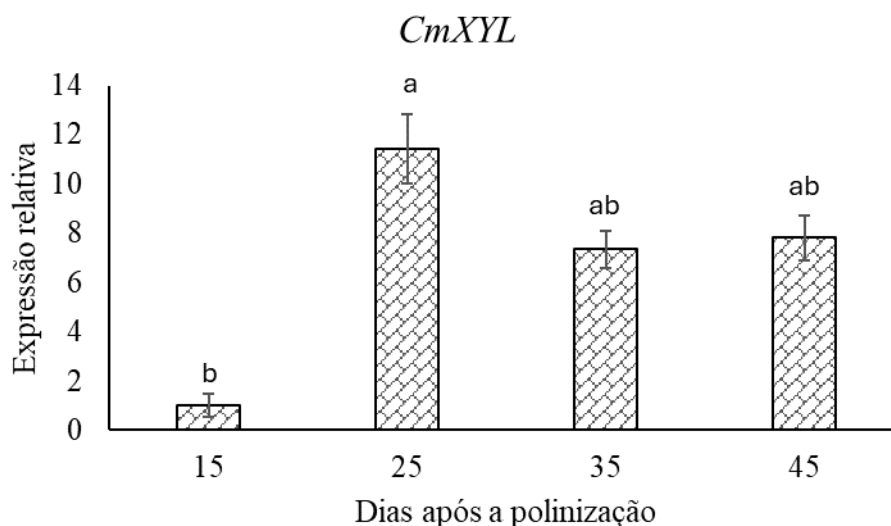


Fonte: A autora.

Wilson *et al.* (2023) identificaram uma família multigênica de xiloglucano glicosiltransferase-4 envolvida na síntese de xiloglucano em *Arabidopsis* spp. Há muitos desafios em elucidar o padrão de expressão envolvido na glicólise de polissacarídeos da matriz, especialmente na síntese de xiloglucano, devido à complexidade das glicosiltransferases que sintetizam hemiceluloses, que são caracterizadas pela baixa solubilidade, dificultando a realização de ensaios enzimáticos para sua caracterização (Zabotina *et al.*, 2012). Kuhn *et al.* (2022) observaram que o gene que codifica a glicosiltransferase-4 em frutos não climatéricos de cereja doce é altamente responsivo ao ABA e está localizado em regiões com alta metilação do DNA.

A enzima β -d-xilosidase promove a degradação de xilooligossacarídeos, resultando na liberação de xilose. Quanto ao gene *CmXYL* (codificante de β -d-xilosidase), este apresentou uma expressão 11 vezes maior aos 25 D.A.P em relação aos 15 D.A.P ($p < 0,05$) (Figura 13). Schemberger *et al.* (2020) identificaram que esse gene foi mais expresso em frutos imaturos do que em frutos maduros, o que está em concordância com os resultados deste estudo.

Figura 13. Análise de expressão gênica relativa do gene *CmXYL*, responsável pela codificação da enzima β -d-xilosidase. Foram utilizadas as médias dos tratamentos, apresentando o erro padrão, letra diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) a teste de Tukey a 5%.



Fonte: A autora.

Saladié *et al.* (2015) observaram um aumento na expressão de genes codificadores de poligalacturonases e β -xilosidase em frutos climatéricos de melão 'Védrantais' em resposta à presença de etileno, promovendo a degradação da parede celular e, conseqüentemente, a perda de firmeza durante a maturação. Por outro lado, em melões 'Piel de sapo', que não apresentam picos na produção de etileno, Saladié *et al.* (2015) observaram um aumento na expressão de genes de arabinogalactanases, sugerindo que a perda de firmeza em frutos não climatéricos está associada a um conjunto de enzimas que não dependem apenas da sinalização de etileno.

Peng *et al.* (2022) observaram que a aplicação de auxina exógena em morangos reduziu os níveis de transcritos de genes que codificam β -d-xilosidases, endoglucanases e β -galactosidases, mas promoveu aumento na expressão de genes *XTH*, resultando na diminuição da velocidade de amolecimento dos frutos. Da mesma forma, Bustamante, Civello e Martínez, (2009) investigaram genes codificadores de β -xilosidase em frutos não climatéricos de morango e observaram que a aplicação de auxinas exógenas reprimia a expressão de genes de β -xilosidase e, conseqüentemente, a atividade dessa enzima, resultando em frutos mais firmes. Por outro lado, a aplicação de ABA promoveu um aumento na expressão gênica e, como resultado, foram observados diminuição de firmeza nos frutos.

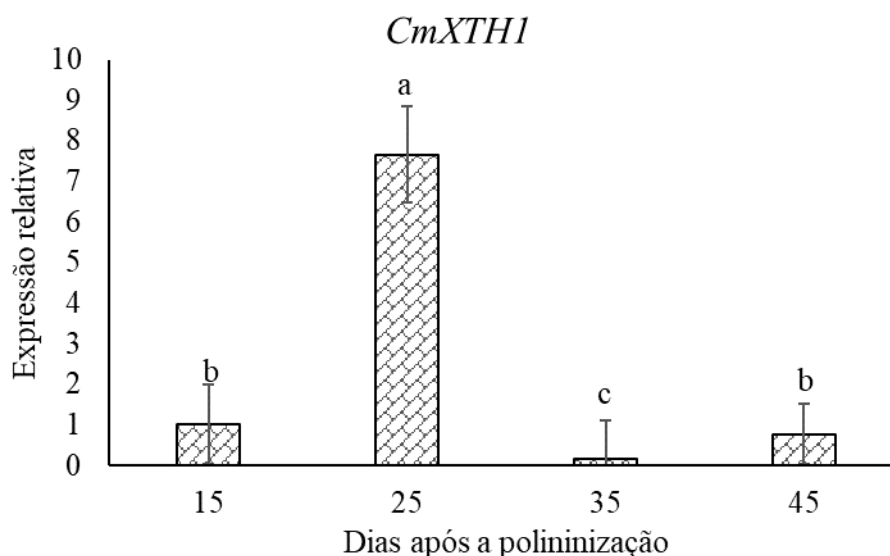
Li *et al.* (2022) estudaram os efeitos da aplicação de ABA exógeno em morangos e constataram que este hormônio promoveu aumento na expressão genes que condificam

enzimas como a β -xilosidase, xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase, acelerando o amolecimento das frutas.

A família multigênica das enzimas XTH clivam e reconectam o xiloglucano, alterando a dinâmica das microfibrilas de celulose e contribuindo para o afrouxamento celular (Ishida; Yokoyama, 2022). Essas enzimas exibem dois padrões de atividade: a transglicosilase (XTH), que catalisam a quebra das ligações β -(1-4) do xiloglucano doador e transfere a extremidade redutora para o terminal não redutor de outra molécula de xiloglucano aceitadora. E também podem promover a hidrolase (XET), que catalisam a quebra das moléculas de xiloglucano via hidrólise, provocando o afrouxamento da parede (Saladié *et al.*, 2006).

Na Figura 14 é possível observar que o gene *CmXTH1* foi 7 vezes mais expresso aos 25 D.A.P em relação ao 15 D.A.P ($p < 0,05$), diminuindo drasticamente a expressão aos 35 D.A.P e 45 D.A.P. Isso corrobora com os estudos de Schemberger *et al.* (2020), os quais observaram que *CmXTH1* também foi mais expresso em frutos jovens*.

Figura 14. Análise de expressão genica diferencial para o gene *CmXTH1* responsável pela sinalização da enzima xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase. Foram utilizadas as médias dos tratamentos, apresentando o erro padrão, letra diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) a teste de Tukey a 5%.



Fonte: A autora.

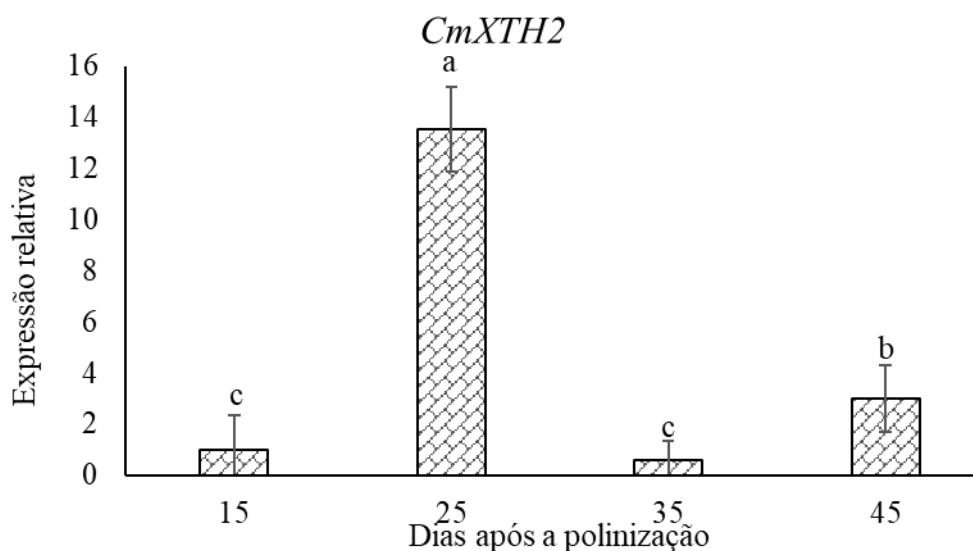
Saladié *et al.* (2015) observaram que após a aplicação de etileno exógeno houve um aumento na expressão de *CmXTH1* em frutos de melão climatérico 'Dulce', enquanto no tratamento controle a taxa de expressão era baixa. Em melões 'Piel de Sapo' (não-climatérico),

também houve um leve acréscimo na expressão após a aplicação de etileno, sugerindo que esse gene é regulado positivamente por etileno.

Gunnaiah *et al.* (2021) estudaram o gene *CmXTH1* em melões não- climatéricos ‘Mangalore’ e observaram que a baixa expressão de *XTH* resultou em baixa atividade enzimática, devido a ausência de etileno, conservando o xiloglucano e mantendo a firmeza do fruto por mais tempo. Lembrando que as enzimas *XTH* podem fazer as transglicosilação ou promover a hidrólise do xiloglucano, em morangos chilenos, a expressão de *XTH1* codificou enzimas com perfil de transglicosilase, enquanto a expressão de *XTH2* codificou enzimas que apresentaram padrão de hidrolase, neste trabalho foi observado maior expressão de *XTHs* em frutos imaturos do que em frutos maduros (Morales-Quintana *et al.*, 2020).

O padrão de expressão dos dois genes de *XTH* analisados é semelhante e está ligado ao período de expansão celular, indicando que o período de 25 D.A.P é primordial para a remodelagem do xiloglucano. Para a isoforma *CmXTH2*, representada na Figura 15, demonstrou aumento na expressão, sendo 13 vezes mais expressa aos 25 D.A.P dos que aos 15 D.A.P. ($p < 0,05$).

Figura 15. Análise de expressão gênica relativa para o gene *CmXTH2* responsável pela codificação da enzima xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase. Foram utilizadas as médias dos tratamentos, apresentando o erro padrão, letra diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) a teste de Tukey a 5%.



Fonte: A autora.

Saladié *et al.* (2006) estudaram os genes de *XTH* em tomate e observaram que geralmente os genes *XTH* dos grupos 1 e 2 desempenham mais atividade de transglicosilase, atuando diretamente na remodelação dos xiloglucanos durante a expansão celular. Eles

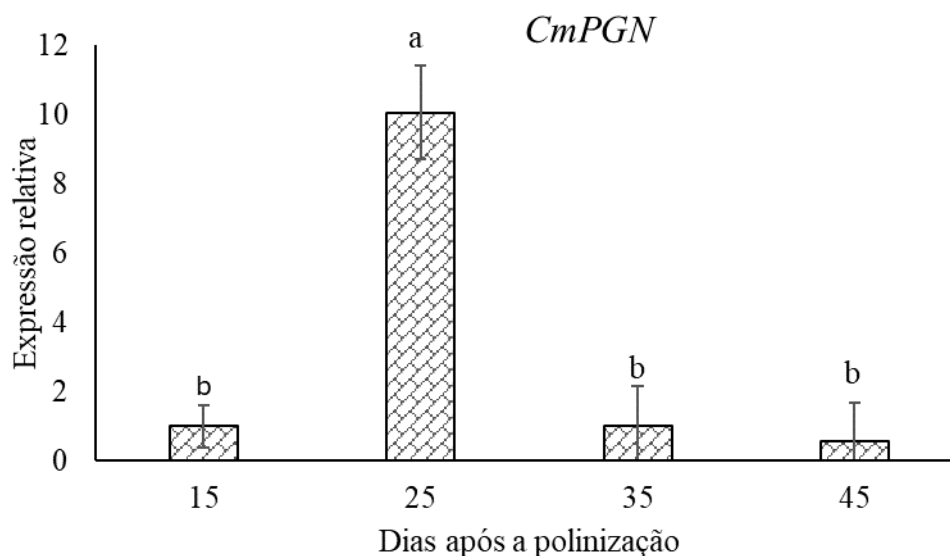
visualizaram que os genes de tomate *SIXTH1*, *SIXTH2*, *SIXTH3*, *SIXTH5*, *SIXTH9*, *SIXTH10*, e um gene de expansina *LeEXP1* foram mais expressos nos estágios pré-maduros de expansão celular, no ciclo de desenvolvimento.

Muñoz *et al.* (2013) investigaram a expressão de genes *XTH* em maçã e tomate (frutos climatéricos) tratados com etileno, e observaram um aumento na expressão dos genes de tomate *SIXTH4*, *SIXTH5*, *SIXTH7*, *SIXTH8* e *SIXTH16* após 24 e 48 horas do tratamento. Em maçã, todos os genes *MdXTHs* foram mais expressos em frutos maduros, com maior expressão observada em *MdXTH2*, *MdXTH10* e *MdXTH11*, seguida por *MdXTH4*, *MdXTH3* e *MdXTH1* após o tratamento com etileno, resultando em frutos mais macios. Como em frutos não-climatéricos não ocorre pico de etileno ao final da maturação, acredita-se que a expressão de genes *XTH* aos 25 D.A.P esteja mais associada com a influência de outros hormônios e de fatores de transcrição, isso prolonga a vida útil pós- colheita dos frutos e não permite o amaciamento excessivo.

Os primers novos dos genes *CmPGL1* e *CmPGL2* que codificam Poligacturonases 1 e 2 foram testados gradientes de temperatura em PCR convencionais, as sequências possuíam RPKM baixo e não se apresentaram aptos para as análises de RT-qPCR. Já o gene *CmPGN* foi apto para as análises.

PGN desempenha um papel crucial na degradação da parede celular durante o amadurecimento dos frutos (Moore; Bennett, 1994). Sua função principal é converter a poligalacturonase 2 (PG2) em poligalacturonase 1 (PG1), composta por PG2 e associada à poligalacturonase (PGN), enzima que só se torna funcional após essa associação dos polipeptídeos (Watson; Zheng; DellaPenna, 1994). No contexto do presente estudo, observou-se que o gene *CmPGN* (Figura 16) apresentou aumento de 10 vezes na expressão aos 25 D.A.P em comparação com 15 D.A.P ($p < 0,05$), seguido por níveis mais baixos aos 35 e 45 D.A.P, semelhantes ao padrão de expressão dos 15 D.A.P. (fruto imaturos).

Figura 16. Análise de expressão gênica relativa do gene *CmPGN*, responsável pela codificação da poligacturonase subunidade 1 não catalítica. Foram utilizadas as médias dos tratamentos, apresentando o erro padrão, letra diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) a teste de Tukey a 5%.



Fonte: A autora.

Zhai *et al.* (2021) identificaram 45 PGs no genoma da cereja doce (*Prunus avium* L.) (não-climatérico), sendo o gene *PavPG38* o que apresentou a maior abundância de transcritos. Em frutos tratados com ABA, ácido jasmônico (JA) e etileno exógeno, houve aumento na expressão, regulada positivamente por esses hormônios, resultando em uma significativa perda de firmeza nos frutos. A superexpressão de *PavPG38* levou a uma redução significativa da firmeza, sugerindo seu papel como ativador do amaciamento dos frutos por meio da modificação da parede celular.

Li *et al.* (2023) investigaram a função do gene *RiPG2* de framboesa (*Rubus idaeus* L.) por meio de transformação genética com *Agrobacterium tumefaciens*, introduzindo-o nos frutos de tomateiro. Os autores observaram uma redução na firmeza dos frutos e um aumento na atividade da enzima PG em três linhagens. A superexpressão de *RiPG2* resultou em queda na firmeza e regulação positiva da expressão de genes associados ao metabolismo da parede celular, como os genes de expansina (EXP) e xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase (XTH).

Ke *et al.* (2018) identificaram 54 genes de poligalacturonase (PG) em tomate, dos quais cinco estavam associados ao processo de maturação do fruto. Esses genes, denominados *SIPG14*, *SIPG15*, *SIPG49*, *SIPG70* e *SIPG71*, foram analisados em três estádios distintos de maturação: frutos verdes, frutos no estágio de maturidade fisiológica (*breaker*) e frutos

maduros. O gene *SIPG14* mostrou uma expressão mais elevada nos frutos no estágio de maturação fisiológica, representando um estágio intermediário de maturação, enquanto *SIPG15* apresentou maior expressão nos estádios de quebra e maturidade. Por outro lado, *SIPG70* demonstrou maior expressão nos frutos verdes, diminuindo gradualmente com o desenvolvimento do fruto, e *SIPG71* exibiu um pico de expressão na fase imaturos, também diminuindo gradualmente com o desenvolvimento do fruto (Ke *et al.*, 2018).

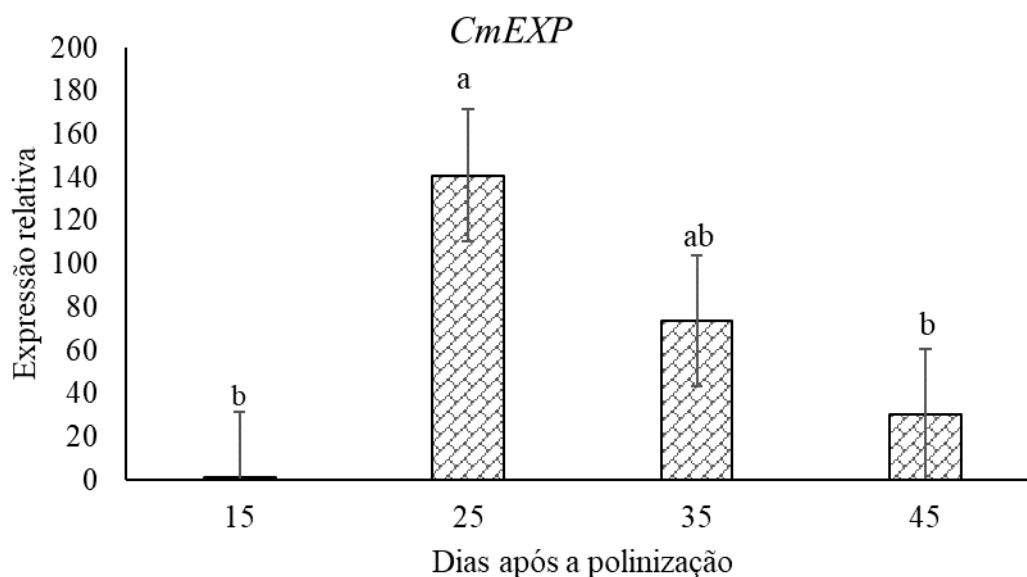
Esses resultados indicam que os diferentes genes de PG desempenham funções específicas durante o processo de amadurecimento dos frutos, com padrões distintos de expressão em cada estágio de maturação. Isto corrobora a hipótese do trabalho de que o estágio de transição de maturidade de 25 D.A.P, é fundamental no amaciamento de frutos durante a maturação.

Saladié *et al.* (2015) observaram aumento da expressão de genes que codificam PGs regulados pela presença de etileno em frutos de melão climatéricos 'Védrantais'. O aumento na expressão desses genes promove a degradação das pectinas e consequentemente a queda de firmeza.

No estudo conduzido por Gunnaiah *et al.* (2021), o gene *CmPG1* foi investigado em melões da cultivar não climatérica (*Cucumis melo* grupo *acidulus*) 'Mangalore' em comparação com melões (*Cucumis melo* grupo *cantalupensis*) 'Cantaloupe' (climatéricos) em pós-colheita. Os resultados revelaram uma expressão significativamente menor desse gene na polpa dos melões 'Mangalore' em comparação com os melões 'Cantaloupe', sendo aproximadamente 292 vezes menor. Essa diferença sugere uma baixa atividade das poligalacturonases nesta cultivar específica.

As expansinas tipo 2 codificadas pelo gene *CmEXP* são responsáveis pela extensão celular, e como pode-se observar na Figura 17, houve aumento de expressão gênica nos estágios iniciais do fruto. O gene *CmEXP* foi 141 vezes mais expresso aos 25 D.A.P ($p < 0,05$) 73 vezes aos 35 D.A.P, 30 vezes aos 45 D.A.P em comparação aos 15 D.A.P, indicando que as expansinas são mais expressas aos 25 D.A.P, sendo uma das principais responsáveis pela expansão celular. Estudos de RNA-Seq de Schemberger *et al.* (2020) sugeriram que este gene é mais expresso em frutos imaturos de melão 'Amarelo', o que foi comprovado neste trabalho. A maior ação desta proteína aos 25 D.A.P é responsável pelo aumento do processo de expansão e crescimentos dos frutos, como evidenciado também na Figura 16.

Figura 17. Análise da expressão gênica relativa do gene *CmEXP*, responsável pela codificação das expansinas. Foram utilizadas as médias dos tratamentos, apresentando o erro padrão, letra diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) a teste de Tukey a 5%.



Fonte: A autora.

Jiang *et al.* (2019) investigaram os genes que codificam as expansinas, os quais são responsáveis pelo desmonte da parede celular, causando rachaduras e amaciamento nos frutos de tomate. Quando o gene responsável pela expressão das expansinas foi inativado, observou-se um aumento na firmeza e menor ocorrência de rachaduras nos frutos.

Em melões 'Mangalore' (não-climatéricos), a expressão de *CmEXP1* foi mil vezes menor do que nos frutos climatéricos de melão *Cantalupensis* 'Muskmelon' resultando em frutos que com maior vida útil pós-colheita. Observou-se também que sem a expressão de expansinas, não ocorre afrouxamento da matriz celulosas- hemicelulose em decorrência da ação dessas proteínas, mantendo o fruto firme por mais tempo (Gunnaiah *et al.*, 2021). Provando as expansinas são altamente responsivas a etileno, em melões que não possuem picos de etileno as expansinas promovem o afrouxamento de parede de forma controlada, para os frutos apresentarem a firmeza adequada para consumo, mas evitam o amolecimento excessivo pós-colheita

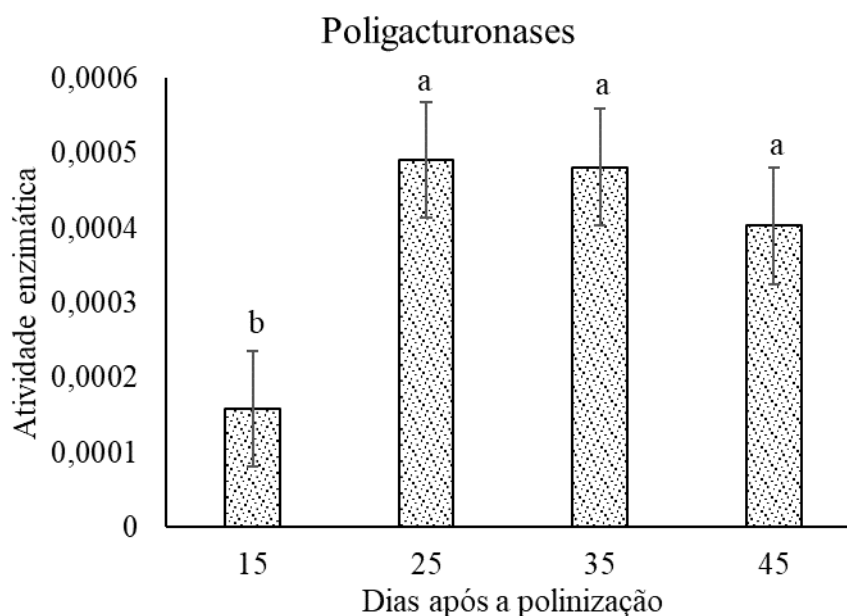
Su *et al.* (2024) observaram que o nocaute dos *SlCEL2* e *SlEXP* proporcionou frutos de tomate mais firmes nos estádios finais da maturação e os manteve mais firmes por mais duas semanas após a colheita. Já a superexpressão destes genes provocou o amolecimento precoce no estágio de maturação de 25 D.A.P. Os autores afirmam que a atuação dessas

enzimas na rede xiloglucano-celulose, além da ação enzimática, promove a ruptura das ligações de xiloglucano e celulose de forma mecânica, afrouxando a parede celular e tornando-a mais suscetível a ação de outras enzimas que degradam a parede.

6.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE POLIGACTURONASE

Conforme demonstra a Figura 18, houve aumento na atividade das poligalacturonases de 15 para 25 D.A.P e a mesma manteve-se contínua até a maturação completa do fruto. Isso corrobora o aumento da expressão de *CmPGN* aos 25 D.A.P, indicando uma relação entre a expressão desse gene e a atividade enzimática. Embora a expressão de *CmPGN* tenha diminuído aos 35 e 45 D.A.P, a atividade das poligalacturonases permaneceu alta, sugerindo uma regulação pós-transcricional ou ação de outros fatores regulatórios.

Figura 18. Atividade enzimática das poligacturonases (PG) em frutos de melão cv. Eldorado ao longo da maturação. quantidade de ácido galacturônico liberado μmol por minuto. Foram utilizadas as médias dos tratamentos, apresentando o erro padrão, letra diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) a teste de Tukey a 5%.



Fonte: A autora.

O estudo conduzido por Ke *et al.* (2018) revelou que o gene *SIPG14* de tomate, foi mais expresso em frutos jovens. A supressão desse gene em 99% não teve impacto na solubilização da pectina nem no amolecimento da fruta, isso se explica pelo fato de a

expressão de genes não necessariamente resulta em transcritos. Embora a atividade de um único gene de enzimas PG possa não ser suficiente para influenciar a textura, as PG são controladas por famílias multigênicas e seus fatores de transcrição, desempenham um papel significativo na deterioração do tecido em estádios posteriores de maturação.

Villarreal *et al.* (2008) avaliaram a atividade da PG em morango ‘Toyonaka’ em função dos estádios de maturação, desde frutos verdes até totalmente vermelhos. Os autores observaram que a atividade da PG aumentou continuamente dos estádios verdes até o estágio de frutos vermelhos, com uma expressão enzimática consideravelmente maior a partir no início estágio vermelho. No estágio de frutos completamente vermelhos, a atividade do PG em ‘Toyonaka’ foi aproximadamente 1,8 e 3,8 vezes maior do que nos estágios maduros. Esses dados corroboram os encontrados neste trabalho, onde a atividade enzimática de PG aumentou aos 25 D.A.P e permaneceu contínua até o fim da maturação

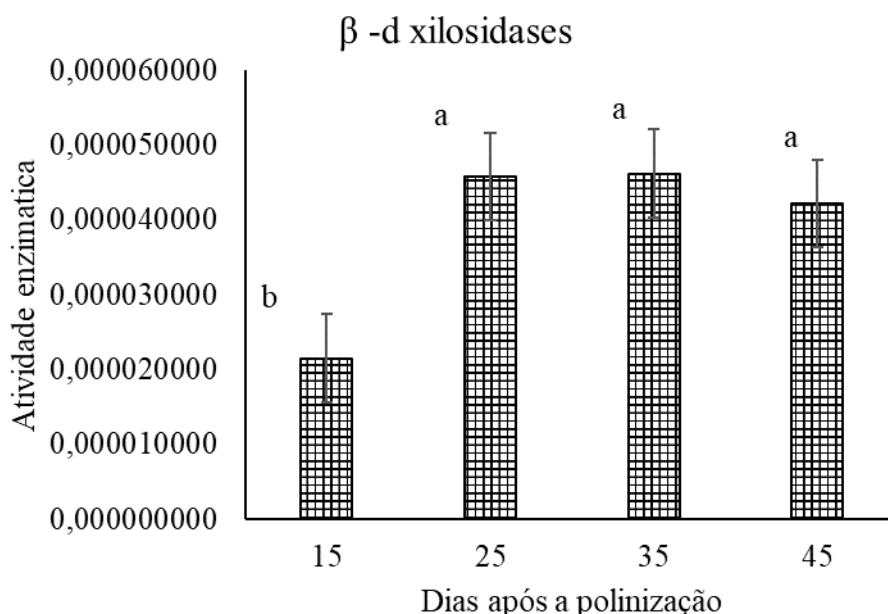
Outros fatores como hormônios, além do etileno, principalmente AUX e ABA, podem estar influenciando a atividade da poligalacturonase, a estabilidade das enzimas e possíveis mecanismos de regulação pós-traducional podem estar contribuindo para a manutenção da atividade das poligalacturonases mesmo após a diminuição da expressão gênica de *CmPGN* (Saladiê *et al.*, 2015).

Esses resultados indicam uma complexa regulação da atividade das poligalacturonases durante o desenvolvimento do fruto, envolvendo múltiplos níveis de controle molecular e possíveis interações com outros processos fisiológicos. Essa compreensão é fundamental para elucidar os mecanismos subjacentes ao amadurecimento e qualidade dos frutos.

6.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA β -D-XYLOSIDASE

As observações da atividade enzimática de β -d-xylosidases ao longo da maturação estão disponíveis na Figura 19. É possível identificar que houve baixa atividade aos 15 D.A.P e aumento significativo aos 25 D.A.P, mantendo-se elevada até a completa maturação dos frutos. Isto sugere uma regulação dinâmica dessas enzimas ao longo do desenvolvimento do fruto.

Figura 19. Atividade enzimática das β -d-xylosidases em frutos de melão ‘Eldorado’ aos 15, 25, 35 e 45 D.A.P. A unidade de enzima é medida em quantidade de xilose liberado $\mu\text{mol}/\text{minuto}$. Foram utilizadas as médias dos tratamentos, apresentando o erro padrão, letra diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) a teste de Tukey a 5%.



Fonte: A autora.

Durante o processo de maturação do fruto ocorrem mudanças significativas na composição da parede celular, incluindo a degradação de polissacarídeos como a xilana. O aumento na atividade das β -d-xylosidases pode ser parte desse processo, permitindo a remodelação da parede celular para acomodar o crescimento e amadurecimento do fruto.

A expressão de genes relacionados às β -d-xylosidases pode ser induzida por sinais hormonais, como o etileno. Em análises transcriptômicas conduzidas por Saladiê *et al.* (2015), enzimas como poligacturonases, endo-1,3- β -glicosidases e β -d-xylosidases foram observadas em melão ‘Védrantais’, enquanto proteínas arabinogalactanasas semelhantes à fascilina foram mais encontradas em melão ‘Piel de sapo’. No entanto, em alguns frutos não climatéricos, como os melões ‘Eldorado’ e ‘Piel de sapo’, que não possuem picos de etileno, a regulação hormonal pode ocorrer por meio de outros hormônios, como ABA e AUX (Saladiê *et al.*, 2015). Portanto, a dinâmica observada na atividade das β -d-xylosidases pode refletir uma resposta coordenada a sinais hormonais específicos ao longo do desenvolvimento do fruto.

O estudo realizado por Martínez *et al.* (2004) investigou o gene *FaXyl1*, que codifica a enzima β -xylosidase, observando atividade enzimática em todos os estágios de maturação, com picos ocorrendo nos 25–50% de frutos vermelhos. A detecção de baixa atividade em estágios imaturos, onde a expressão de *FaXyl1* não foi encontrada, sugere a presença de

outros genes semelhantes a β -xilosidases. Tanto a expressão de *FaXyl1* quanto a atividade total da β -xilosidase foram identificadas como reguladas negativamente pelas auxinas, seguindo um padrão comum em muitos processos relacionados ao amadurecimento no morango. Este trabalho assemelha-se ao aqui encontrando, em que houve baixa atividade da β -xilosidase aos 15 D.A.P. em melão.

Takizawa *et al.* (2014) estudaram a atividade das enzimas β -xilosidases em frutos de tomate em diferentes estágios de maturação e observaram que as maiores atividades enzimáticas ocorreram aos 15 D.A.P e aos 30 D.A.P, correspondendo à análise de expressão dos genes *SlXXT1*, *SlXXT2* e *SlXXT5*, os quais também foram mais expressos nos mesmos períodos. Estas proteínas são responsáveis pela degradação do xiloglucano e seus genes são mais expressos durante os períodos de expansão dos frutos, causando o afrouxamento da parede celular durante a maturação. Este estudo corrobora os dados encontrados no presente trabalho, em que houve maior expressão do gene *CmXYL* e o aumento da atividade enzimática aos 25 D.A.P, estágio intermediário, onde os frutos estão em expansão, comprovando a hipótese de que este estágio é onde ocorrem as maiores mudanças metabólicas relacionadas à expressão de genes e acúmulo de proteínas que atuam na degradação da parede celular dos frutos.

Bustamante *et al.* (2009) investigaram o efeito da aplicação de ABA, AUX, ácido giberélico (GA) e etileno em genes e proteínas da β -xilosidase em morangos. A aplicação de AUX regulou negativamente a atividade enzimática, enquanto o ABA aumentou a expressão do gene, porém não teve efeito sobre a atividade enzimática, assim como o etileno e o GA.

A regulação pós-traducional, como modificações proteicas ou interações com outras moléculas, pode influenciar significativamente a atividade das enzimas. Portanto, o aumento na atividade das β -d-xylosidases pode ser resultado não apenas do aumento na expressão do gene *CmXYL*, mas também de modificações pós-traducionais das enzimas, que aumentam suas eficiências

6.5 INTERAÇÕES ENTRE GENES, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E FIRMEZA

Análise de correlações entre a expressão gênica atividade enzimática e firmeza dos frutos (Figura 20). O aumento na expressão do gene *CmAGL1* foi positivamente correlacionado ao aumento da expressão de *CmPGN*, esta correlação é muito forte. Isso

sugere que esses dois genes podem estar envolvidos em vias metabólicas ou processos biológicos semelhantes, ou que um regula a expressão do outro. O gene *CmAGL1* desempenha um papel fundamental no ciclo da sacarose ao hidrolisar a rafinose e a estaquiose e liberar galactose (Stroka *et al.*, 2024). A galactose é o principal componente das pectinas, que são polissacarídeos que circundam a matriz de celulose-hemicelulose, conferindo hidratação e adesão celular. Por sua vez, as pectinas são os principais substratos das poligalacturonases, cuja ação, juntamente com fatores hormonais e ambientais, desempenha um papel crucial na modulação da firmeza dos frutos (Kohli; Gupta, 2015; Stroka *et al.*, 2024; Zdunek; Pieczywek; Cybulska, 2021).

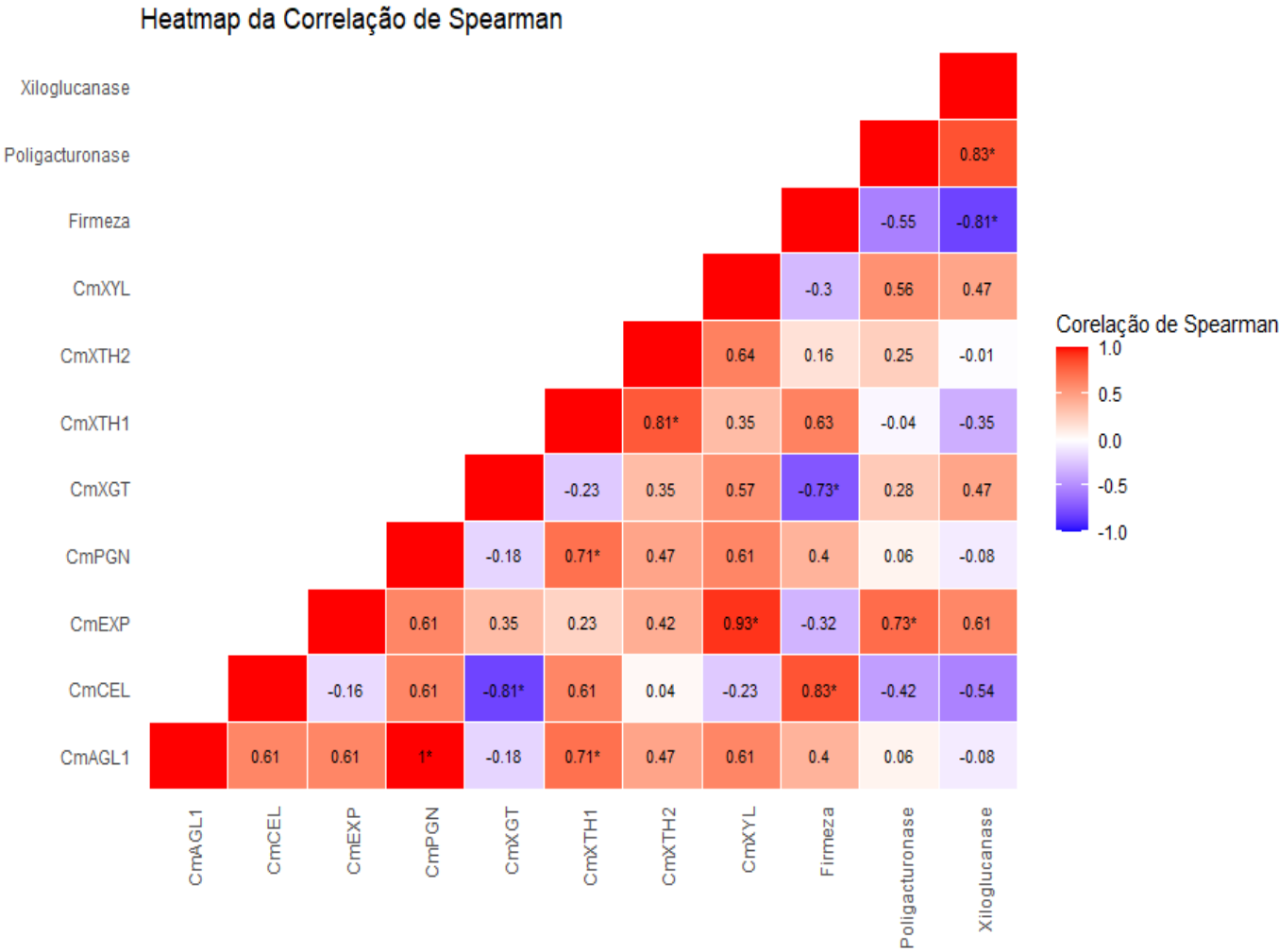
Uma correlação positiva forte entre os genes *CmAGL1* e *CmXTH1* foi observada, sugerindo uma possível interação entre esses genes. O xiloglucano é uma macromolécula composta por unidades de β -D-Glc, xilose, galactose e fucose (Ishida; Yokoyama, 2022). Enquanto o aumento da expressão do gene *CmAGL1* responsável pela codificação da enzima α -galactosidase, induz o aumento da atividade dessa enzima, aumentando a galactose, no ciclo da sacarose, que é convertida em UDP-Glc (Schemberger *et al.*, 2020), que por sua vez é convertido em β -D-Glc(1 $\rightarrow$ 4), a principal fonte para a formação do esqueleto do xiloglucano (Rashmi; Siddalingamurthy, 2018).

As enzimas XTH são responsáveis pela transglicosilação ou hidrólise do xiloglucano, promovendo o afrouxamento da parede celular (Li *et al.*, 2023). Durante o amadurecimento, um aumento nos níveis de glicose e galactose, derivados da conversão de rafinose e estaquiose catalisada pela enzima α -galactosidase, fornece substrato adicional para a síntese de xiloglucano, o principal substrato das XTHs. Conforme a expressão do gene *CmAGL1* aumenta, também aumenta a expressão de XTHs, promovendo a degradação do xiloglucano, o que resulta na queda de firmeza aos 25 D.A.P.

Uma correlação negativa muito forte entre a expressão dos genes *CmCEL* e *CmXGT* foi visualizada. A expressão de *CmXGT* está associada ao aumento da atividade da xiloglucano glicosiltransferase-4, que desempenha um papel na biossíntese de xiloglucano, semelhante às glicosiltransferases envolvidas na formação da celulose (Gibeaut, 2000), mas em decorrência da expressão tardia isso pode não acontecer. Por outro lado, as endoglucanases (*CmCEL*) estão envolvidas na degradação da celulose, catalisando a hidrólise e clivagem das ligações β -(1,4) glicosídicas, resultando na formação de celodextrinas (Jara *et al.*, 2019; Shrotri; Kobayashi; Fukuoka, 2017). O aumento na síntese de xiloglucano, que

forma uma matriz ao redor das microfibrilas de celulose, pode impedir a ação enzimática direto às microfibrilas de celulose pelas endoglucanases (Ishida; Yokoyama, 2022; Jara *et al.*, 2019). Portanto, o aumento na expressão do gene *CmXGT*, responsável pela síntese de xiloglucano, pode levar a uma redução na expressão de *CmCEL*, responsável pela degradação da celulose.

Figura 20. Análise de correlação de Spearman entre o padrão de expressão de genes de parede celular, atividade enzimática e firmeza em frutos de melão amarelo ‘Eldorado’. Os números nos quadrados indicam se as correlações são positivas, muito fracas (0,2), fracas (0,2 a 0,4), moderadas (0,4 a 0,6), fortes (0,6 a 0,8) ou muito fortes (0,8 a 1,0) ou negativas, muito fracas (-0,2), fracas (-0,2 a -0,4), moderadas (-0,4 a -0,6), fortes (-0,6 a -0,8) ou muito fortes (-0,8 a -1,0).



Fonte: a autora.

Uma correlação negativa muito forte entre a expressão dos genes *CmCEL* e *CmXGT* foi visualizada. A expressão de *CmXGT* está associada ao aumento da atividade da xiloglucano glicosiltransferase-4, que desempenha um papel na biossíntese de xiloglucano,

semelhante às glicosiltransferases envolvidas na formação da celulose (Gibeaut, 2000), mas em decorrência da expressão tardia isso pode não acontecer. Por outro lado, as endoglucanases (*CmCEL*) estão envolvidas na degradação da celulose, catalisando a hidrólise e clivagem das ligações β -(1,4) glicosídicas, resultando na formação de celodextrinas (Jara *et al.*, 2019; Shrotri; Kobayashi; Fukuoka, 2017). O aumento na síntese de xiloglucano, que forma uma matriz ao redor das microfibrilas de celulose, pode impedir a ação enzimática direto às microfibrilas de celulose pelas endoglucanases (Ishida; Yokoyama, 2022; Jara *et al.*, 2019). Portanto, o aumento na expressão do gene *CmXGT*, responsável pela síntese de xiloglucano, pode levar a uma redução na expressão de *CmCEL*, responsável pela degradação da celulose.

Foi observada uma correlação positiva muito forte entre o aumento da expressão de *CmCEL* e a queda da firmeza. As endoglucanases são responsáveis pela clivagem das ligações β -(1,4) da celulose, o que resulta no afrouxamento e comprometimento da estrutura da rede de microfibrilas de celulose e xiloglucano. Isso leva ao amaciamento da polpa dos frutos e, conseqüentemente, à perda de firmeza (Valenzuela-Riffo; Morales-quintana, 2019).

A expressão de *CmXGT* demonstra uma correlação positiva forte com a firmeza dos frutos. Conforme documentado na literatura, as xiloglucano glicosiltransferases 4 estão intrinsecamente ligadas à síntese de xiloglucano (Gibeaut, 2000).

Foi observada uma correlação positiva muito forte significativa entre os genes *CmXTH1* e *CmXTH2*. Indicando uma possível cooperação ou regulação mútua entre esses dois genes da mesma família multigênica. As enzimas XTHs podem realizar a transglicosilação promovendo clivagem e reconexão em outras moléculas de xiloglucano, ou a hidrólise do xiloglucano quebrando as ligações β -(1,4) glicosídicas, promovendo expansão, afrouxamento de parede e queda na firmeza dos frutos (Ishida; Yokoyama, 2022; Saladié *et al.*, 2015)

Observou-se que o aumento na expressão de *CmXTH1* tem correlação positiva muito forte com o aumento da expressão de *CmPGN*. As poligalacturonases são responsáveis pela hidrólise da pectina e são codificada por genes PG, o aumento na expressão de *PGN* pode resultar em aumento a atividade da PG, deixando a pectina mais solúvel e possibilitando a ação das XTHs como hidrolases que degradam o xiloglucano (Ishida; Yokoyama, 2022), aumentando a porosidade na parede, o afrouxamento celular e queda na firmeza (Anderson, 2015; Yang *et al.*, 2018).

Foi observada uma correlação positiva forte entre a expressão de *CmEXP* e a atividade da poligalacturonase (PG). As poligalacturonases são as principais enzimas que atuam na degradação de pectinas (Yang *et al.*, 2018). Quando ocorre o ataque enzimático em decorrência de PG, a matriz de celulose e xiloglucano fica exposta, tornando-se mais suscetível à ação de proteínas expansinas, responsáveis pela quebra das pontes de hidrogênio entre a rede de microfibrilas de celulose e xiloglucano, amaciando os frutos (Belfield *et al.*, 2005).

O aumento da atividade da β -D-xylosidase tem correlação negativa muito forte com a queda da firmeza aos 25 D.A.P ($p < 0,0210$). As β -D-xylosidases atuam na hidrólise da xilose ligada ao xiloglucano. A solubilização do xiloglucano aumenta a porosidade da parede, promove o afrouxamento celular e consequentemente a perda da firmeza em frutos durante a maturação, liberando os polímeros de ácido galacturônico para degradação enzimática (Falara *et al.*, 2011).

Observa-se também correlação positiva muito forte entre a atividade das PGs e das β -D-xylosidases. Sabe-se que a atividade das PGs resulta na despolimerização das pectinas, tornando a parede mais porosa (Nishiyama *et al.*, 2007), permitindo a ação de enzimas que degradam o xilose, assim como as β -D-xylosidases (Falara *et al.*, 2011).

7. CONCLUSÕES

Em síntese, os genes identificados como responsáveis pela degradação da parede celular no melão amarelo cv. Eldorado foram: *CmAGL1* (α -galactosidase), *CmCEL* (endoglucanase) *CmXYL* (Beta-D-xilosidase família de proteínas) *CmXTH1* e *CmXTH2* (xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase), *CmPGN* (poligalacturonase-1 não-catalítica subunidade beta), *CmEXP* (expansina-like A2), estes genes apresentaram níveis de expressão mais elevados aos 25 dias após a polinização (D.A.P.), coincidindo com a fase em que a firmeza dos frutos diminui devido à expansão celular. Em paralelo, o gene *CmXGT*, relacionado à biossíntese de xiloglucano, destacou-se por sua expressão mais pronunciada aos 45 D.A.P. As análises enzimáticas das poligalacturonases e das β -D-xilosidases seguiram um padrão semelhante, com aumento significativo de atividade aos 25 D.A.P. e manutenção dessa atividade até os 45 D.A.P.

Observaram-se correlações positivas entre a expressão de *CmAGL1* e *CmPGN*, *CmAGL1* e *CmXTH1*, *CmCEL* e *CmXGT* *CmXGT* e a firmeza dos frutos, *CmXTH1* e *CmPGN*, *CmXTH1* e *CmXTH2*, bem como entre a expressão de *CmEXP* e a atividade de poligalacturonases, e entre a atividade das β -D-xilosidases e a atividade de poligalacturonases. Por outro lado, foram identificadas correlações negativas entre a expressão de, entre a expressão de, e entre a atividade das β -D-xilosidases e a firmeza. Portanto, conclui-se que o estágio de maturação mais relevante para o estudo dos genes relacionados à parede celular no melão amarelo cv. Eldorado é aos 25 D.A.P. Nesse período, ocorrem aumentos na expressão de genes responsáveis pelo controle da expansão, extensibilidade e porosidade da parede celular, resultando em uma queda significativa na firmeza dos frutos durante a maturação. Este período é fundamental para os estudos relacionados à parede celular nessa cultura.

Este trabalho lança luz sobre novas descobertas e perspectivas relacionadas ao padrão de maturação de frutos de melão não climatéricos. Ele servirá como uma base sólida para estudos subsequentes que buscam analisar os diversos fatores que interferem na expressão gênica, atividade enzimática e nas interações entre os genes, especialmente em relação à influência dos hormônios vegetais. Além disso, esta pesquisa adicionou informações valiosas ao conhecimento do genoma do melão. Este estudo representa um avanço na compreensão dos processos de maturação em frutos de melão não- climatérico, contribuindo para avanços futuros na pós colheita de frutas, mas também abrem novas portas para o melhoramento genético de cultivares.

REFERENCIAS

ABRAFRUTAS. Associação Brasileira dos Produtores Exportadores de Frutas e Derivados. **Estatística de Exportações de Frutas no Primeiro Semestre de 2024.**

ABUQAMAR, S.; AJEB, S.; SHAM, A.; ENAN, M. R.; IRATNI, R. A mutation in the expansin-like A2 gene enhances resistance to necrotrophic fungi and hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 8, p. 813–827, 2013.

ANDERSON, C. T. We be jammin’: an update on pectin biosynthesis, trafficking and dynamics. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 2, p. 495–502, 2015.

ATKINSON, R. G.; SHARMA, N. N.; HALLETT, I. C.; JOHNSTON, S. L.; SCHRÖDER, R. Actinidia eriantha: A parental species for breeding kiwifruit with novel peelability and health attributes. **New Zealand Journal of Forestry Science**, v. 39, n. 1, p. 207–216, 2009.

AYUB, R.; GUIS, M.; AMOR, M. BEN; GILLOT, L.; ROUSTAN, J. P.; LATCHÉ, A.; BOUZAYEN, M.; PECH, J. C. Expression of acc oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. **Nature Biotechnology**, v. 14, n. 7, p. 862–866, 1996.

BARNES, W. J.; KOJ, S.; BLACK, I. M.; ARCHER-HARTMANN, S. A.; AZADI, P.; URBANOWICZ, B. R.; PEÑA, M. J.; O’NEILL, M. A. Protocols for isolating and characterizing polysaccharides from plant cell walls: a case study using rhamnogalacturonan-II. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. 1, p. 142, 2021.

BEGUM, R. A.; FRY, S. C. Arabinogalactan-Proteins as Boron-Acting Enzymes, Cross-Linking the Rhamnogalacturonan-II Domains of Pectin. **Plants**, v. 12, n. 23, 2023.

BELFIELD, E. J.; RUPERTI, B.; ROBERTS, J. A.; MCQUEEN-MASON, S. Changes in expansin activity and gene expression during ethylene-promoted leaflet abscission in *Sambucus nigra*. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 413, p. 817–823, 2005.

BIANCHI, T.; GUERRERO, L.; GRATACÓS-CUBARSÍ, M.; CLARET, A.; ARGYRIS, J.; GARCIA-MAS, J.; HORTÓS, M. Textural properties of different melon (*Cucumis melo* L.) fruit types: Sensory and physical-chemical evaluation. **Scientia Horticulturae**, v. 201, p. 46–56, 2016.

BOVI, G. G. **Óleo de Buriti (*Mauritia flexuosa* L.). nanoemulsionado: produção por método de baixa energia, caracterização físico-química das dispersões e incorporação em bebida isotônica.** Dissertação (mestrado em ciências). Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

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

BUSTAMANTE, C. A.; CIVELLO, P. M.; MARTÍNEZ, G. A. Cloning of the promoter

region of β -xylosidase (FaXyl1) gene and effect of plant growth regulators on the expression of FaXyl1 in strawberry fruit. **Plant Science**, v. 177, n. 1, p. 49–56, 2009.

CAMPOS, G. S. DE; AYUB, R. A.; ETTO, R. M. High-quality total RNA isolation from melon (*Cucumis melo* L.) fruits rich in polysaccharides. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 4, p. 2201–2208, 2017.

CATALÁ, C.; ROSE, J. K. C.; BENNETT, A. B. Auxin-Regulated Genes Encoding Cell Wall-Modifying Proteins Are Expressed during Early Tomato Fruit Growth. **Plant Physiology**, v. 122, n. 2, p. 527–534, 1 fev. 2000.

CHEN, D.; GUO, P.; CHEN, S.; CAO, Y.; JI, W.; LEI, X.; LIU, L.; ZHAO, P.; WANG, R.; QI, C.; LIU, Y.; HE, H. Properties of xyloglucan hydrogel as the biomedical sustained-release carriers. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 23, n. 4, p. 955–962, 2012.

CHIKH-ROUHO, H.; TLILI, I.; ILAHY, R.; R'HIM, T.; STA-BABA, R. Fruit quality assessment and characterization of melon genotypes. **International Journal of Vegetable Science**, v. 27, n. 1, p. 3–19, 2021.

CHOURASIA, A.; SANE, V. A.; SINGH, R. K.; NATH, P. Isolation and characterization of the MiCel1 gene from mango: ripening related expression and enhanced endoglucanase activity during softening. **Plant growth regulation**, v. 56, p. 117–127, 2008.

COSGROVE, D. J. Loosening of plant cell walls by expansins. **Nature**, v. 407, p. 321–326, 2000.

COSGROVE, D. J. Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 25, p. 162–172, 2015.

COSGROVE, D. J. Building an extensible cell wall. **Plant Physiology**, v. 189, n. 3, p. 1246–1277, 2022.

DOS-SANTOS, N.; JIMÉNEZ-ARAUJO, A.; RODRÍGUEZ-ARCOS, R.; FERNÁNDEZ-TRUJILLO, J. P. Cell Wall Polysaccharides of Near-Isogenic Lines of Melon (*Cucumis melo* L.) and Their Inbred Parentals Which Show Differential Flesh Firmness or Physiological Behavior. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 14, p. 7773–7784, 27 jul. 2011.

ELHASSAN, S. Y. M.; ABU-GOUKH, A.-B. A. Role of cellulase enzyme in fruit softening during muskmelon fruit ripening. **Am J Sci Ind Res**, v. 7, n. 4, p. 98–105, 2016.

ENDL, J.; ACHIGAN-DAKO, E. G.; PANDEY, A. K.; MONFORTE, A. J.; PICO, B.; SCHAEFER, H. Repeated domestication of melon (*Cucumis melo*) in Africa and Asia and a new close relative from India. **American Journal of Botany**, v. 105, n. 10, p. 1662–1671, 2018.

FALARA, V.; MANGANARIS, G. A.; ZILLOTTO, F.; MANGANARIS, A.; BONGHI, C.;

RAMINA, A.; KANELIS, A. K. A β -D-xylosidase and a PR-4B precursor identified as genes accounting for differences in peach cold storage tolerance. **Functional and Integrative Genomics**, v. 11, n. 2, p. 357–368, 2011.

GAVANDE, P. V.; GOYAL, A.; FONTES, C. M. G. A. Chapter 1 - Carbohydrates and Carbohydrate-Active enZymes (CAZyme): An overview. *In*: GOYAL, A.; SHARMA, K. (Eds.). . **Glycoside Hydrolases**. Foundations and Frontiers in Enzymology. [s.l.] Academic Press, 2023. p. 1–23.

GIBEAUT, D. M. Nucleotide sugars and glycosyltransferases for synthesis of cell wall matrix polysaccharides. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 69–80, 2000.

GIOVANNONI, J. J. Genetic regulation of fruit development and ripening. **Plant Cell**, v. 16, n. SUPPL., p. 170–181, 2004.

GROSS, K. C. A Rapid and Sensitive Spectrophotometric Method for Assaying Polygalacturonase Using 2-Cyanoacetamide1. **HortScience**, v. 17, n. 6, p. 933–934, 1982.

GUNNAIAH, R.; SHET, R. M.; LAMANI, A.; RADHIKA, D. H.; JAGADEESHA, R. C. Genetic diversity assessment and gene expression analysis of prolonged shelf-life genes in Mangalore melon (*Cucumis melo* ssp. *agrestis* var. *acidulus*). **Euphytica**, v. 217, n. 8, p. 158, 2021.

HAYASHI, T.; KAIDA, R. Functions of xyloglucan in plant cells. **Molecular Plant**, v. 4, n. 1, p. 17–24, 2011.

ISHIDA, K.; YOKOYAMA, R. Reconsidering the function of the xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase family. **Journal of Plant Research**, v. 135, n. 2, p. 145–156, 2022.

JARA, K.; CASTRO, R. I.; RAMOS, P.; PARRA-PALMA, C.; VALENZUELA-RIFFO, F.; MORALES-QUINTANA, L. Molecular insights into FaEG1, a strawberry endoglucanase enzyme expressed during strawberry fruit ripening. **Plants**, v. 8, n. 6, p. 140, 2019.

JIA, H.; XIE, Z.; WANG, C.; SHANGGUAN, L.; QIAN, N.; CUI, M.; LIU, Z.; ZHENG, T.; WANG, M.; FANG, J. Absciscic acid, sucrose, and auxin coordinately regulate berry ripening process of the Fujiminori grape. **Functional & Integrative Genomics**, v. 17, n. 4, p. 441–457, 2017.

JIANG, F.; LOPEZ, A.; JEON, S.; FREITAS, S. T. DE; YU, Q.; WU, Z.; LABAVITCH, J. M.; TIAN, S.; POWELL, A. L. T.; MITCHAM, E. Disassembly of the fruit cell wall by the ripening-associated polygalacturonase and expansin influences tomato cracking. **Horticulture Research**, v. 6, n. 1, 2019.

JORDI, G.-M. *et al.* The genome of melon (*Cucumis melo* L.). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 29, p. 11872–11877, 2012.

KE, X.; WANG, H.; LI, Y.; ZHU, B.; ZANG, Y.; HE, Y.; CAO, J.; ZHU, Z.; YU, Y.

Genome-Wide Identification and Analysis of Polygalacturonase Genes in *Solanum lycopersicum*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, 2018.

KERBAUY, G. B. Fisiologia vegetal. 2008.

KOHLI, P.; GUPTA, R. Alkaline pectinases: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 279–285, 2015.

KUHN, N.; ARELLANO, M.; PONCE, C.; HODAR, C.; CORREA, F.; MULTARI, S.; MARTENS, S.; CARRERA, E.; DONOSO, J. M.; MEISEL, L. A. Transcriptomic and DNA methylation modifications during fruit ripening and in response to ABA treatment in sweet cherry. **bioRxiv**, p. 2012–2022, 2022.

LEROUXEL, O.; CAVALIER, D. M.; LIEPMAN, A. H.; KEEGSTRA, K. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides - a complex process. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 6, p. 621–630, 2006.

LI, M.; HAN, D.; LIU, W. Non-destructive measurement of soluble solids content of three melon cultivars using portable visible/near infrared spectroscopy. **Biosystems Engineering**, v. 188, p. 31–39, 2019.

LI, X.; WANG, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, A.; YOU, C.-X. Regulation of fleshy fruit ripening: from transcription factors to epigenetic modifications. **Horticulture Research**, v. 9, p. uhac013, 5 jan. 2022.

LI, X.; SU, Q.; FENG, Y.; GAO, X.; WANG, B.; TAHIR, M. M.; YANG, H.; ZHAO, Z. Identification and analysis of the xyloglucan endotransferase/hydrolase (XTH) family genes in apple. **Scientia Horticulturae**, v. 315, p. 111990, 2023.

LIONETTI, V.; FRANCOCCI, F.; FERRARI, S.; VOLPI, C.; BELLINCAMPI, D.; GALLETTI, R.; D'OVIDIO, R.; LORENZO, G. DE; CERVONE, F. Engineering the cell wall by reducing de-methyl-esterified homogalacturonan improves saccharification of plant tissues for bioconversion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 2, p. 616–621, 2010.

LOS, K. K. D. S.; SCHEMBERGER, M. O.; STROKA, M. A.; PINTO, A.; GALVÃO, C. W.; ETTO, R. M.; REGINA, A.; BAPTISTÃO, G.; AYUB, R. A. Relative expression of genes related to volatile organic compounds in non-climacteric and climacteric melons. **Acta Scientiarum**, v.46, p. 1–12, 2024.

MA, X.; LI, C.; YUAN, Y.; ZHAO, M.; LI, J. Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase genes LcXTH4/7/19 are involved in fruitlet abscission and are activated by LcEIL2/3 in litchi. **Physiologia Plantarum**, v. 173, n. 3, p. 1136–1146, 2021.

MARTÍNEZ, G. A.; CHAVES, A. R.; CIVELLO, P. M. β -xylosidase activity and expression of a β -xylosidase gene during strawberry fruit ripening. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 89–96, 2004.

MATTUS-ARAYA, E.; GUAJARDO, J.; HERRERA, R.; MOYA-LEÓN, M. A. ABA Speeds Up the Progress of Color in Developing *F. chiloensis* Fruit through the Activation of PAL, CHS and ANS, Key Genes of the Phenylpropanoid/Flavonoid and Anthocyanin Pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 7, 2022.

MEJÍA-MENDOZA, M. A.; GARCIDUEÑAS-PIÑA, C.; PADILLA-RAMÍREZ, J. S.; SORIA-GUERRA, R. E.; MORALES-DOMÍNGUEZ, J. F. Identification in silico and expression analysis of a β -1-4-endoglucanase and β -galactosidase genes related to ripening in guava fruit. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 20, p. 1–11, 2022.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 266–277, 2008.

MOORE, T.; BENNETT, A. B. Tomato Fruit Polygalacturonase Isozyme 1 (Characterization of the [beta] Subunit and Its State of Assembly in Vivo). **Plant Physiology**, v. 106, n. 4, p. 1461–1469, 1994.

MORENO, E.; OBANDO, J. M.; DOS-SANTOS, N.; FERNÁNDEZ-TRUJILLO, J. P.; MONFORTE, A. J.; GARCIA-MAS, J. Candidate genes and QTLs for fruit ripening and softening in melon. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 116, n. 4, p. 589–602, 2008.

MUÑOZ-BERTOMEU, J.; MIEDES, E.; LORENCES, E. P. Expression of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) genes and XET activity in ethylene treated apple and tomato fruits. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, n. 13, p. 1194–1201, 2013.

NISHIYAMA, K.; GUIS, M.; ROSE, J. K. C.; KUBO, Y.; BENNETT, K. A.; WANGJIN, L.; KATO, K.; USHIJIMA, K.; NAKANO, R.; INABA, A.; BOUZAYEN, M.; LATSCHÉ, A.; PECH, J. C.; BENNETT, A. B. Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in Charentais melon. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 6, p. 1281–1290, 2007.

PAN, H.; SUN, Y.; QIAO, M.; QI, H. Beta-galactosidase gene family genome-wide identification and expression analysis of members related to fruit softening in melon (*Cucumis melo* L.). **BMC Genomics**, v. 23, n. 1, p. 795, 2022.

PANIAGUA, C.; POSÉ, S.; MORRIS, V. J.; KIRBY, A. R.; QUESADA, M. A.; MERCADO, J. A. Fruit softening and pectin disassembly: an overview of nanostructural pectin modifications assessed by atomic force microscopy. **Annals of botany**, v. 114, n. 6, p. 1375–1383, 2014.

PARIS, H. S.; TADMOR, Y.; SCHAFFER, A. A. **Cucurbitaceae Melons, Squash, Cucumber**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2016. v. 3

PAULY, M.; KEEGSTRA, K. Biosynthesis of the Plant Cell Wall Matrix Polysaccharide Xyloglucan*. **Annual Review of Plant Biology**, v. 67, n. February, p. 235–259, 2016.

PECH, J. C.; BOUZAYEN, M.; LATSCHÉ, A. 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.

PENG, Z.; LIU, G.; LI, H.; WANG, Y.; GAO, H.; JEMRIĆ, T.; FU, D. Molecular and Genetic Events Determining the Softening of Fleshy Fruits: A Comprehensive Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 20, 2022.

POLKO, J. K.; KIEBER, J. J. The regulation of cellulose biosynthesis in plants. **The Plant Cell**, v. 31, n. 2, p. 282–296, 2019.

PONTES, F. M.; SARMENTO, J. D. A.; MEDEIROS, E. V DE; MORAIS, P. L. D.; NUNES, G. H. DE S. Physical and chemical properties, pectinases activity, and cell wall pectin of *Acidulus*, *Momordica*, *Inodorus* and *Cantalupensis* melons with different ripening degree at harvest. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 49, n. 2, p. 12062, 2021.

POTTIER, D.; ROITSCH, T.; PERSSON, S. Cell wall regulation by carbon allocation and sugar signaling. **The Cell Surface**, p. 100096, 2023.

PUJOL, M.; GARCIA-MAS, J. Regulation of climacteric fruit ripening in melon: recent advances and future challenges. **Journal of Experimental Botany**, v. 74, n. 20, p. 6224–6236, 31 out. 2023.

RASHMI, R.; SIDDALINGAMURTHY, K. R. Microbial xyloglucanases: a comprehensive review. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 36, n. 4, p. 280–295, 2018.

ROSE, J. K. C.; HADFIELD, K. A.; LABAVITCH, J. M.; BENNETT, A. B. Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit. **Plant Physiology**, v. 117, n. 2, p. 345–361, 1998.

SALADIÉ, M.; ROSE, J. K. C.; COSGROVE, D. J.; CATALÁ, C. Characterization of a new xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) from ripening tomato fruit and implications for the diverse modes of enzymic action. **Plant Journal**, v. 47, n. 2, p. 282–295, 2006.

SALADIÉ, M.; CAÑIZARES, J.; PHILLIPS, MICHAEL A.; RODRIGUEZ-CONCEPCION, M.; LARRIGAUDIÈRE, C.; GIBON, Y.; STITT, M.; LUNN, J. E.; GARCIA-MAS, J. Comparative transcriptional profiling analysis of developing melon (*Cucumis melo* L.) fruit from climacteric and non-climacteric varieties. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–20, 2015.

SALADIÉ, M.; CAÑIZARES, J.; PHILLIPS, MICHAEL A.; RODRIGUEZ-CONCEPCION, M.; LARRIGAUDIÈRE, C.; GIBON, Y.; STITT, M.; LUNN, J. E.; GARCIA-MAS, J. Comparative transcriptional profiling analysis of developing melon (*Cucumis melo* L.) fruit from climacteric and non-climacteric varieties. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 440, 2015.

SAMPEDRO, J.; COSGROVE, D. J. The expansin superfamily. **Genome Biology**, v. 6, n. 12, p. 242, 2005.

SCHAFFER, A. A.; PARIS, H. S. **Melons, Squashes, and Gourds**. [s.l.] Elsevier, 2016.

SCHEMBERGER, M. O.; STROKA, M. A.; REIS, L.; SOUZA LOS, K. K. DE; ARAUJO, G. A. T. DE; SFEIR, M. Z. T.; GALVÃO, C. W.; ETTO, R. M.; BAPTISTÃO, A. R. G.; AYUB, R. A. Transcriptome profiling of non-climacteric ‘yellow’ melon during ripening: insights on sugar metabolism. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 262, 2020.

SHI, Y.; LI, B.-J.; GRIERSON, D.; CHEN, K.-S. Insights into cell wall changes during fruit softening from transgenic and naturally occurring mutants. **Plant Physiology**, p. kiad128, 2023.

SHROTRI, A.; KOBAYASHI, H.; FUKUOKA, A. **Catalytic Conversion of Structural Carbohydrates and Lignin to Chemicals**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017a. v. 60. Catalytic conversion of structural carbohydrates and lignin to chemicals. Elsevier, 2017b. v. 60p. 59–123.

STOCK, D. **Conversão de pectina cítrica a ácido D-Galacturônico usando pectinases produzidas por fermentação no estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2013.

STROKA, M. A.; REIS, L.; SOUZA LOS, K. K. DE; PINTO, C. A.; GUSTANI, F. M.; FORNEY, C. F.; ETTO, R. M.; GALVÃO, C. W.; AYUB, R. A. The maturation profile triggers differential expression of sugar metabolism genes in melon fruits. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 207, p. 108418, 2024.

STROKA, M. A.; SCHEMBERGER, M. O.; AYUB, R. A. Sugar Metabolism in Climacteric and Non-Climacteric Melon. **Annual Plant Reviews online**, p. 243–262, 2018.

SU, G.; LIN, Y.; WANG, C.; LU, J.; LIU, Z.; HE, Z.; SHU, X.; CHEN, W.; WU, R.; LI, B.; ZHU, C.; ROSE, J. K. C.; GRIERSON, D.; GIOVANNONI, J. J.; SHI, Y.; CHEN, K. Expansin SlExp1 and endoglucanase SlCel2 synergistically promote fruit softening and cell wall disassembly in tomato. **The Plant Cell**, v. 36, n. 3, p. 709–726, 1 mar. 2024.

SUN, T.; TADMOR, Y.; LI, L. Pathways for Carotenoid Biosynthesis, Degradation, and Storage. **Plant and Food Carotenoids: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer US, 2020. p. 3–23.

SUPAPVANICH, S.; TUCKER, G. A. Cell wall hydrolysis in netted melon fruit (*Cucumis melo* var. *reticulatus* L. Naud) during storage. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 40, n. 3, p. 447–458, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. [s.l.] Artmed Editora, 2017.

TAKIZAWA, A.; HYODO, H.; WADA, K.; ISHII, T.; SATOH, S.; IWAI, H. Regulatory specialization of xyloglucan (XG) and glucuronoarabinoxylan (GAX) in pericarp cell walls during fruit ripening in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Plos one**, v. 9, n. 2, p. e89871, 2014.

TAYLOR-TEEPLES, M. *et al.* An Arabidopsis gene regulatory network for secondary cell

wall synthesis. **Nature**, v. 517, n. 7536, p. 571–575, 2015.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388–394, 2007.

ULUISIK, S.; SEYMOUR, G. B. Pectate lyases: Their role in plants and importance in fruit ripening. **Food Chemistry**, v. 309, p. 125559, 2020.

VALENZUELA-RI, F.; MORALES-QUINTANA, L. Molecular Insights into FaEG1 , a Strawberry Fruit Ripening. **Plants**, v. 8, n. 140, 2019.

VILLARREAL, N. M.; ROSLI, H. G.; MARTÍNEZ, G. A.; CIVELLO, P. M. Polygalacturonase activity and expression of related genes during ripening of strawberry cultivars with contrasting fruit firmness. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47, n. 2, p. 141–150, 2008.

WANG, M.; ZHANG, L.; BOO, K. H.; PARK, E.; DRAKAKAKI, G.; ZAKHAROV, F. PDC 1, a pyruvate/ α -ketoacid decarboxylase, is involved in acetaldehyde, propanal and pentanal biosynthesis in melon (*Cucumis melo* L.) fruit. **The Plant Journal**, v. 98, n. 1, p. 112–125, 2019.

WATSON, C. F.; ZHENG, L.; DELLAPENNA, D. Reduction of tomato polygalacturonase beta subunit expression affects pectin solubilization and degradation during fruit ripening. **The Plant Cell**, v. 6, n. 11, p. 1623–1634, 1994.

WILSON, L. F. L.; NEUN, S.; YU, L.; TRYFONA, T.; STOTT, K.; HOLLFELDER, F.; DUPREE, P. The biosynthesis, degradation, and function of cell wall β -xylosylated xyloglucan mirrors that of arabinoxyloglucan. **New Phytologist**, v. 240, n. 6, p. 2353–2371, 2023.

WORMIT, A.; USADEL, B. The Multifaceted Role of Pectin Methylesterase Inhibitors (PMEIs). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, 2018.

WU, J.; XU, Z.; ZHANG, Y.; CHAI, L.; YI, H.; DENG, X. An integrative analysis of the transcriptome and proteome of the pulp of a spontaneous late-ripening sweet orange mutant and its wild type improves our understanding of fruit ripening in citrus. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 6, p. 1651–1671, 2014.

XIN, T.; ZHANG, Z.; LI, S.; ZHANG, S.; LI, Q.; ZHANG, Z.-H.; HUANG, S.; YANG, X. Genetic Regulation of Ethylene Dosage for Cucumber Fruit Elongation. **The Plant Cell**, v. 31, n. 5, p. 1063–1076, 1 maio 2019.

YANG, X.; NISAR, T.; HOU, Y.; GOU, X.; SUN, L.; GUO, Y. Pomegranate peel pectin can be used as an effective emulsifier. **Food Hydrocolloids**, v. 85, p. 30–38, 2018.

YAO, B. N.; TANO, K.; KONAN, H. K.; BÉDIÉ, G. K.; OULÉ, M. K.; KOFFI-NEVRY, R.; ARUL, J. The role of hydrolases in the loss of firmness and of the changes in sugar content during the post-harvest maturation of *Carica papaya* L. var solo 8. **Journal of Food Science**

and Technology, v. 51, n. 11, p. 3309–3316, 2014.

YU, L.; YOSHIMI, Y.; CRESSWELL, R.; WIGHTMAN, R.; LYCZAKOWSKI, J. J.; WILSON, L. F. L.; ISHIDA, K.; STOTT, K.; YU, X.; CHARALAMBOUS, S.; WURMAN-RODRICH, J.; TERRETT, O. M.; BROWN, S. P.; DUPREE, R.; TEMPLE, H.; KROGH, K. B. R. M.; DUPREE, P. Eudicot primary cell wall glucomannan is related in synthesis, structure, and function to xyloglucan. **The Plant Cell**, 2022.

ZABOTINA, O. A.; AVCI, U.; CAVALIER, D.; PATTATHIL, S.; CHOU, Y. H.; EBERHARD, S.; DANHOF, L.; KEEGSTRA, K.; HAHN, M. G. Mutations in multiple XXT genes of arabidopsis reveal the complexity of xyloglucan biosynthesis. **Plant Physiology**, v. 159, n. 4, p. 1367–1384, 2012.

ZAVYALOV, A. V; RYKOV, S. V; LUNINA, N. A.; SUSHKOVA, V. I.; YAROTSKY, S. V; BEREZINA, O. V. Plant polysaccharide xyloglucan and enzymes that hydrolyze it. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 45, p. 845–859, 2019.

ZDUNEK, A.; PIECZYWEK, P. M.; CYBULSKA, J. The primary, secondary, and structures of higher levels of pectin polysaccharides. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 1, p. 1101–1117, 2021.

ZHAI, Z.; FENG, C.; WANG, Y.; SUN, Y.; PENG, X.; XIAO, Y.; ZHANG, X.; ZHOU, X.; JIAO, J.; WANG, W.; DU, B.; WANG, C.; LIU, Y.; LI, T. Genome-Wide Identification of the Xyloglucan endotransglucosylase/Hydrolase (XTH) and Polygalacturonase (PG) Genes and Characterization of Their Role in Fruit Softening of Sweet Cherry. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, 2021.

ZHANG, W.; GUO, M.; YANG, W.; LIU, Y.; WANG, Y.; CHEN, G. The Role of Cell Wall Polysaccharides Disassembly and Enzyme Activity Changes in the Softening Process of Hami Melon (*Cucumis melo* L.). **Foods**, v. 11, n. 6, 2022.

ANEXO A- PREPARO DE SOLUÇÕES E DE CURVAS PADRÃO PARA ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

PREPARAÇÃO DO DNS

- **Solução A:** 5g de DNS (ácido 3,5 – dinitrosalicílico) adiciona 100 ml de NaOH 2 mol L⁻¹;
- **Solução B:** Em um becker de 550 ml colocar 150 g de tartarato duplo de sódio e potássio e dissolvidos em 250 ml de água destilada. A solução é levada ao aquecimento até dissolver completamente e a ela é adicionada a solução A de DNS sob aquecimento, até dissolver completamente.
- Deixa-se esfriar e afere-se em balão de 500 mL com água destilada. A solução é armazenada em frasco escuro, ao abrigo da luz.

Curva Padrão com ácido- D- galacturônico 1mg. mL⁻¹

- Curva padrão: na construção da curva padrão preparou-se uma solução mãe de ácido D-galacturônico na concentração de 1 mg mL⁻¹.
- Fazem-se diluições de 0,2; 0,4; 0,5; 0,6 e 0,8 mg. mL⁻¹.

Tubo	Concentração mg/mL⁻¹	Solução μL	H2O destilada μL
1	0,0	0	1000
2	0,2	200	800
3	0,4	400	600
4	0,5	500	500
5	0,6	600	400
6	0,8	800	200

- Transferiram-se 500 μL das soluções-padrão a 500 μL da solução de DNS.

- Os tubos são aquecidos a 100 °C por 10 min e então resfriados em banho com água e gelo.
- A cada tubo foram adicionados 4 mL de água destilada e, após homogeneização, a absorbância foi lida a 540 nm. (STOCK, 2012).

PREPARAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

- Preparar solução de NaCl 0,9%;
- Em um liquidificador triturar 40 g de melão (descongelar um pouco) com 40mL de NaCl a 0,9% e centrifugar a 5000 rpm por 30 min a 4°C, recuperar o sobrenadante que contém as enzimas.
- Diluir 400 µL de extrato em 600 µL de água e depois multiplicar por 2,5x a diluição (extrato muito concentrado).

CURVA PADRÃO COM XILOSE 1MG/ML⁻¹

- Curva padrão: na construção da curva padrão preparou-se uma solução mãe de xilose na concentração de 1 mg mL⁻¹.
- Fazem-se diluições de 0,2; 0,4; 0,5; 0,6 e 0,8 mg mL⁻¹.

Tubo	Concentração mg/mL⁻¹	Solução µL	H2O destilada µL
1	0,0	0	1000
2	0,2	200	800
3	0,4	400	600
4	0,5	500	500
5	0,6	600	400
6	0,8	800	200

- Transferiram-se 500 µL das soluções-padrão a 500 µL da solução de DNS.

- Os tubos são aquecidos a 100 °C por 10 min e então resfriados em banho com água e gelo.
- A cada tubo foram adicionados 4 mL de água destilada e, após homogeneização, a absorbância foi lida a 540 nm.