



N° d'ordre: 2466

THÈSE

Présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

**École doctorale: Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques &
Bioingénieries - SEVAB**

Spécialité: Qualité et Sécurité des Aliments

TITRE

**CARACTERISATION DE MELONS TRANSGENIQUES ANTISENS ACC OXYDASE ET
ETUDE BIOCHIMIQUE DES ALCOOL ACYLTRANSFERASES IMPLIQUEES DANS LA
BIOGENESE D'AROMES**

par

Luciano LUCCHETTA

Soutenue le 16 Avril 2007
devant le jury composé de:

M. Jean-Claude PECH (INP/ENSAT-Toulouse-France)	Président
M. Cesar Valmor ROMBALDI (FAEM/UFPeI-Pelotas-Brasil)	Co-directeur
M. Alain LATCHÉ (INP/ENSAT-Toulouse-France)	Co-directeur
M. Odir DELLAGOSTIN (CENBIOT/UFPeI-Pelotas-Brasil)	Rapporteur
M. Gilles FERON (INRA/ Dijon-France)	Rapporteur
M. Leonardo NORA (FAEM/UFPeI-Pelotas-Brasil)	Membre

**Ministério da Educação
Universidade Federal de Pelotas
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial**



LUCIANO LUCCHETTA

**CARACTERIZAÇÃO DE MELÕES TRANSGÊNICOS ACC OXIDASE ANTISENSE E
ESTUDO BIOQUÍMICO DE ÁLCOOL ACILTRANSFERASES ENVOLVIDAS NA
BIOSSÍNTESE DE AROMAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Pelotas, como requisito para à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Ciência e Tecnologia Agroindustrial).

Orientadores:

Cesar Valmor ROMBALDI

Alain LATCHÉ

**PELOTAS
RIO GRANDE DO SUL – BRASIL
2007**

AGRADECIMENTOS

(Remerciements)

A César Valmor Rombaldi, professor e amigo, pela confiança, pelos ensinamentos, incentivo e pela permanente e inestimável orientação.

A Alain Latché e Jean-Claude Pech, pela confiança, pelos ensinamentos, incentivo e pela permanente e inestimável orientação.

À Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela oportunidade e apoio para realizar este trabalho.

Ao “Laboratoire de Génomique et Biotechnologie des Fruits, INRA/INP-ENSAT”, Toulouse – França na pessoa do diretor chefe Mondher Bouzayen e toda a equipe, pelo apoio, disponibilidade e confiança.

Ao Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Biotecnologia – UFPel, na pessoa do prof. Odir A. Dellagostin e sua equipe.

À CAPES, pelo apoio e pela concessão das bolsas para a realização dos trabalhos no Brasil e no Exterior (estágio doutoral).

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pelo estímulo, ensinamentos, dedicação e amizade, em especial a Jorge Adolfo Silva, Leonardo Nora, Moacir Cardoso Elias, Valdecir Carlos Ferri, Wladimir Padilha da Silva, Celso Medina Fagundes, Germano Jorge Dornelles Soares, Pedro Luis Antunes, Álvaro Renato Guerra Dias e Manoel Artigas Schirmer.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade, contribuições e dedicação.

Aos alunos de pós-graduação, bolsistas e estagiários do laboratório de biotecnologia de alimentos pela convivência, contribuições, dedicação e amizade.

Aos colegas de pós-graduação, pelo apoio, incentivo e amizade.

A Marcio Roggia Zanuzo, colega e inestimável amigo, pelo apoio, incentivo, auxílio e compreensão.

A Daniel Manriquez, colega e amigo, pelo apoio, incentivo e ensinamentos.

À minha namorada, Edinara, pelo apoio, compreensão, carinho e amor.

Aos meus pais, Lussidio e Iracema, e meu irmão, Marciano, pelo apoio, incentivo, amizade e amor.

À minha filha, Stefany, pelo amor e luz em minha vida.

A DEUS, pelo dom da vida e benção.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 QUALIDADE DE FRUTOS	18
2.2 MATURAÇÃO DE FRUTOS	21
2.3 INTERAÇÃO ENTRE CITOCININAS E MATURAÇÃO: PLANTAS TRANSGÊNICAS E ASPECTOS FISIOLÓGICOS.....	26
2.4 INTERAÇÃO ENTRE ETILENO E MATURAÇÃO: ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS E PLANTAS TRANSGÊNICAS COM BAIXA PRODUÇÃO DE ETILENO	29
2.5 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM FRUTOS	35
3 ARTIGO “I”	44
CHARACTERIZATION OF RIPENING BEHAVIOR IN TRANSGENIC MELONS EXPRESSING AN ANTISENSE 1-AMINOCYCLOPROPANE-1- CARBOXYLATE (ACC) OXIDASE GENE FROM APPLE.	44
ABSTRACT	44
3.1 INTRODUCTION	45
3.2 MATERIALS AND METHODS	46
3.2.1 Plant material and transformation	46
3.2.2 Fruit ripening and analysis	46
3.2.3 Color and pigments.....	46
3.2.4 Firmness.....	47
3.2.5 Total soluble solids and acidity	47
3.2.6 Internal ethylene concentration.....	47
3.3 RESULTS	47
3.3.1 Carotenoid and chlorophyll levels.....	47
3.3.2 Firmness, soluble solids content and titratable acidity.....	47
3.3.3 Color development in the rind and internal ethylene concentration	48
3.4 DISCUSSION	48
3.4 REFERENCES	51
4 ARTIGO “II”	54
ETILENO E CITOCININAS NA SÍNTESE DE ÉSTERES EM MELÕES ‘CANTALOUPE’, TRANSFORMADOS GENETICAMENTE COM UM CLONE DA ACC OXIDASE DE MAÇÃ EM ORIENTAÇÃO ANTISENSE	54
RESUMO	54
ABSTRACT	55
4.1 INTRODUÇÃO.....	56

4.2 MATERIAL E MÉTODOS	57
4.2.1 Material vegetal	57
4.2.2 Análise do etileno	58
4.2.3 RT-PCR da ACC oxidase e Cm-AAT.....	58
4.2.4 Compostos voláteis	58
4.2.5 Western Blot	59
4.2.6 Zeatina e Zeatina ribose em casca e polpa	59
4.3 RESULTADOS	60
4.4 DISCUSSÃO.....	63
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
5 ARTIGO “III”	69
BIOCHEMICAL AND CATALYTIC PROPERTIES OF THREE RECOMBINANT	
ALCOHOL ACYLTRANSFERASES OF MELON. SULFUR-CONTAINING ESTERS	
FORMATION, REGULATORY ROLE OF CoA-SH IN ACTIVITY AND SEQUENCE	
ELEMENTS CONFERRING SUBSTRATE PREFERENCE.....	69
ABSTRACT	69
5.1 INTRODUCTION	70
5.2 MATERIAL AND METHODS	71
5.2.1 Expression of Cm-AAT in Yeast and Purification of the Recombinant Proteins..	71
5.2.2 AAT Enzyme Activity Assay.....	72
5.2.3 Determination of Molecular Weight.....	72
5.2.4 Kinetic Analysis and Effects of CoA-SH.....	73
5.2.5 Site-directed mutagenesis	73
5.3 RESULTS	74
5.4 DISCUSSION	81
5.5 LITERATURE CITED.....	85
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
7 REFERÊNCIAS GERAIS	91

Lista de abreviaturas

1-MCP - 1-metilciclopropano
AAT – álcool aciltransferase
ABA - ácido abscísico
ACC - ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
ACO - ACC Oxidase
ADH – álcool desidrogenase
APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
AS - *antisense*
AVG – amino-etoxi-vinilglicina
cDNA – DNA complementar
Cm-AAT – *Cucumis melo* - álcool aciltransferase
CoA – Coenzima A
DAP – Dias após polinização
DNA - Ácido desoxiribulcléico
BLAST - *Basic Local Aligment Search Tool*
DEPC - *Diethyl pyrocarbonate*
DTT - *Dithiothreitol*
EDTA - *Ethylenedinitro Tetraacetic Acid*
ER - *Ethylene Response*
EST - *Expressed Sequences Tag*
ETR - *Ethylene Receptor*
EUREP-GAP - *Euro Retailer Producer - Good Agricultural Practices*
g - gramas
g – Gravidade
HPLC - *High Presure Liquid Chromatography*
h – Horas
iPA - isopentinil adenina
ipt - Isopentiltransferase
ISO – *International Organization for Standardization*
Km – Constante de Michaelis
Ki – Constante de inibição
LOX - Lipooxigenase
mg - miligramas
min – Minutos
mf - massa fresca
NADPH – Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo-Fosfato- Hidrogenase
NT – não transformado
PCR - *Polymerase Chain Reaction*
PG - Poligalacturonase
pI - ponto Isoelétrico
PME - Pectine Metilesterase
PVPP - Polyvinylpolypyrrolidone
RNA - Ácido ribocléico
RPM – Rotações por minuto
mRNA – RNA mensageiro
SAM S - adenosilmetionina
SAMS S- adenosilmetionina sintetase
SDS *Sodium Dodecyl Sulfate*
SDS-PAGE *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
seg – Segundos
TEMED - *N'-Tetramethy-1,2-ethanediamine*
Vmax – Velocidade máxima de reação
Z – Zeatina
ZR – Zeatina riboside

RÉSUMÉ

CARACTERISATION DE MELONS TRANSGENIQUES ANTISENSE ACC OXYDASE ET ETUDE BIOCHIMIQUE DES ALCOOL ACYLTRANSFERASES IMPLIQUEES DANS LA BIOGENESE D'AROMES

L'augmentation de la production d'éthylène est une des principales causes de l'accélération du métabolisme post-récolte de melons 'Cantaloups Charentais'. Dans le but de prolonger la vie post-récolte de ces fruits, les melons ont été transformés avec un clone de l'ACC oxydase (pAP4) de pomme 'Royal Gala', en orientation *antisens*. Trois transformants ont été obtenus et le clone montrant la plus importante réduction de la production d'éthylène, appelé AS3, a été retenu pour la suite des travaux. Avec ce modèle végétal on a pu discriminer certains événements comme étant éthylène-dépendants et d'autres comme éthylène-indépendants. Par exemple, les melons AS3 ont eu un retard de maturation d'environ 10 jours et en conséquence, une accumulation de sucres plus importante. En plus, ces fruits ont préservé une plus grande fermeté de pulpe, une plus grande teneur en chlorophylles et une plus forte acidité que les non transformés. Cependant, la teneur de caroténoïdes n'a pas été modifiée par la transformation génétique. D'autre part, l'intensité aromatique des ces fruits a été réduite. Des modifications phénotypiques telles qu'une moindre sénescence des feuilles et une plus grande émission des branches latérales ont été observées. Afin de confirmer que la dégradation des chlorophylles, la perte de fermeté et la synthèse de composés volatiles étaient réellement des événements éthylène-dépendants, des fruits AS3 ont été soumis à l'action d'éthylène exogène. La restauration du processus de maturation a été seulement partielle, c'est-à-dire qu'il a y bien eu réduction de la fermeté de la pulpe mais pas de restauration complète de la production de composés volatiles, ni du jaunissement de l'écorce. Comme les plantes AS3 ont présenté des modifications de phénotype rappelant des réponses à l'action de cytokinines, on a déterminé la concentration de cette hormone dans les melons AS3 et non transformés. Nous avons ainsi trouvé que les concentrations de zéatine et de zéatine-ribose étaient 4 à 6 fois supérieures à celles des melons non transformés. Ce résultat suggère que la transformation génétique qui a conduit à une forte réduction de production d'éthylène et a eu pour conséquence de modifier le cycle végétatif des plantes, a stimulé la synthèse de cytokinines, hormones connues pour retarder la

sénescence et l'action de l'éthylène. Sur d'autres melons 'Cantaloup Charentais', transformés avec un clone de l'ACC oxydase de melon, appelé pMEL1, les réponses à la action d'éthylène ont été intégralement restaurées. Dans ces fruits des clones d'AAT (Cm-AAT1, Cm-AAT3 and Cm-AAT4) ont été isolés qui ont permis une caractérisation biochimique des protéines recombinantes. Ces protéines ont toutes montré une capacité à synthétiser des esters soufrés, mais la protéine Cm-AAT1 est la plus active. Ces protéines sont actives seulement sous forme tétramérique, avec un poids moléculaire autour de 200 kDa. La cinétique a montré que le CoA-SH, un des produits de la réaction, est activateur à des concentrations basses et inhibiteur à des concentrations plus élevées. L'enlèvement du CoA-SH du milieu réactionnel, via l'addition de phosphotransacétylase, s'est traduit par une réduction de la valeur du Km de 2 à 3 fois, vis-à-vis du co-substrat Acyl-CoA. Enfin, des mutations dirigées sur quelques aminoacides spécifiques dans les séquences Cm-AAT ont changé la sélectivité des enzymes et le nombre d'esters produits.

Mots-clés: fruits, maturation, ACC oxydase, esters, zéatine, zéatine-ribose, CoA-SH

RESUMO

LUCCHETTA, Luciano. **CARACTERIZAÇÃO DE MELÕES TRANSGÊNICOS ACC OXIDASE ANTISENSE E ESTUDO BIOQUÍMICO DE ÁLCOOL ACILTRANSFERASES ENVOLVIDAS NA BIOSÍNTESE DE AROMAS.** 2007. 105f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O incremento da produção de etileno é uma das principais causas das alterações pré e pós-colheita de melões 'Cantaloupe' 'Vedrantais'. Com o intuito de prolongar a vida de prateleira desse fruto realizou-se a transformação genética utilizando um clone da ACC oxidase de maçã 'Royal Gala', denominado pAP4, em orientação antisense. Três transformantes foram obtidos e o de maior redução da produção de etileno, denominado de AS3, foi mantido para a continuidade dos trabalhos. Com esse modelo vegetal pôde-se discriminar eventos etileno-dependentes e etileno-independentes relacionados com a maturação do melão. Por exemplo, verificou-se que os melões AS3 têm o ciclo de maturação aumentado em aproximadamente 10 dias, resultando numa maior acumulação

de sólidos solúveis. Além disso, os frutos AS3 preservam maior firmeza de polpa, maior teor de clorofilas e acidez titulável do que os não transformados. No entanto, o teor de carotenóides não foi afetado pela transformação genética. Por outro lado, detectou-se redução da intensidade aromática dos frutos, além de alterações fenotípicas das plantas AS3, com destaque para a menor senescência de folhas e maior emissão de brotações. Buscando confirmar que a degradação de clorofilas, degradação de parede celular e síntese de compostos voláteis são eventos etileno-dependentes, aplicou-se etileno nos frutos AS3. Entretanto, a reversão do processo foi apenas parcial, ou seja, houve redução da firmeza da polpa, mas não houve a restauração da produção de compostos voláteis, nem do amarelecimento da casca. Ao analisar-se a expressão de uma das principais enzimas da via de biossíntese de compostos voláteis, a Álcool Acil Transferase (AAT), verificou-se por RT-PCR que a aplicação de etileno induz a transcrição dos mRNAs codantes pela respectiva enzima assim como a tradução da proteína (western blot), sugerindo que uma inibição da expressão não é responsável pela baixa produção de compostos voláteis nas frutas AS3. Como as plantas AS3 apresentaram alterações de fenótipo compatíveis com respostas à ação de citocininas, buscou-se monitorar a concentração desse fitormônio nos melões AS3 e não transformados. Essa hipótese foi confirmada, detectando-se concentrações entre 4 e 8 vezes maiores na polpa e na casca de melões AS3 do que em melões não transformados. Esse resultado sugere que a elevada redução da produção de etileno resultou em alterações no ciclo vegetativo da planta, favorecendo a síntese de citocininas, conhecidas como retardadoras da senescência e da ação do etileno. Em outra linhagem de melão 'Cantaloupe' 'Charantais', transformado com um clone da ACC oxidase de melão, denominado pMEL1, em orientação antisense, as respostas à ação do etileno foram obtidas na integralidade. Por isso, a partir desse material foram isolados clones de AAT, (Cm-AAT1, Cm-AAT3 e Cm-AAT4), visando a caracterização bioquímica. As proteínas recombinantes mostraram capacidade de sintetizar ésteres sulfurados, sendo que a Cm-AAT1 é mais ativa. Essas proteínas mostraram atividade somente na forma tetramérica, tendo uma massa molecular em torno de 200 kDa. A análise cinética demonstrou que o CoA-SH, um produto da reação, é ativador em concentrações baixas e inibidor em concentrações mais elevadas. A remoção de CoA-SH do meio de reação, pela adição de fosfoacetilase, resultou em valores de Km 2 a 3 vezes mais baixos para o co-substrato acil-CoA. A mutação dirigida de alguns aminoácidos que eram específicos nas seqüências Cm-AAT afetou a seletividade da proteína original e o número dos ésteres produzidos.

Palavras-chave: maturação, ACC oxidase, CoA-SH, ésteres, aroma, frutos.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF TRANSGENIC MELON ACC OXIDASE ANTISENSE AND BIOCHEMICAL STUDY OF ALCOHOL ACYLTRANSFERASES INVOLVED IN THE BIOSYNTESIS OF THE AROMAS

The increase of ethylene production in 'Cantaloupe Vedrantaís' melon is one of the main causes of the pre and post harvest alterations. In order to extend the shelf life of this fruit, melon plants were transformed with an ACC oxidase DNA sequence of 'Royal Gala' apple in antisense orientation (pAP4). Three transformants were obtained. One of them showing the greatest reduction in ethylene production (AS3) was analysed further and used as a model to discriminate between ethylene- dependent and ethylene-independent processes during fruit ripening. AS3 melons exhibited a delay of about 10 days for ripening and accumulated more soluble solids than untransformed melons. Besides, fruit firmness, chlorophyll content and titratable acidity were higher in AS3 melons than in untransformed melons. However, the carotenoid content was unaffected and the aroma intensity was reduced in AS3 fruits. In AS3 plants the senescence of the leaves was reduced and the formation of lateral branching was increased. In order to confirm that chlorophyll degradation, cell wall degradation and synthesis of volatile compounds were ethylene-dependent events, ethylene was applied on AS3 fruits. However, the reversion of the process was limited. While the reduction of pulp firmness occurred, the production of volatiles compounds and the yellowing of the skin were not achieved. Considering that the phenotype of AS3 plants resembled a response to cytokinins action, the concentration of this phytohormone was monitored in both AS3 and untransformed melons. This hypothesis was confirmed as the cytokinins concentration in the pulp and skin of AS3 melons was fourth to eight fold higher. This result suggests that reduction in ethylene production induced changes in the vegetative cycle of the plant, and favoured the synthesis of cytokinins, hormones that are known as retardants of senescence and ethylene action. Using plants from a different lineage, 'Cantaloupe' 'Charentais', transformed with an ACC oxidase DNA sequence from melon, in antisense orientation (pMEL1), the responses to

ethylene action were all observed. For this reason, AAT clones (Cm-AAT1, Cm-AAT3 and Cm-AAT4) were isolated for biochemical characterization. All recombinant proteins were active to synthesize sulfur-containing esters but Cm-AAT1 was the most active. Only the tetrameric form of these proteins, with molecular mass of 200 kDa, were active. The kinetic analysis indicated that CoA-SH, a product of the reaction, is an activator at low concentration and inhibitor at higher concentration. The removal of CoA-SH from the reaction medium, by adding phosphotransacetylase, resulted in Km values two to three fold lower for the co-substrate acyl-CoA. The site directed mutation of a few amino acids in the Cm-AAT sequences affected the selectivity of the original protein and the number of esters produced.

Keys-words: ripening, ACC oxidase, CoA-SH, esters, aroma, fruits.

1 INTRODUÇÃO

O consumo de produtos hortifrutícolas no Brasil tem crescido de maneira significativa, especialmente na forma *in natura*. Estima-se que nos últimos 10 anos, houve um incremento de 25% no consumo de frutos e hortaliças *in natura*. Embora as causas desse incremento não tenham sido demonstradas, acredita-se que vários fatores contribuíram para essa evolução. Sendo o apelo por alimentos *in natura*, saudáveis, nutritivos e de alta qualidade, é apontado como uma das causas prováveis. Além disso, os consumidores vêm modificando seus hábitos alimentares e, cada vez mais, relacionam a dieta com a prevenção de doenças. Nesse sentido as agências governamentais e não-governamentais, para a promoção da saúde, estão recomendando o incremento do consumo de hortaliças, frutos e grãos. O aumento da oferta, a redução de sazonalidade, a alteração de hábito alimentar, a melhoria da condição sócio-econômica e da estrutura de trabalho, também contribuíram para esse crescimento. (Maistro, 2001).

Assim como a procura e consumo de frutos e hortaliças *in natura* cresce em nível nacional e internacional, também a exigência por produtos de maior qualidade aumenta. Quando se pensa em comércio internacional, a primeira preocupação é com a qualidade dos frutos. No Brasil não é diferente e já existe uma parcela da população cujos hábitos de consumo se assemelham aos dos países com maior renda *per capita* e melhor distribuição de renda (Maistro, 2001).

Porém, no Brasil, ainda se perde cerca de 30% do total de frutos e hortaliças produzidas. Evidentemente que essa média é variável, dependendo da espécie e do manejo na pré e pós-colheita. De nada adianta produzir um fruto de excelente qualidade se este não for manuseado, armazenado e comercializado da forma adequada. Em se tratando de transporte a longas distâncias é de suma importância que o fruto apresente uma maior vida útil tendo em vista que se exige um maior tempo para sua comercialização. A qualidade do fruto depende, além do genótipo, em grande parte da tecnologia utilizada na pré-colheita, colheita e pós-colheita. Porém, é necessário enfatizar que os métodos empregados nas duas últimas fases não melhoram a qualidade do fruto, mas apenas podem retardar o processo de senescência, garantindo melhor conservação e tempo mais prolongado para comercialização.

A perecibilidade e a capacidade de armazenamento dos frutos climatéricos são influenciadas pela estrutura do próprio fruto, de seu metabolismo e do metabolismo de organismos associados. Nesse contexto, os princípios e métodos de conservação

baseiam-se no controle de um ou mais desses fatores, visando aumentar a vida de prateleira (Chitarra & Chitarra, 2005).

Em frutos e hortaliças, a aquisição da aptidão para evolução da coloração, textura, sabor e aroma ocorre majoritariamente a partir da transição da fase de crescimento para a fase de maturação. De acordo com o tipo de maturação, os frutos e hortaliças são classificados em dois grupos, não climatéricos e climatéricos. No caso de frutos climatéricos, o etileno é citado como o hormônio responsável por desencadear a maturação e praticamente todos os eventos envolvidos nesse processo. Esses frutos caracterizam-se pelo aumento marcante da produção e do efeito autocatalítico do etileno, e da taxa respiratória, sendo essa fase denominada de período ou fase climatérico(a). De maneira geral, quanto maior a produção e a ação do etileno, maior a velocidade com que a maturação ocorre. Para melhor compreender a função do etileno nos processos bioquímico-fisiológicos da maturação, os estudos buscam correlacionar os eventos moleculares com as respostas fisiológicas e tecnológicas nos produtos. Vários trabalhos foram iniciados com esse objetivo e permitiram caracterizar as enzimas da via de biossíntese do etileno, seus respectivos genes, sendo a obtenção de plantas transgênicas parte importante das estratégias de estudo (Kende *et al.*, 1993).

Porém, há evidências de que a interação entre hormônios é significativa. É o caso das citocininas, conhecidas por agir de forma antagônica ao etileno, ou seja, atuam retardando a senescência de vegetais. A aplicação exógena de citocininas, ou a manipulação genética visando o aumento da produção desse hormônio, tem demonstrado efeitos positivos no retardo da senescência. Em plantas transgênicas nas quais aumentou-se a produção de citocininas tais como em brócolis (Chen *et al.*, 2001), alface (Mac Cabe *et al.*, 2001), e folhas de tabaco (Hedden & Philips, 2000), retardou a senescência de folhas e de inflorescências e aumentou a brotação lateral, do números de frutos e maior acúmulo de açúcares no caso do tomate (Martineau *et al.* 1995). A forma pela qual as citocinas atuam na regulação desses eventos, bem como na redução da sensibilidade ao etileno ainda não está esclarecida (Chang *et al.*, 2003).

Vários trabalhos têm buscado, através da engenharia genética, modificar a via biossintética do etileno, de citocininas e de outros hormônios, bem como da síntese de compostos fenólicos, de compostos voláteis, de pigmentos e da hidrólise da parede celular, com o intuito de prolongar a vida de prateleira e/ou incrementar o valor nutricional ou funcional, de frutos e hortaliças (Ayub *et al.*, 1996, Hadfield *et al.*, 1998, Chen *et al.*, 2001, Smith *et al.*, 2002). Dentre esses, os que buscam reduzir a síntese de etileno, são

os mais freqüentes, sendo tomate, maçã, kiwi, petúnia e melão, os mais estudados (Pincton *et al.*, 1993, Bauchot *et al.*, 1998, Bolitho *et al.*, 1997, Ayub *et al.*, 1996, Ben-Amor *et al.*, 1999, Silva *et al.*, 2004).

No caso específico deste estudo, trabalhou-se com melões Cantaloupe 'Vedrantais', caracterizados como frutos climatéricos, com coloração de polpa variando da tonalidade alaranjada a salmão, e muito apreciados, principalmente pelo sabor adocicado e pelo aroma pronunciado. Contudo, são frutos que possuem um período de conservação pós-colheita bastante reduzido (três a cinco dias), não oferecendo facilidades para embalagem, transporte e comercialização. Em função dessa problemática, buscam-se alternativas para a redução do metabolismo desse fruto de modo a aumentar-se a conservabilidade. Porém, pesquisas (Bauchot *et al.* 1998, Ueda *et al.* 1997) têm demonstrado que há correlação inversa entre conservabilidade e características desejáveis. Por exemplo, frutos climatéricos com maior intensidade respiratória, conseqüência de uma maior produção de etileno, têm melhor coloração e maior intensidade aromática, mas menor conservabilidade (Shalit *et al.* 2001). A relação inversa também é verdadeira, ou seja, quando se reduz a produção e/ou a ação do etileno, prolonga-se a vida de prateleira, com maior preservação da firmeza de polpa e das clorofilas na casca, mas o aroma é significativamente reduzido (Flores *et al.*, 2002, Fallik *et al.*, 2001).

Vários autores (Bauchot *et al.*, 1998, Guis *et al.*, 1997, Ueda *et al.* 1997, Homatidou *et al.*, 1992), que estudam a produção de compostos voláteis em frutos, demonstram que os principais componentes dos aromas são os ésteres. Eles são o resultado da ação de enzimas do grupo álcool acil transferase (AAT), que catalizam a última etapa do processo de biossíntese dos compostos voláteis. Alguns clones dessas enzimas já foram isolados e estão em fase de caracterização (Li *et al.*, 2006, El-Sharkawy *et al.*, 2005, Hahyaoui *et al.*, 2002, Shalit *et al.*, 2001, Pérez *et al.*, 1993). El-Sharkawy *et al.*, (2005), estudando clones AAT isolados de melão, que se expressam especificamente durante a maturação dos frutos, demonstrou que correspondem a proteínas com atividade AAT distintas em termos de substrato preferencial e que tem expressão etileno-dependente. Proteínas recombinantes mutantes desses clones também foram obtidas e demonstraram atividade diferenciada frente aos substratos testados, sugerindo que a regulação do processo depende evidentemente das enzimas, mas também do suprimento de substratos específicos de cada isoenzima, bem como da seqüência aminoacídica.

Em trabalhos realizados no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Pelotas, em cooperação com o “Laboratoire de biotechnologie des fruits”, INP/ENSAT (Toulouse-França), também foram obtidos meloeiros transformados com o clone pAP4AS3, que contém um clone da ACC oxidase de maçã ‘Royal Gala’ em orientação antisense. Esse procedimento reduziu a produção de etileno dos frutos em 99,6%, resultando no prolongamento do ciclo de maturação, numa maior preservação da firmeza de polpa e do conteúdo de clorofilas na casca, sem alteração do conteúdo de carotenóides da polpa. Também, embora não se tenha quantificado, observou-se uma maior emissão de brotos laterais, maior emissão de flores e maior quantidade de raízes. Porém, o aroma, que é um dos principais atributos de qualidade dos frutos dessa cultivar, foi significativamente reduzido.

Em todos os trabalhos publicados, nos quais trataram-se com etileno os frutos transgênicos com baixa produção de etileno, houve indução da maturação. No caso de tomate, houve retomada da síntese de licopenos e amolecimento dos frutos (Alexander & Grierson, 2002). Em melões, além da formação de halo de abscisão, houve amolecimento da polpa, desverdeamento da casca e incremento da produção de compostos voláteis (Flores *et al.*, 2002, Bauchot *et al.*, 1998). Baseando-se nesses trabalhos, buscou-se aplicar a mesma estratégia em melões obtidos por Silva *et al.* (2004). Porém, nesse caso, nem todas as respostas foram semelhantes às obtidas por outros autores. Por exemplo, ao aplicar-se etileno em melões transgênicos obtidos por Ayub *et al.* (1996), houve restabelecimento da produção de compostos voláteis. A aplicação de etileno nos melões obtidos por Silva *et al.* (2004) não resultou em melhora significativa do aroma, nem da produção de compostos voláteis. As causas exatas dessa diferença de comportamento ainda não foram demonstradas. Três hipóteses foram apresentadas como causas prováveis. A primeira, sugerindo que possa se tratar da localização do transgene no genoma das plantas AS3, podendo ter afetado a expressão de gene(s) envolvido(s) com proteínas responsáveis pela recepção e/ou transdução do sinal etileno. Embora possível, é uma hipótese pouco provável, pois três linhagens transgênicas foram obtidas e todas têm o mesmo comportamento. A segunda hipótese é baseada no fato de que a redução da produção de etileno dos melões obtidos por Silva *et al.* (2004) tendo sido superior àquela obtida nos melões de Ayub *et al.* (1996), (99,6% e 96,5%, respectivamente), poderia ter retardado ainda mais os eventos de crescimento e desenvolvimento dos frutos, diminuindo a sensibilidade ao hormônio. Essa hipótese é consubstanciada pelo fato de que as plantas obtidas por Silva *et al.* (2004) apresentam ciclo vegetativo mais

prolongado, menor senescência de folhas, maior sistema radicular, maior brotação lateral, e maior retardamento do ciclo de maturação dos frutos do que o descrito por Ayub *et al.* (1996). A terceira hipótese é decorrência da segunda, acreditando-se que a forte redução da produção de etileno tenha modificado o metabolismo da planta, com a indução da síntese de citocininas, retardando a senescência das plantas e dos frutos. Essa hipótese está baseada no fato de que fatores que induzem a emissão de raízes, que é o local de síntese de citocininas, favorecem a síntese desse hormônio, com a conseqüente prevenção da senescência. Isso foi amplamente demonstrado em alface (MACCABE *et al.*, 2001), brócolis (Chen *et al.*, 2001), petúnia (Chang *et al.*, 2003) e tomates (Martineau *et al.* 1995) transformados com o clone *IPT*, correspondente a uma isopentil transferase. Em todos esses casos houve redução da senescência de folhas e flores. Além disso, em tomate, houve aumento das brotações laterais, do número de frutos e do teor de açúcares. Em petúnia, as flores de plantas transgênicas superexpressando o clone *IPT* tornaram-se menos sensíveis ao etileno, sugerindo que o incremento de citocinas interfere nas respostas ao etileno.

No presente estudo, produziram-se proteínas recombinantes dos três genes *AAT* (*Cm-AAT1*, *Cm-AAT3* e *Cm-AAT4*) em leveduras, a partir das quais obteve-se alta pureza de enzimas por cromatografia de afinidade, permitindo a caracterização bioquímica dessas, quanto aos parâmetros cinéticos (K_m , K_i , V_{max}), massa molecular e substratos preferenciais. Os estudos de cinéticas com *AAT* tem sido realizados sem considerar os efeitos de *CoA-SH* liberado na reação de esterificação. O *CoA-SH* pode ter efeito estimulador ou inibidor *in vitro*, dependendo da concentração e das propriedades cinéticas das enzimas. Com o objetivo de eliminar o efeito, fez-se uso de uma fosfotransacetilase, que possui a capacidade de realizar a reciclagem do *CoA-SH*. Também, avaliou-se a capacidade das três proteínas *Cm-AAT* de produzir ésteres sulfurados. Quando comparada as seqüências de proteínas de cada uma das *Cm-AATs* com *AATs* de outras plantas, encontrou-se aminoácidos que são únicos nas seqüências dos melões. Através de mutações dirigidas realizou-se substituição de aminoácidos em regiões de consenso a fim de avaliar o efeito na especificidade e preferências das enzimas.

Considerando a problemática vigente e conhecimento disponível quando da implantação do projeto, emitiram-se as seguintes hipóteses:

1. Quanto ao problema de baixa conservabilidade dos melões Cantaloupe 'Vedrantais': A redução da produção de etileno em melões transgênicos resulta na alteração do ciclo vegetativo e de maturação, prolongando a vida de prateleira dos frutos,

podendo haver redução da degradação de clorofilas e redução na produção de compostos voláteis.

2. Quanto ao problema da menor produção de compostos voláteis em melões Cantaloupe 'Vedrantais': A produção de compostos voláteis de melões transgênicos pAP4AS3 pode ser restaurada pela aplicação de etileno exógeno.

3. Quanto ao problema de não se conhecer em detalhes os aspectos bioquímicos (K_m , K_i , afinidade por substrato, substrato preferencial, inibidores, centro ativo, sistema de regulação da atividade enzimática): a) As condições de reação e a sequência de aminoácidos que formam as AATs de melão determinam a afinidade por substratos na síntese de ésteres, b) O subproduto CoA-SH da reação de esterificação influencia as propriedades bioquímicas das AATs.

Na estrutura desta tese, além do suporte teórico constante no item da Revisão Bibliográfica, serão apresentados os resultados e as discussões de três experimentos realizados para testar as hipóteses previamente apresentadas. Os três artigos resultantes desses experimentos são intitulados:

- Characterization of ripening behavior in transgenic melons expressing an antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene from apple. Publicado na Revista Postharvest Biology and Technology (2004).
- Etileno e citocininas na síntese de ésteres em melões 'Cantaloupe', transformados geneticamente com um clone da ACC oxidase de maçã em orientação antisense (a ser submetido à Postharvest Biology and Technology em 2007).
- Biochemical and catalytic properties of three recombinant alcohol acyl-transferases of melon. Sulphur-containing esters formation, regulatory role of CoA-SH in activity and sequence elements conferring substrate specificity/preference (submetido à revista Journal of food and Chemistry em Janeiro de 2007).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 QUALIDADE DE FRUTOS

De modo geral, durante várias décadas, ao conceituar qualidade de frutos, deu-se destaque àqueles atributos relacionados à aparência, como uniformidade, tamanho, formato, cor, presença ou não de defeitos e/ou danos mecânicos e estágio de maturação. Porém a ampliação de mercados no cenário vigente acirrou e acirra a competitividade e a busca da eficiência e eficácia para garantir a rentabilidade, de modo continuado. Mas, para manter e conquistar novos mercados, o foco principal da cadeia produtiva de frutos e hortaliças deverá buscar, no mínimo, o atendimento às necessidades e às exigências dos consumidores, diferenciando-se na busca da excelência visando a conquista e fidelização desses mercados. Vivencia-se uma fase na qual a diferença é que encanta. Por isso, ou geram-se novos produtos e processos, e/ou adotam-se procedimentos que os diferenciem dos convencionais (Rombaldi *et al.*, 2006).

A criação de novas cultivares adaptadas às diferentes estações e regiões edafoclimáticas, associada com a evolução de sistemas de produção e de sistemas de conservação, passou-se a ter, além de um incremento da quantidade e da variabilidade, uma maior regularidade de oferta ao longo do ano. Isso ocorreu associado ao aumento da circulação de mercadorias entre regiões, estados e países (Rombaldi *et al.*, 2006).

Paralelamente a essas mudanças, o conceito de qualidade também foi ampliado, incluindo-se quesitos relacionados com o sistema de produção (proteção ao meio ambiente e ao trabalhador, inserção de mão-de-obra, tipificação), potencial de conservação do produto, propriedades nutricionais e funcionais, e características sensoriais. Porém, as características sensoriais advindas do processo de maturação, como a coloração, a melhoria de textura, a suculência, os aromas, e outros, são os principais aspectos de qualidade que atraem os consumidores. Esses atributos contribuem, além do aspecto nutricional, com o prazer e a satisfação de estar consumindo um produto diferenciado. Dentre esses atributos, o aroma, que é o objeto de estudo deste trabalho, recebeu destaque na pesquisa realizada Rombaldi *et al.* (2007) como um dos principais atributos qualitativos em frutos e hortaliças (Figura 1).



Figura 1 - Quesitos importantes na tomada de decisão para aquisição de frutos e hortaliças. Dados apresentados em preferência relativa (%). Fonte: Rombaldi *et al.* (2007).

A confirmação das afirmativas descritas anteriormente foi obtida em trabalho recente realizado por Rombaldi *et al.* (2007), no qual ficou evidente que no setor frutos e hortaliças, incluindo seus produtos processados, os quesitos que integram o conceito de qualidade vêm sendo modificados e ampliados ao longo do tempo. Permanece no topo da lista (Figura 1), à semelhança do que já ocorria na década passada, a variável preço como muito importante na tomada de decisão para adquirir ou não um determinado fruto ou hortaliça. Entretanto, outros quesitos que eram fundamentais há 10, 15 e 20 anos atrás, vêm reduzindo seu grau de importância. Com isso não se está afirmando que tratam-se de quesitos não relevantes. Apenas têm reduzido seu grau relativo de importância. É o caso da marca, do tamanho (frutos grandes) e da sazonalidade. Por outro lado, outras variáveis estão crescendo em importância, e projeta-se que haverá, cada vez mais, priorização por produtos: a) *in natura*, b) com propriedades nutricionais e funcionais diferenciadas, c) com ampliação da vida de prateleira e da praticidade para o consumo, d) com inclusão de aspectos qualitativos como sabor, coloração e aroma, e) com certificação da segurança e tipicidade regional. Dessa forma, percebe-se que há alteração no perfil da demanda quanto ao conceito de qualidade.

Nesse contexto, as ações na fase de pré e pós-colheita passam a ter importância fundamental para o atendimento da atual e futura demandas. Para o atendimento dessas

demandas, a cadeia produtiva deverá se preparar certificando e diferenciando seus produtos e processos de acordo com normativas reconhecidas nacional e internacionalmente, como é o caso da Produção Integrada (PI), da Euro Retailer Producer - Good Agricultural Practices (EUREP-GAP), da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC - campo), da International Organization for Standardization (ISOs). Esses programas objetivam, de maneira geral, proteção dos recursos naturais, minimização no uso de agrotóxicos, atendimento aos requisitos sociais, proteção da saúde humana (trabalhador da cadeia produtiva e consumidor), garantia da qualidade e de segurança dos alimentos, bem como operacionalização de sistemas de rastreabilidade, sempre observando os padrões de identidade e qualidade.

Porém, no Brasil, ainda se perde em torno de 30% do total de frutos e hortaliças produzidas. Evidentemente que essa média é variável dependendo da espécie e do manejo na pré e pós-colheita. Dentre as causas para esse panorama, estão as deficiências de manejo dos pomares, a colheita em estágio de maturação inadequado, a elevada atividade metabólica da maioria dos produtos, os danos mecânicos no manuseio e transporte, a má qualidade das rodovias, especialmente na área rural, a deficiência de embalagens, a inexistência ou interrupção da cadeia de frio, a fragilidade estrutural da logística, dentre outras.

Por outro lado, tem havido progresso quanto à conscientização da importância do consumo de frutos e hortaliças, considerando seus aspectos nutricionais e funcionais, ambos importantes na prevenção de doenças e na melhoria da qualidade de vida.

Nesse contexto, durante o Congresso Brasileiro de Fruticultura de 2006, Fernandes, (2006), apresentou como principais desafios para as ações imediatas de pesquisa: a) a caracterização dos materiais já em cultivo comercial consolidado e de espécies nativas, já que o País é berçário de genótipos perfeitamente adaptados, alguns em regiões de climas temperado, outros de clima tropical ou semi-árido, b) o desenvolvimento de genótipos mais completos em componentes de importância à saúde, c) o desenvolvimento de tecnologia para a indução da produção e preservação desses compostos, como fibras solúveis, pigmentos hidrossolúveis (antocianinas) e hidrofóbicos (carotenos, licopenos e clorofilas), folatos, glicosinatos, ácido ascórbico, resveratrol, dentre outros, bem como daqueles envolvidos em propriedades sensoriais, como sabor e aroma, d) o desenvolvimento de tecnologias de processamento capazes de preservar-se, ao máximo, os potenciais nutricional e funcional, e) a adoção de sistemas de produção que busquem produtividade, boa apresentação dos frutos, proteção do meio ambiente e

do trabalhador e diminua a dependência de insumos externos, melhoria da logística, e, f) a estruturação de políticas públicas impulsionadoras de maior consumo de frutos e hortaliças.

Para atender a esses aspectos de qualidade, exigidos no mercado, vale a pena destacar as estratégias que têm sido adotadas pelas instituições de pesquisa, empresas, indústrias, produtores e varejistas: a inovação na forma de oferta, aumento na vida de prateleira, profissionalização da comercialização, redução de perdas pós-colheita, padronização das embalagens, educação do consumidor, fornecimento de especificações adicionais, monitoramento dos níveis de resíduos agrícolas (rastreadabilidade), associativismo de produtores, adoção de procedimentos de colheita e pós-colheita adequados. Uma ação transversal às citadas anteriormente está relacionado ao apoio a estudos direcionados à fisiologia e tecnologias pós-colheita, para compreender os fatores biológicos envolvidos na deterioração de frutos, buscando retardar a senescência e reduzir as perdas qualitativas e quantitativas durante e após a colheita.

2.2 MATURAÇÃO DE FRUTOS

Após a fecundação do(s) óvulo(s) ocorre intensa divisão celular, principal responsável pelo crescimento dos frutos na fase inicial de formação. A partir daí, na maioria das espécies, há uma fase estacionária de crescimento, caracterizada pelo desenvolvimento da semente, muito embora ainda não atinja a maturação fisiológica desse órgão. Nessa fase, há intensa diferenciação dos cotilédones e do embrião, e início da lignificação do tegumento. A partir daí, detecta-se nova etapa de aumento do tamanho dos frutos, caracterizada, majoritariamente, pela divisão celular. No final dessa fase, os frutos iniciam o processo de maturação, com significativo aumento do volume das células. Vários autores (Yang & Hoffman, 1984, Brandy, 1987, Chitarra & Chitarra, 2005) têm descrito esse último estágio dividindo-o didaticamente em três fases: a maturação propriamente dita, o amadurecimento e a senescência.

A primeira dessas fases, a maturação propriamente dita, é tida como aquele estágio em que, além da aquisição da maturação fisiológica das sementes, desencadeiam-se as vias biossintéticas responsáveis pelos atributos sensoriais típicos de cada fruto (coloração, sabor, textura e aroma). Dependendo de cada espécie e cultivar, essas alterações, irreversíveis, podem evoluir plenamente ou não, após a colheita dos frutos. Já o amadurecimento é considerado como a fase sucessiva à maturação, na qual

os frutos atingem a plenitude de suas qualidades sensoriais, antecipando-se à senescência ou degenerescência dos tecidos, caracterizada pela perda da compartimentação celular e subcelular, levando à morte dos tecidos e órgãos (LELIÈVRE *et al.*, 1997a). Nas duas primeiras fases, a maturação propriamente dita e o amadurecimento, ainda detecta-se, dependendo da espécie, aumento do tamanho dos frutos, como consequência do aumento do volume das células. Para que esse aumento ocorra é necessário que a parede celular, a membrana celular e o sistema endomembranário, especialmente o tonoplasto, expandam de modo a manter a integridade celular. Na fase de senescência não detectam-se significativas variações de tamanho dos frutos (Chitarra & Chitarra, 2005).

Do ponto de vista fisiológico, a maturação e o amadurecimento são caracterizados por intensa atividade metabólica, tanto por eventos catabólicos (hidrólise do amido, de pectinas, da celulose, respiração, degradação de clorofilas, outros) quanto anabólicos (síntese de aromas, de pigmentos hidrófilos e hidrofóbicos, de ácido ascórbico, de folatos, dentre outros) (Koning, 1994, Giovannoni, 2004). Quando analisados isoladamente, esses eventos são facilmente enquadrados como anabólicos ou catabólicos, mas, quando interpretados no contexto global, torna-se difícil classificá-los dessa forma. Por exemplo, a hidrólise de pectinas, com a atuação de pectilmetilesterases, poligalacturonases e expansinas, resulta na liberação de ácido galacturônico, que é o substrato fundamental da via de biossíntese do ácido ascórbico (Giovannoni *et al.*, 1989, Smith *et al.*, 1990).

Assim, uma via catabólica (hidrólise de pectinas) desencadeia na indução de outra via biossintética anabólica (síntese de ácido ascórbico). A comprovação dessa afirmativa foi dada por Agius *et al.* (2003), que transformaram morangueiro com o gene da *NADPH-dependent D-galacturonate reductase*, resultando em morangos com 2 a 3 vezes mais vitamina C, pelo estímulo à bioconversão do ácido D-galacturônico em L-galactono-1,4-lactona, da enzima ácido D-galacturônico redutase. Não diferentemente desse caso é o processo respiratório, a partir do qual há formação de acil CoA, componente básico da via de biossíntese de ésteres, principais compostos voláteis em frutos (Shalit *et al.*, 2001, El-Sharkawy *et al.*, 2005).

É durante a maturação, incluindo a maturação propriamente dita e o amadurecimento, que os frutos desenvolvem os principais atributos de atratividade sensorial, como é o caso do sabor adocicado, redução da acidez, do amargor, da adstringência e da acidez, da melhoria da textura, da pigmentação, e da emissão de

aromas. É também amplamente conhecido que, paralelamente a esses eventos, há variações na qualidade nutricional e funcional dos frutos. Para a maioria dos frutos há uma correlação direta entre a evolução do estágio de maturação com o incremento no teor de ácido ascórbico e deidroascórbico, flavonóides e compostos voláteis (AGIUS *et al.*, 2003). Essa afirmativa não é válida para todas as espécies, tendo em vista que, por exemplo, na acerola verde-madura, o teor de ácido ascórbico é, em média, 100% superior àquele detectado em acerola madura, ou seja, 230 a 250 mg.100 g⁻¹ e 90 a 130 mg.100 g⁻¹, respectivamente (Moura *et al.*, 2004). Mas para a maioria das espécies, essa afirmativa é verdadeira. Por exemplo, verificou-se que para pêssegos de diferentes cultivares produzidas no Sul do Brasil, a colheita no estágio comumente denominado de maduro, ao invés de verdoengo, resulta em frutos com, em média, 30% mais de ácido ascórbico, 18% mais de compostos fenólicos totais, e com uma atividade antioxidante 40% superior (Marodin & Bender, 2004, Bender *et al.*, 2004, Rieth *et al.*, 2004).

Durante a maturação e o amadurecimento observa-se o máximo acúmulo e/ou bioconversão de compostos orgânicos, com destaque para carboidratos, pigmentos, flavonóides, vitaminas e compostos voláteis. Já os lipídeos e as proteínas não apresentam grandes variações quantitativas durante a maturação. No caso das proteínas, as alterações são majoritariamente de ordem qualitativa, tendo em vista a elevada intensidade de síntese e degradação de enzimas envolvidas na respiração, na síntese de hormônios e no metabolismo secundário, com os respectivos processos regulatórios. Por isso, na origem desses eventos há uma significativa variação na expressão gênica, ou seja, vários genes têm sua transcrição e/ou tradução reduzidas ou suprimidas, e em outros casos, intensificadas. Daí a importância das pesquisas que empregam o transcriptoma, a proteoma e a metaboloma como estratégias de estudo do processo de maturação (Gallardo *et al.*, 2003, Sarry *et al.*, 2004, Saravanan & Rose, 2004, Bachem *et al.*, 1996, Schena *et al.*, 1995, Liang & Pardee, 1992).

No que concerne à indução da maturação, os frutos têm sido classificados em não climatéricos e climatéricos, baseando-se no perfil metabólico relacionado às variações de intensidade respiratória, produção de etileno e respostas a esse hormônio durante a maturação. Nessa conceituação geral, são classificados como não climatéricos, aqueles frutos que para amadurecerem normalmente devem completar essa fase ligados à planta. Se colhidos em fases menos avançadas de maturação não desenvolvem o comportamento climatérico clássico caracterizado pelo aumento da produção de etileno e da respiração, nem adquirem a capacidade de recepção e transdução do sinal etileno,

com as respectivas respostas fisiológicas a esse hormônio. É o caso de morango, melancia, laranja, uva, dentre outros. Ressalta-se, no entanto, que esses frutos produzem etileno, aumentam a respiração no ato da colheita e/ou sob estímulos como danos mecânicos, ataque de insetos, fungos ou bactérias, ou estresses físicos como variações de temperatura, umidade, salinidade e radiação ultra-violeta, mas não respondem, de forma clássica, no que concerne à crise climatérica e às alterações decorrentes desse evento (Chitarra & Chitarra, 2005). Até praticamente 1990, acreditava-se que esse comportamento fosse devido à falta de sistema de recepção do etileno. Com a descoberta do receptor desse hormônio (Guo & Ecker, 2004, Wang *et al.*, 2003, Xie *et al.*, 2002, Tieman *et al.*, 1999 e 2000), foi demonstrado que tanto frutos climatéricos como não climatéricos, tem essa proteína, não sendo essa a causa da diferença entre os processos de maturação.

Frutos como morango, embora classificados como não climatéricos, apresentam significativo aumento da respiração após a colheita, em alguns casos com incrementos superiores a 50 vezes em relação à respiração observada no momento da colheita (Perez *et al.*, 1996). Adicionalmente, sob a ação de etileno, não evoluem todas as respostas típicas da maturação, mas há incremento da síntese de compostos antociânicos e redução da acidez (Perez *et al.*, 1996, Aharoni *et al.*, 2000). Em citros, como laranjas, a aplicação de etileno resulta em amarelecimento da casca, porém não evoluem significativamente os atributos de sabor e aroma (Yamauchi *et al.*, 1997, Tsuchiya *et al.*, 1999). Já a adoção de procedimentos que reduzam a ação desse fitohormônio, como a aplicação de 1-metil ciclo propeno (1-MCP), ou o emprego de atmosfera controlada, com a redução da concentração de O₂ e aumento de CO₂, corroboram para a preservação da coloração esverdeada (Yamauchi *et al.*, 1997). Além disso, tem-se observado que condições de manejo na pré-colheita podem alterar significativamente a intensidade das respostas à ação do etileno. Como exemplo dessa afirmativa foi observado que a aplicação de giberelinas na pré-colheita de citros resulta no retardo da maturação e maior preservação de clorofilas (Trebitsh *et al.*, 1993).

A existência de comportamentos distintos no que concerne a maturação de frutos climatéricos e não climatéricos, bem como suas variantes, permitiu significativos avanços na compreensão do metabolismo do etileno, da respiração e das principais alterações durante a maturação. Até a década de 80, os avanços ocorreram, sobretudo com a compreensão bioquímica-fisiológica dos eventos, pois as relações eram feitas limitadas às correlações entre as respostas fenotípicas com as atividades enzimáticas. A partir daí,

com a disponibilização de técnicas de biologia molecular, associadas com técnicas de bioquímica e fisiologia, pôde-se correlacionar as respostas fenotípicas, com a expressão gênica e a atividade enzimática. Desse modo, vários genes foram caracterizados. Assim, as vias de biossíntese, recepção e transdução do sinal etileno foram elucidadas (Giovannoni *et al.*, 1989, Hamilton *et al.*, 1990, Oeller *et al.*, 1991, Fray & Grierson, 1993, Ayub *et al.*, 1996, Klann *et al.*, 1996). Plantas transgênicas, com os genes superexpressos ou parcialmente silenciados, foram obtidas, permitindo a compreensão de vários eventos relacionados com a maturação de frutos. Porém, até o presente, nenhum trabalho pôs em evidência o mecanismo de aquisição da capacidade de amadurecer, seja de um fruto climatérico ou não.

Dentre os principais trabalhos realizados com a finalidade de compreender o mecanismo de indução da maturação, está o realizado por Picton *et al.* (1993), que estabeleceram perfis diferenciais de proteínas durante várias fases da maturação dos frutos. Porém, a identificação e discriminação de funções não foram concluídas. Semelhantemente, vários genes foram isolados, mas nenhum ou nenhum grupo ainda foi caracterizado como causa da maturação. Na seqüência, Zegzouti *et al.* (1997), trabalhando com tomate, em diferentes estádios de desenvolvimento, com e sem aplicação de etileno, com e sem a aplicação de inibidores da ação do etileno, isolaram clones precocemente expressos em cada fase. Parte desses clones já tem suas funções caracterizadas. É o caso de genes correspondentes a proteínas envolvidas na regulação de promotores (DNA-binding-proteins), no transporte de proteínas, na síntese de etileno, na recepção e transdução do sinal etileno (ETR1, ETR2, CTR1, CTR2, etc), na bioconservação de açúcares (SSP, fosforilases, quilases, β -galactosidases), de componentes de parede celular (PME, endo-PG, exo-PG), síntese de pigmentos e respiração (transportadores).

Diferentemente dos frutos não climatéricos, frutos climatéricos (pêras européias, kiwi e abacate) que só amadurecem completamente após a colheita devido a constante síntese e translocação de hormônios (citocininas), inibidores da ação do etileno (Chen *et al.*, 2001) e auxinas (Chang *et al.*, 2003). Outros frutos, além de serem colhidos nesse estádio, necessitam de tratamento complementar após a colheita, para que desenvolvam o amadurecimento típico da cultivar. É o caso de pêras ‘Passe Crassane’ que, após a colheita, para o adequado amadurecimento, necessitam de armazenamento refrigerado por um período mínimo de 45 a 60 dias, ou a suplementação com etileno, para que o amadurecimento ocorra adequadamente. Segundo Lelièvre *et al.* (1997), deve-se às

distintas regulagens de expressão da ACC oxidase e ACC sintase, que são as duas principais enzimas da biossíntese do etileno. Mas, para a maioria dos frutos, o amadurecimento ocorre de modo similar quando são mantidos ligados à planta ou colhidos. Porém antecipa-se o processo, realizando-se a colheita. Por exemplo, em tomates 'Kadá' a evolução da fase Br ("breaker") para R ("red") é de aproximadamente 6 dias quando mantidos ligados à planta, e de 4 dias quando colhidos na fase Br (Chaves *et al.*, 1996).

Os frutos climatéricos, à semelhança das flores, caracterizam-se por significativo incremento na produção de etileno, sucedida de aumento na respiração, quando colhidos no estágio pré-climatérico ou maturação fisiológica. Outra característica importante dos frutos climatéricos é o fato de apresentarem resposta autocatalítica à ação do etileno. Isso significa que, além de haver a percepção do sinal desse hormônio, há transdução do sinal, resultando numa aceleração da produção do próprio etileno e, em consequência, dos eventos etileno-dependentes, que resultam em mudanças de textura, coloração, sabor e aroma (Skura & Powrie, 1995). Esse comportamento, típico da maioria das cultivares de pêsego, maçã, kiwi, tomate, melão, dentre outras, não é observado em frutos não climatéricos.

2.3 INTERAÇÃO ENTRE CITOCININAS E MATURAÇÃO: PLANTAS TRANSGÊNICAS E ASPECTOS FISIOLÓGICOS

As demonstrações do envolvimento do etileno no processo de maturação de frutos e senescência de folhas e flores são numerosas e clássicas (Hofman & Yang, 1980, Hoffman & Yang, 1980, Kende, 1989, Mckeon *et al.*, 1995, Bleecker & Kende 2000, Wang *et al.*, 2002). Porém, ressalta-se que, à semelhança do já citado para frutos não climatéricos, as respostas à ação do etileno também são dependentes das condições de manejo na pré-colheita. Nem sempre o aumento da produção de etileno, significa aceleração do amadurecimento. Essa hipótese é baseada em trabalhos realizados com brócolis, nos quais foi demonstrado que o controle da irrigação, gerando leves estresses hídricos, permite obter inflorescências com melhor potencial de conservação (Wurr *et al.*, 2002). Partindo desse conhecimento Zaikovski *et al.* (2007) verificaram que esses leves estresses hídricos, estimulam a emissão de novas raízes e a síntese de citocininas, prováveis responsáveis pela preservação da coloração esverdeada. Nesse trabalho foi demonstrado que os brócolis cultivados em condições de estresse hídrico apresentaram

maior produção de etileno, mas mantiveram-se mais esverdeados do que os demais, sugerindo que a maior síntese de citocininas pode ser um fator regulador da ação do etileno.

As citocininas são hormônios amplamente conhecidos por participarem em praticamente todas as fases do crescimento e desenvolvimento dos vegetais, incluindo a indução da expressão de genes envolvidos em mudanças fisiológicas e morfológicas necessárias à adaptação das plantas, promovendo alterações na taxa metabólica, na atividade enzimática, na formação de órgãos, na quebra de dominância apical, na mobilização de nutrientes orgânicos e inorgânicos e, têm sido destacadas pelo envolvimento na redução da velocidade de senescência de raízes, folhas, flores e frutos (Hedden & Philips, 2000).

A caracterização de um gene relacionado com a biossíntese de citocininas em plantas, o *ipt* (isopentenil transferase), foi realizada a partir de tumores, resultantes da transferência e expressão de genes de *Agrobacterium spp.* para o genoma da planta infectada. Os genes presentes na região do T-DNA, região de transferência para plantas, codificam por enzimas envolvidas na via de biossíntese de auxinas e citocininas. Experimentos comprobatórios dessa funcionalidade foram conduzidos com plantas de tabaco expressando o gene *ipt*, nas quais detectou-se aumento da concentração de citocininas, e a conseqüente formação de gemas caulinares *ex vitro* e *in vitro*, além do aumento da matéria seca em função do maior acúmulo de fotoassimilados. Já a expressão dos genes bacterianos *iaaH* e *iaaM*, envolvidos na biossíntese de auxinas, provocou intensa formação de raízes em plantas transgênicas (Peres, 2002).

De modo geral o aumento dos teores de citocininas nas plantas tem sido obtido por três vias principais: 1) suplementação com moléculas exógenas, 2) indução da síntese pelo manejo das plantas (Zhou *et al.*, 2004, Zaikovski *et al.*, 2007), e/ou 3) através de engenharia genética (Hedden & Philips, 2000, Chang *et al.*, 2003, MacCabe *et al.*, 2001). Nesse último caso a maioria dos trabalhos têm usado superexpressão do gene *ipt*, que corresponde à primeira enzima envolvida na síntese desse hormônio, responsável pela formação de isopenteniladenosina-5-fosfato a partir da adenosina-5-fosfato e do isopentenilfosfato. Como principais respostas ao aumento dos teores de citocininas em vegetais, têm-se observado o incremento de brotação lateral e o retardamento da senescência foliar em tabaco (Hedden & Philips, 2000), além do prolongamento da vida de prateleira, provavelmente associado à menor produção de ácido abscísico (ABA) e à redução da sensibilidade ao etileno. Essa constatação foi feita em flores de petúnia

superexpressando o gene *ipt* (Chang *et al.*, 2003). Em tomateiro, observou-se que a indução da síntese de citocininas resultou no aumento do número de frutos, de sólidos totais e sólidos solúveis totais, mas redução do tamanho dos frutos (Martineau *et al.*, 1995). Em alface, também transformada visando aumentar a síntese de citocininas, houve maior acúmulo de açúcares, maior preservação da coloração esverdeada de folhas e retardamento do florescimento de alface (McCabe *et al.*, 2001).

Os genes componentes da via de biossíntese de citocininas em plantas ainda não estão totalmente caracterizados. Os maiores avanços foram obtidos com o isolamento e sequenciamento de clones e de genes *ipt* em *Agrobacterium spp*, que permitiu avanços na caracterização de seqüências homólogas em vegetais. Kakimoto (2001) identificou nove genes com alta similaridade ao *ipt* de *Agrobacterium spp*, em *Arabidopsis thaliana*, designados *AtIPT1* à *AtIPT9*. Análises filogenéticas indicaram que os clones *AtIPT2* e *AtIPT9* codificam para tRNA-IPT, enquanto os outros sete *AtIPTs* são mais similares ao gene bacteriano *ipt*. A expressão de sete desses genes em *Escherichia coli* resultou na secreção de isopentinil adenina (*iPA*) e zeatina (*Z*), confirmando que esses genes codificam enzimas envolvidas na biossíntese de citocininas em plantas (Takei *et al.*, 2001). Além disso, calos superexpressando a *AtIPT4*, sob o controle do promotor constitutivo CaMV 35S, regeneraram de gemas caulinares, mesmo na ausência de citocininas (Kakimoto, 2001).

Gan & Amasino (1995) desenvolveram um sistema de transformação com promotor senescência-específico, que não permite o acúmulo excessivo de citocininas durante todo o desenvolvimento, mas apenas na fase de senescência. Nesse sistema, o *ipt* foi fusionado a um promotor senescência-específico, denominado SAG (*senescence associated genes*), o qual é induzido na fase de senescência. O promotor SAG foi identificado em tecidos vegetais senescentes de *Arabidopsis thaliana*. Essa construção fez com que a expressão do clone *ipt* fosse induzida já no início na senescência, retardando a velocidade com que as alterações típicas dessa fase ocorressem (Hedden & Philips, 2000).

Outra resposta ao incremento da síntese de citocininas está relacionada ao aumento da produção de matéria-seca em plantas, como foi demonstrado no acúmulo de hexoses em alface (McCabe *et al.*, 2001), e sólidos totais em tomate (Martineau *et al.*, 1995), ambos os eventos de interesse tecnológico. Um exemplo ilustrativo dessa afirmativa é o tomateiro transformado com um clone *ipt* sob o controle de um promotor ovário-específico. Nas plantas transformadas houve maior acúmulo de citocininas nos

ovários, o que favoreceu um maior dreno de fotoassimilados, resultando em aumento de sólidos solúveis, principalmente de açúcares. A alta concentração de citocininas nos ovários também favoreceu maior percentual de ovários fecundados, e, conseqüentemente, maior número de frutos formados. Porém, os frutos das plantas transgênicas apresentaram menor peso do que os de plantas não transformadas. Isso pode ser explicado pelo fato de haver maior número de frutos nas plantas transgênicas, resultando numa maior competição por compostos fotossintéticos (Martineau *et al.* 1995).

Esse sistema de expressão órgão específico contendo o gene *ipt* também foi utilizado para obtenção de plantas transgênicas de alface por McCabe *et al.* (2001) e em brócolis por Chen *et al.* (2001). A alface transgênica apresentou um atraso do processo de senescência e, como conseqüência, houve melhor preservação de clorofila, o que sugere uma aplicação potencial dessa estratégia para prolongar a vida de prateleira após a colheita. Além disso, essas plantas transgênicas apresentaram-se menos suscetíveis à *Botrytis cinerea*, uma vez que esse patógeno infecta predominantemente tecidos em senescência. Em brócolis, as respostas foram similares, especialmente no que concerne à retenção da coloração esverdeada. Mais especificamente, foi observado que os brócolis transgênicos mantiveram um teor de clorofilas 50% maior do que os não transformados após 4 dias de estocagem em temperatura de 25°C (Chen *et al.* 2001).

Plantas de petúnia transformadas geneticamente com o gene *ipt* também apresentaram retardamento da senescência, mas nesse caso nas flores. Os resultados evidenciaram que as plantas transformadas, quando comparada às não transformadas, foram menos sensíveis à ação do etileno, e necessitaram de períodos mais longos para a indução endógena desse hormônio. Além disso, as plantas transformadas apresentaram níveis endógenos mais baixos de ácido abscísico (ABA), hormônio relacionado com a senescência de flores (Chang *et al.*, 2003). Esses dados consubstanciam as evidências genéticas de que as atividades de citocininas, ABA e etileno estão interligadas durante o processo de senescência.

2.4 INTERAÇÃO ENTRE ETILENO E MATURAÇÃO: ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS E PLANTAS TRANSGÊNICAS COM BAIXA PRODUÇÃO DE ETILENO

O etileno (C₂H₄), que em condições normais de temperatura e pressão está na forma de gás, tem sua via de síntese bioquimicamente bem caracterizada desde 1984 (Yang & Hoffman, 1984). Em nível molecular, algumas etapas têm sido descritas mais

recentemente (Kende, 1993, Lelièvre *et al.* 1997, Fluhr & Matoo, 1996). Os primeiros estudos foram publicados em 1965, quando Lieberman *et al.* (1965) descobriram que o etileno era sintetizado *in vitro* a partir do aminoácido metionina, o que foi posteriormente confirmado *in vivo* (Lieberman *et al.* 1966).

A ACC sintase converte o SAM em ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) e 5 –metilthioadenosina (MTA). Esta etapa é limitante para a biossíntese do etileno (Yang & Hoffman, 1984). A ACC sintase é codificada por uma família gênica e a transcrição das diferentes formas é induzida pelas diferentes condições fisiológicas e ambientais (Theologis, 1992). A etapa seguinte é a conversão da ACC em etileno pela ACC oxidase, enzima presente na maior parte dos tecidos. Como para ACC sintase, muitas isoformas de ACC oxidase foram identificadas (Lasserre *et al.*, 1996, Hamilton *et al.*, 1991, Dong *et al.*, 1992, Balagué *et al.*, 1993).

A conjugação do ACC representa uma etapa importante na síntese do etileno, pois este processo diminui a concentração de ACC livre no citosol, e isso pode regular a produção de etileno (Yang & Hoffman, 1984, Liu *et al.*, 1985). A transformação de tomates com o clone ACC deaminase resultou numa significativa redução da produção de etileno (Klee *et al.*, 1991), semelhantemente ao obtido nos trabalhos com a ACC sintase (Oeller *et al.*, 1991) e ACC oxidase (Hamilton *et al.*, 1990, Ayub *et al.*, 1996, Silva, 2000).

Durante o amadurecimento de frutos climatéricos, são encontrados baixos níveis de ACC antes do incremento da síntese de etileno e da respiração (Hofman & Yang, 1980). Nas fase inicial da maturação, quando há pouca produção de etileno, não é constatada atividade da ACC sintase (Inaba, 1993), mas ocorre aumento precedendo o acúmulo de ACC e à produção de etileno no início do amadurecimento (Hoffman & Yang, 1980, Kende, 1989).

No pleno amadurecimento, quando os frutos já atingiram a plenitude de suas características sensoriais, há tendência à queda no conteúdo de ACC e da produção de etileno (Hartmann *et al.*, 1987).

Tecidos de maçãs imaturas exibiram um aumento de não mais do que cinco vezes na liberação de etileno após a adição de ACC sobre os tecidos, enquanto que após o climatério, o incremento foi maior que do que uma centena de vezes (Hoffman & Yang, 1980, Yang, 1985). Assim, os autores concluem que frutos, no estágio imaturo, apresentam reduzida capacidade de converter ACC em etileno, sendo a ACC oxidase a enzima limitante durante essa fase (Hoffman & Yang, 1980, Nowacki & Plich, 1984, Bufler,

1984).

O fato da liberação de etileno incrementar após a exposição das frutas ao etileno exógeno indica que sua síntese é autocatalítica (Yang & Hoffmanm, 1984). Entretanto, a resposta ao estímulo do etileno exógeno sobre sua própria síntese pode levar semanas ou dias para acontecer, dependendo da maturidade e da sensibilidade dos frutos a esse gás (Harkett *et al.*, 1971). Esse comportamento foi atribuído à influência de um “inibidor” do amadurecimento existente nos frutos na fase pré-climatérica (Burg, 1962), que diminui com o avanço da maturação (Pratt, 1975), e/ou ao aumento na sensibilidade (receptor) dos tecidos ao etileno (McGlasson, 1985, Ecker, 1995).

É conhecido que a resistência ao amadurecimento decresce com a maturação (Yang, 1985). Ao ultrapassar a “barreira” fisiológica imposta pelos “inibidores” do amadurecimento, novos receptores são sintetizados e a produção autocatalítica de etileno é estimulada (McGasson, 1985, Yang, 1987).

Assim, a capacidade dos frutos desenvolverem a síntese de ACC sintase em resposta à aplicação do etileno exógeno é dependente do estágio de desenvolvimento, que está relacionado à sensibilidade dos tecidos ao etileno (Yang, 1987). Estudos com transformações genéticas e mutantes têm mostrado os mesmos resultados (Lelièvre *et al.*, 1997, Van der Straeten, 1990).

Além disso, a capacidade de conversão de ACC em etileno também aumenta antes do início da síntese autocatalítica de etileno (Lau *et al.*, 1986, Mansour *et al.*, 1986), indicando que a ACC oxidase também está sob controle do desenvolvimento, embora a atividade da ACC oxidase possa ser induzida em frutos na fase pré-climatérica por um curto tratamento com etileno, enquanto que a ACC sintase e a síntese de etileno não (Lelièvre *et al.*, 1997).

Visto que o aumento da síntese *de novo* das enzimas ACC sintase e ACC oxidase é essencial para o incremento da produção de etileno dos frutos (Yang, 1975, Plich, 1989, Liu *et al.*, 1999, Sunako *et al.*, 1999) e, com base em todas as relações discutidas anteriormente, sugere-se que o incremento da expressão dos genes da ACC oxidase precede à expressão daqueles da ACC sintase e que ambos controlam o avanço da maturação (Lelièvre *et al.*, 1997). Essa hipótese foi comprovada em estudo de expressão diferencial durante a maturação (Lelièvre *et al.*, 1997, Sunako *et al.*, 1999). Entretanto, há clones dessas enzimas com expressões constitutivas e outros expressos sob outros estímulos que não a maturação, como por exemplo danos mecânicos e ataque de patógenos (Sunako *et al.*, 1999). Aliás, vários são os estímulos que afetam a produção

de etileno e, portanto, devem afetar a expressão das ACC sintases e ACC oxidases. Vários estudos têm mostrado a acumulação de mRNAs de ACC sintases e ACC oxidase em tecidos vegetais em decorrência de baixas e altas temperaturas de armazenamento, toxicidade causada pela aplicação de componentes tóxicos, lesões por microorganismos, batidas e até mesmo por contato do tecido com obstáculos, falta e excesso de água, substâncias com atividade auxínica ou citocínica, luz, variações na concentração de O₂ e CO₂ durante o armazenamento (Phan, 1975, Clijsters, 1975, Yang & Hoffman, 1984, Takahashi, 1986, Hartmann *et al.*, 1987, Kende, 1993, Inaba, 1993, Mathooko, 1996, Lelièvre *et al.*, 1997).

Assim como outros fitohormônios, o etileno deve ser percebido pela célula para desempenhar sua função fisiológica (Yang, 1985). No caso dos frutos, o etileno atua como um sinal para que eles avancem o desenvolvimento e iniciem o amadurecimento. Após a percepção, este sinal é transmitido ao núcleo, por meio de eventos intermediários, onde então, estimulará ou inibirá a transcrição e tradução de alguns genes que, posteriormente, serão responsáveis por mudanças nas vias biossintéticas, culminando com a resposta fisiológica, propriamente dita. Todos esses acontecimentos estão interligados, formando a rota de transdução do sinal etileno. Nos últimos 10 anos, alguns componentes da rota de transdução do etileno foram descobertos e descritos em nível molecular, destacando-se as proteínas receptoras do sinal e também outros componentes responsáveis pelos eventos intermediários (Johnson & Ecker, 1998, Solano & Ecker, 1998, Bleecker & Kende, 2000). Essas descobertas foram feitas em várias espécies, mas, os maiores avanços foram obtidos em *Arabidopsis thaliana* e em tomateiro, plantas-modelo pela amplitude de mutantes e de informações no patamar genômico, proteômico e fisiológico existentes (Hamilton *et al.*, 1990, Oeller *et al.*, 1991, Klee *et al.*, 1991, Chaves *et al.*, 1998).

Esse conhecimento começou a ser utilizado pela biotecnologia para interferir nos processos fisiológicos vegetais controlados pelo etileno, como por exemplo, obter produtos com tempo de armazenagem mais longo.

Com a evolução dos estudos da maturação, utilizando técnicas de biologia molecular, vários clones e genes foram isolados. Os primeiros resultados foram obtidos por Grierson *et al.* (1986), que isolaram clones correspondentes à poligalacturonase e à pectilmetilesterase de tomate, enzimas que participam da hidrólise da parede celular desse fruto. Para testar a provável função desses clones e outros que foram sendo isolados, os trabalhos basearam-se no silenciamento ou na superexpressão do clone em estudo, seja em sistemas homólogos ou heterólogos (Hamilton *et al.*, 1990, Oeller *et al.*,

1991, Gray *et al.*, 1992, Ayub *et al.*, 1996, Silva *et al.*, 2004).

No que concerne à rota de biossíntese de etileno, a primeira enzima purificada e que teve seus genes caracterizados foi a ACC sintase (Van der Straen *et al.*, 1990). Os trabalhos de avaliação bioquímica desta enzima, que apontaram para a existência de, no mínimo, três isoformas, foram comprovados com a existência de uma família gênica, composta por genes altamente heterólogos. Além de codificarem por proteínas de peso moleculares diferentes, a família gênica da ACC sintase possui genes regulados por estímulos altamente específicos e, em alguns casos, tecido, órgão e estágio de desenvolvimento específico (Kende, 1993).

Pela transformação genética de tomateiro, com clone da ACC sintase, obteve-se a redução da produção de etileno de 99,5% (Oeller *et al.*, 1991). Porém a redução da produção de etileno só ocorreu nos frutos durante o amadurecimento. Sob a ação de dano mecânico, tanto em folhas como em frutos imaturos, apresentaram incremento da produção de etileno. Isto se deu devido à elevada diferença existente entre os genes.

Na continuidade dos trabalhos foi caracterizada a família gênica da ACC sintase em abóboras e em maçã. Em ambos os casos foram caracterizados vários genes, mas apenas 3 funcionais, com comportamento semelhante ao observado em tomates (Kende, 1993).

Os avanços com a ACC oxidase foram mais recentes. Isto porque somente em 1991 é que Ververidis & John (1991) conseguiram dosar a atividade dessa enzima num sistema *in vitro*. O sucesso desse trabalho foi baseado nas informações preliminares de Hamilton *et al.* (1990), que identificaram um cDNA denominado pTOM13, que, quando inibida sua expressão, reduzia a produção de etileno, a atividade ACC oxidase *in vivo*, e, retardava a maturação de tomates.

A família gênica da ACC oxidase foi amplamente estudada em tomateiro (Bouzayen *et al.*, 1993) e em meloeiro (Lasserre *et al.*, 1996). Diferentemente da ACC sintase, a família gênica da ACC oxidase é altamente homóloga e composta por 3 genes funcionais (ACO1, ACO2 e ACO3).

Embora a alta homologia, a regulação é relativamente específica. Assim, por exemplo, a ACO1 é expressa majoritariamente durante o amadurecimento, sob a ação de etileno exógeno e dano mecânico, a ACO2 expressa-se majoritariamente em hipocótilos estiolados e a ACO3 expressa-se majoritariamente em flores (Lasserre *et al.*, 1996, Bouquin *et al.*, 1997).

Mesmo que a homologia entre os genes seja elevada, acima de 75%, as

proteínas traduzidas apresentam comportamentos bioquímicos distintos. A afinidade pelo substrato, os pls e as atividades específicas variam grandemente entre as isoformas. (Bouzayen *et al.*, 1993).

Depois dos trabalhos realizados por Hamilton *et al.* (1990, 1991), Ayub *et al.* (1996) também realizaram a transformação genética com um clone da ACC oxidase de melão, em orientação “antisense” (pMEL1). Este clone havia sido isolado e caracterizado previamente por Balagué *et al.* (1993). Pela transformação, Ayub *et al.* (1996) obtiveram melões com reduzida produção de etileno e elevado potencial de conservação. Este material permitiu distinguir eventos etileno-dependentes e etileno-independentes durante a maturação (Hadfield *et al.*, 2000).

No Laboratório de Biotecnologia de Frutos e Hortaliças foi obtido um clone da ACC oxidase de maçã ‘Royal Gala’, denominado pAP4. Pela alta homologia de seqüência com o clone pMEL1 de melão, caracterizado por Balagué *et al.* (1993) e utilizado por Ayub *et al.* (1996), o pAP4 foi utilizado, numa construção “antisense” (pAP4AS), para a transformação genética do meloeiro ‘Védrantais’, do grupo Cantaloupensis. Os frutos colhidos de plantas transformadas com o clone pAP4AS apresentaram uma baixa produção de etileno (inferior a $0,5 \text{ nl.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$), enquanto naqueles colhidos de plantas não transformadas, a produção de etileno ultrapassou $30 \text{ nl.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$. Isso resultou no aumento médio de 10 dias no ciclo de maturação e de 10 dias no tempo de conservação após a colheita (Silva *et al.*, 2004). Na avaliação da evolução da maturação os frutos também apresentaram uma maior firmeza de polpa, teor alto de sólidos solúveis totais e menor intensidade de aroma (compostos voláteis) do que os frutos de plantas não transformadas.

Ayub *et al.* (1996) e Hadfield *et al.* (2000) trabalharam com melões ‘Charenthais’ transformados geneticamente com gene ACC oxidase “antisense” e melões não transformados avaliando a expressão de mRNAs durante a maturação. Foi posto em evidência um grupo de cDNAs com expressão reduzida nos frutos transformados, porém induzidos se expostos a tratamento com etileno, indicando regulação direta pelo etileno. Um segundo grupo de cDNAs não teve alteração significativa da expressão e não foi afetado pelo etileno exógeno, indicando regulação etileno-independente. No terceiro grupo, a expressão foi reduzida em frutos transformados e permaneceram inalteradas quando do tratamento com etileno exógeno. Esses resultados estão de acordo com a hipótese de Lelièvre *et al.* (1997), que propunha que a regulação das rotas metabólicas, etileno-dependente e etileno-independente, coexistem para coordenar o processo de

maturação dos frutos.

2.5 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM FRUTOS

Os compostos voláteis são os principais componentes do aroma, que é um dos principais atributos de qualidade dos frutos. Ele corresponde a um conjunto de sensações do olfato, estimuladas principalmente pelos compostos voláteis, como ésteres, aldeídos, álcoois, terpenos, cetonas, lactonas dentre outros. De maneira geral, os compostos voláteis são de baixo peso molecular e encontram-se em misturas complexas, juntamente com óleos essenciais. A combinação entre esses compostos e, algumas vezes, a predominância de alguns deles, é que confere a individualidade do aroma para cada fruto, ou seja, a combinação em proporções diferentes de compostos dá a peculiaridade aromática do fruto.

Os compostos voláteis podem ser encontrados juntamente com fenóis, éteres e compostos heterocíclicos oxigenados. De modo geral, os frutos e hortaliças, juntamente com as flores, são os órgãos vegetais mais ricos em compostos voláteis. Na tabela I estão citados os principais grupos de compostos voláteis responsáveis pelo aroma de algumas espécies de frutos.

Os ésteres resultantes da esterificação dos álcoois, são os principais contribuintes para o aroma na maioria dos frutos. A via de biossíntese dos ésteres pode ter origem principalmente da degradação de ácidos graxos e aminoácidos podendo também proceder de carboidratos (Figura 2). De maneira geral, tanto os aminoácidos quanto os ácidos graxos são convertidos até aldeídos ramificados e alifáticos e, posteriormente, são reduzidos a álcoois. Essa reação é catalisada pelas enzimas álcool desidrogenases. A acilação ou esterificação dos álcoois ocorre com a participação de um grupamento acil CoA, catalisada pelas enzimas álcool aciltransferase (Harada *et al.*, 1985, Aharoni *et al.*, 2000, Hahyaoui *et al.*, 2002, Beekwilder *et al.*, 2004, Li *et al.*, 2006) (Figura 2).

Tabela 1 - Principais compostos voláteis em frutos, hortaliças e flores.

Produto	Compostos voláteis principais
Abacate	Aldeídos e álcoois
Abacaxi	Ésteres
Banana	Ésteres
Laranja, tangerina e limão	Aldeídos e terpenos
Maçã	Ésteres
Maracujá	Ésteres
Manga	Ésteres
Melão	Ésteres
Morango	Ésteres
Pêra	Ésteres
Pêssego	Aldeídos e lactonas
Tomate	Aldeídos e álcoois
Brócolis	Tio-ésteres e outros compostos sulfurados
Flores (<i>rosa, clarkia beriwii</i>)	Ésteres e álcoois

Fonte: vários autores.

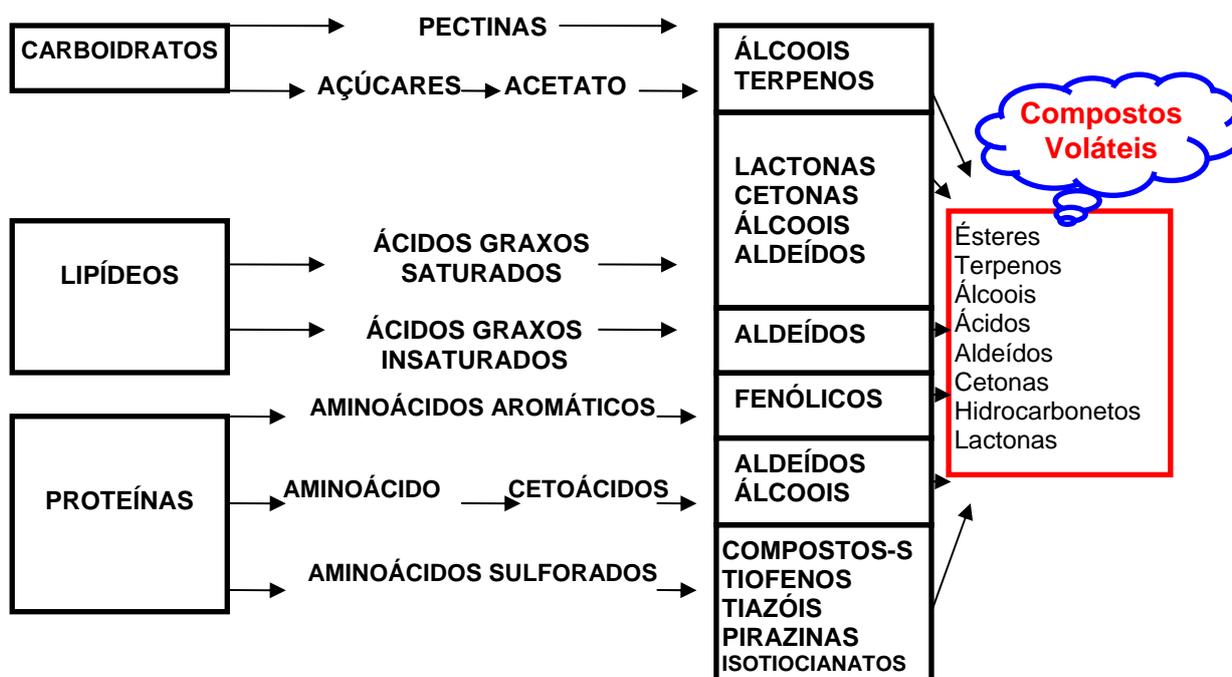


Figura 2 - Esquema geral da síntese de compostos voláteis em frutos, hortaliças e flores.

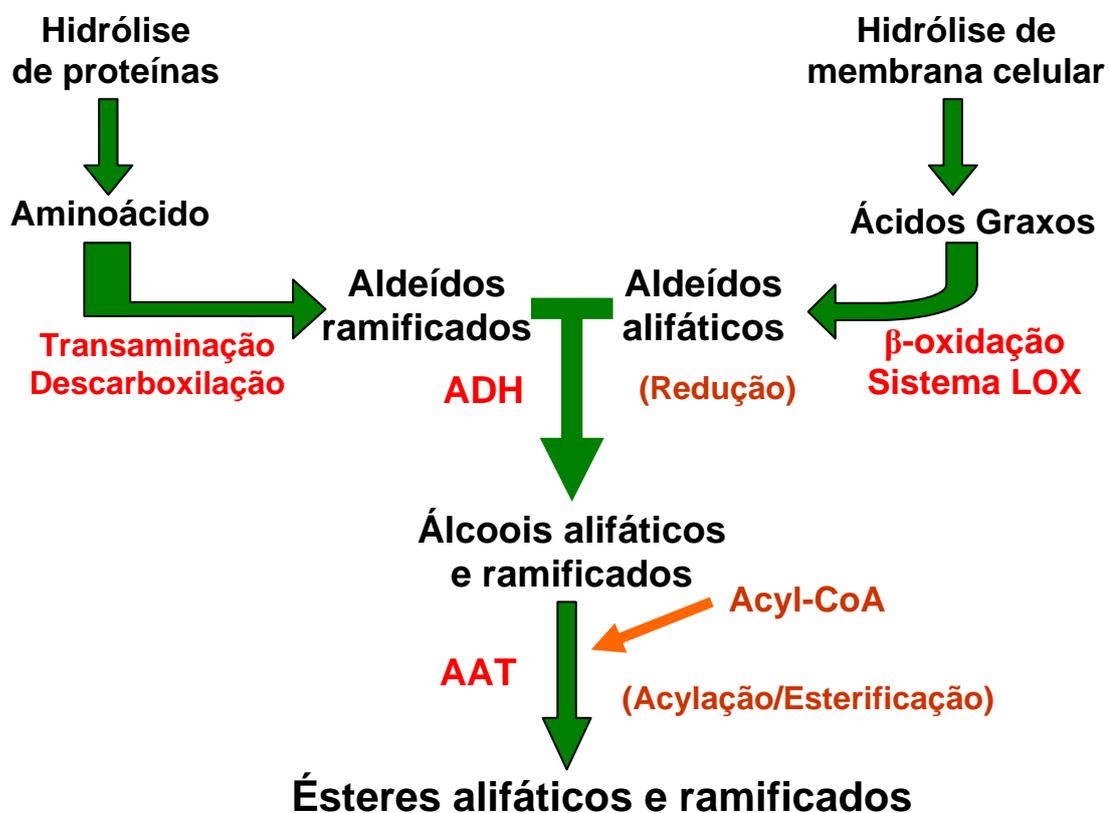


Figura 3 - Esquema de biossíntese de ésteres a partir de aminoácidos e ácidos graxos.

A produção de compostos voláteis é dependente do tipo de fruto, cultivar e das condições de cultivo. O aporte nutricional pode influenciar o desenvolvimento e mesmo ter efeito no aroma dos frutos e hortaliças (Randle, 1997, Brown *et al.*, 1968, Smogyi *et al.*, 1964). O manejo e as condições de cultivo promovem mudanças no perfil aromático dos frutos. Por exemplo, em maçãs observou-se que o raleio de frutos, reduzindo a proporção frutos/folhas, incrementou o conteúdo de compostos aromáticos (ésteres) além dos sólidos solúveis totais (Pool *et al.*, 1996). Além disso, a redução da exposição solar dos frutos diminuiu a produção de ésteres em maçãs (Miller *et al.*, 1998).

A aplicação de amino-etoxi-vinilglicina (AVG) em pêras e maçãs, retardou a maturação e prolongou a vida de prateleira, mas reduziu a síntese de compostos antociânicos e a produção de voláteis (Romani *et al.*, 1983, Child *et al.*, 1984). Porém, esse efeito pôde ser revertido quando esses frutos foram expostos ao etileno logo após a colheita (Bangerth *et al.*, 1984) ou durante a estocagem sob refrigeração (Bangerth & Streif, 1987).

Maçãs 'Golden Delicious' que receberam na pré-colheita múltiplas aplicações de fungicidas inibidores de síntese de esterol tiveram alta redução na produção de compostos voláteis (Aubert, 1997). Song & Bangerth, (1996) sugerem que frutos colhidos antes do ponto ideal de maturação têm sua produção de compostos voláteis limitada pela baixa atividade dos processos fisiológicos fundamentais como a respiração e produção de etileno.

A cultivar e estágio de maturação também são determinantes para o aroma dos frutos. Em tomate, por exemplo, a diferença entre cultivares faz com que haja uma grande diferença de produção de aromas (Goff & Klee, 2006, Youg *et al.*, 2004 Stevens *et al.*, 1977). A colheita de frutos antecipadamente e/ou imaturos atua de forma negativa na manutenção da qualidade e na produção de aroma de maçãs e tomates (Brown *et al.*, 1968, Dirink *et al.*, 1989, Baldwin *et al.*, 1991).

O processo de melhoramento e da busca de plantas frutíferas com maior produção e rentabilidade em muitos casos fez com se perde-se outros atributos de qualidade como é o caso de aroma. No melhoramento de tomate, a seleção proporcionou aumento da produção de licopeno, porém o aroma reduziu-se a menos da metade em relação a variedades silvestres (Buttery & Ling, 1993). O desenvolvimento de compostos voláteis em frutos climatéricos parece estar relacionado com a produção de etileno. Entre os trabalhos realizados nessa linha de pesquisa, com compostos voláteis de frutos, não há uma unanimidade a respeito da influência direta do etileno na rota de biossíntese. Porém, é possível afirmar que existem vias ou até mesmo enzimas do processo de síntese de aromas que são etileno-dependente e outras etileno-independentes (Bauchot *et al.*, 1998, Shalit *et al.*, 2001, Flores *et al.*, 2002, Yahyaoui *et al.*, 2002).

Segundo Fallik *et al.* (2001), o aroma e o paladar em melões da variedade Gália, é resultado de uma interação complexa entre açúcares, ácidos orgânicos, minerais e compostos voláteis, e que esses dependem do estágio de desenvolvimento do fruto, bem como o ponto de colheita e das condições de cultivo. Adotando o sistema de "Headspace" SPME de amostragem para cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massa, considerado um método eficiente de avaliação, Fallik *et al.*, (2001) identificaram o acetato de butil, acetato de 2-metil-butil e acetato de hexil como os mais abundantes compostos voláteis presentes em melões da variedade 'Galia'. Em melões os principais compostos voláteis são os ésteres, sendo os acetatos, butanoatos e propanoatos os principais (Guis *et al.*, 1997, Homatidou *et al.*, 1992, Ueda *et al.*, 1997). Também encontram-se alguns aldeídos e álcoois, mas em menores quantidades.

Em melões Cantaloupe 'Charentais', Bauchot *et al.* (1998) verificaram que quanto menor a produção de etileno, maior é a conservabilidade e menor a produção de compostos voláteis. Flores *et al.* (2002) demonstraram que quanto maior a produção e ação do etileno, maior é a produção de compostos voláteis nesses mesmos melões. No mesmo trabalho foi demonstrado que o etileno regula também as reações de redução dos ácidos graxos e aldeídos, dando indícios que está via de biossíntese é etileno-dependente (Flores *et al.* 2002).

Em mangas, Lalel *et al.*, (2003) verificaram que a produção de terpenos, durante a maturação, é paralela ao aumento da produção de etileno até seu pico máximo. Depois disso, a produção de terpenos reduz-se, enquanto a produção de ésteres continua aumentando e pode estar relacionada com a degradação de ácidos graxos que aumenta com o decorrer da maturação.

As ações de conservação de frutos buscam a redução da produção de etileno, seja através de transformação genética, da aplicação de inibidores da ação do etileno (1-MCP, AVG, etc), do uso de refrigeração ou atmosfera controlada. Porém, essas ações implicam na redução de um dos principais atributos de qualidade tecnológica dos frutos, o aroma (El-Sharkawy *et al.*, 2005, Silva *et al.* 2004, Defilippi *et al.* 2004, Shalit *et al.*, 2003, Baldwin *et al.*, 2002). Por exemplo, Lara *et al.*, (2003) verificaram que a biossíntese dos compostos voláteis de pêras armazenadas em atmosfera controlada, com baixa concentração de O₂, é regulada por outros fatores, além da atividade e concentração da enzima álcool aciltransferase (AAT). A disponibilidade de precursores (álcool e acetaldeído) para a via de biossíntese, parece ser aspecto chave na produção de aromas. As enzimas, as álcool desidrogenases e as álcool acil transferases são consideradas enzimas chaves na via de biossíntese de ésteres, compostos aromáticos.

As Álcool desidrogenases (ADH, EC 1.1.1.1) catalisam de forma reversível a conversão dos aldeídos para os correspondentes álcoois. Elas estão envolvidas na resposta ao estresse em plantas, principalmente em anaerobiose, onde é responsável pela produção de etanol. As ADHs também estão envolvidas na resposta a outros estresses e presença de hormônios como o ácido abscísico (Matton *et al.* 1990, De Bruxelles *et al.* 1996, Peters & Frenkel, 2004). No entanto, os genes ADH também se expressam nos tecidos das plantas de maneira regulada, particularmente durante a maturação de frutas (Van der Straeten *et al.* 1991, Speirs *et al.* 1998, 2002, Echeverria *et al.* 2004). Em frutos de tomates, um gene de ADH, Le-ADH2, participa na formação dos aromas durante a maturação dos frutos. A super-expressão de Le-ADH2 incrementou o

nível de álcoois e a intensidade aromática de frutos de tomate, particularmente Z-3-hexenol (Speirs *et al.* 1998). Em uva, três genes são expressos durante o desenvolvimento dos frutos. *Vv-ADH1* and *Vv-ADH3* acumulam transcritos durante a fase de desenvolvimento das bagas, enquanto o *Vv-ADH2* tem maior incremento de transcritos durante a maturação (Tesnière & Verriès, 2000). Clones cDNAs codificantes de cadeias curtas de ADH tem sido relatadas em tomate (Picton *et al.* 1993) e em pêra (Fonseca *et al.* 2004). Em melão, o passo de conversão de aldeídos em álcoois é controlado pelo etileno e é fortemente inibido pelo antagonista ao etileno 1-MCP e pela transformação genética com ACC oxidase *antisense* (Flores *et al.* 2002). Manriquez *et al.*, (2006) isolaram duas ADHs fruto-específico, genes altamente divergentes, expressos especificamente na maturação de melão e regulados pelo etileno. Estes genes codificam proteínas que atuam preferencialmente como aldeído reductases. Essas proteínas possuem substrato e co-substratos preferenciais diferentes indicando que, provavelmente possuam funções específicas na geração de substratos para ação das álcool acil transferases (Yahyaoui *et al.*, 2002, El-Sharkawy *et al.*, 2005).

Ueda *et al.*, (1997), considera as AATs enzimas-chave na síntese de ésteres, constituindo-se nas prováveis causas das diferenças de produção de compostos voláteis entre os frutos. Segundo esses autores, as AATs têm a função de catalisar a esterificação de álcoois com um grupamento acil CoA, produzindo ésteres. Na figura 4, ilustra-se a via de biossíntese do 2-metilbutil acetato e etil 2-metilbutanoato, a partir de um aminoácido, a isoleucina, e destaca-se a etapa na qual as AATs atuam.

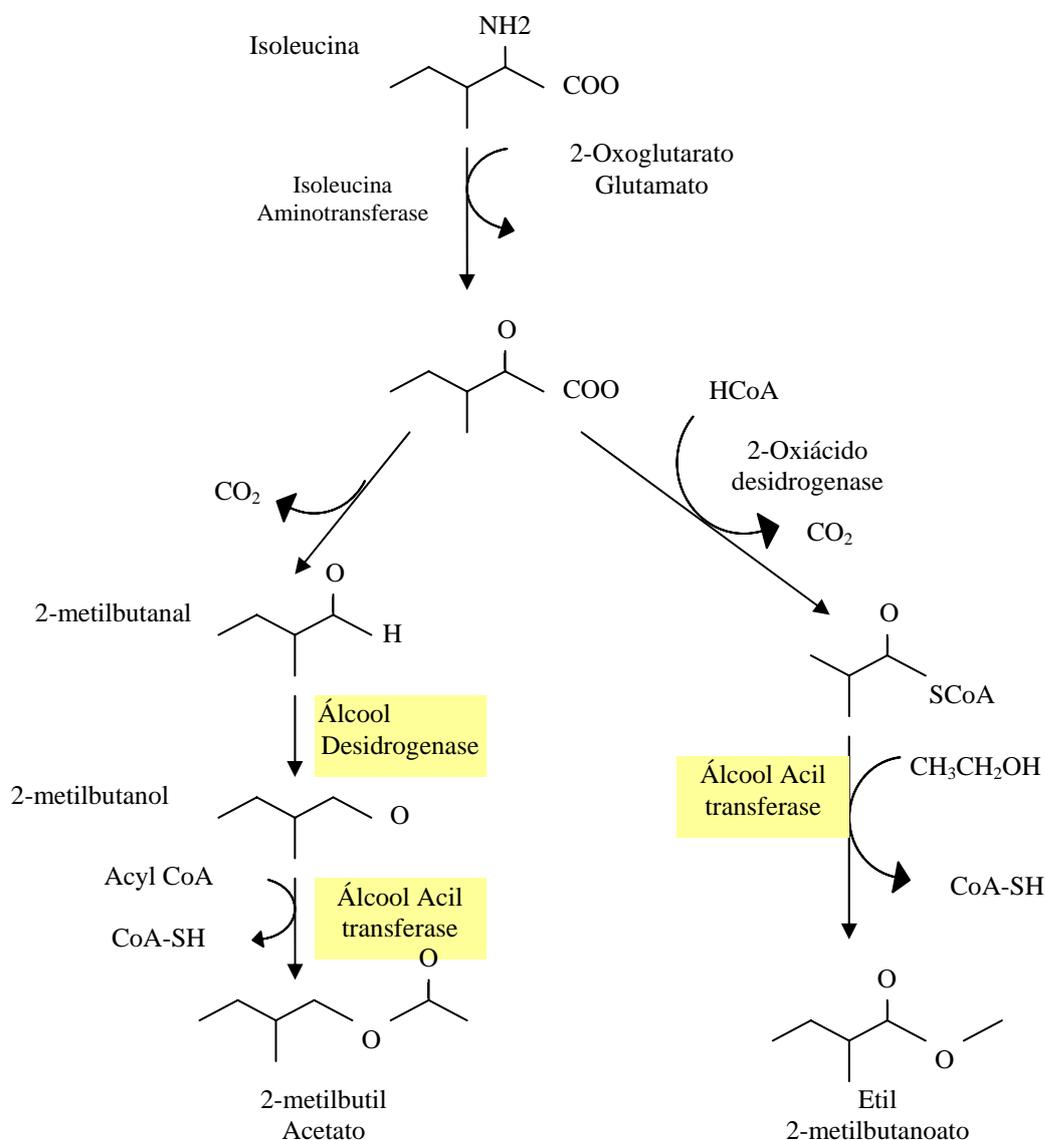


Figura 4 - Exemplo de biossíntese do éster 2-metilbutil acetato e etil 2-metilbutanoato. Fonte Bauchot *et al.*, (1998).

Fellman e Mattheis (1993) verificaram que há incremento da atividade AAT durante a maturação de maçãs. No entanto, quando os frutos foram armazenados em atmosfera com baixo teor de O₂, não observou-se a mesma atividade AAT observada em frutos armazenados em atmosfera normal (25⁰C). Segundo esses autores, a baixa produção de aroma em frutos estocados em atmosfera controlada (AC), pode ser atribuída à inibição da atividade AAT. Esses resultados são concordantes com os de Pérez *et al.* (1996), embora esses últimos autores tenham trabalhado com morangos. Em morango, um fruto não-climatérico, ocorre um incremento da atividade AAT durante a maturação,

sendo que o máximo dessa atividade, ocorre quando atingem a coloração vermelho escuro (Perez *et al.*, 1996).

A atividade AAT tem sido medida em inúmeros frutos, banana, (Harada *et al.*, 1985), maçã (Fellman *et al.*, 1991), morango (Perez *et al.*, 1993), melão (Ueda *et al.*, 1997), uva (Wang *et al.*, 2005). Em todos os trabalhos, as propriedades catalíticas das enzimas têm sido determinadas depois de purificada parcialmente.

Alguns clones de AATs já foram isolados e caracterizados (Hahyaoui *et al.*, 2002, Shalit *et al.*, 2001, Beekwilder *et al.*, 2004), mostrando propriedades de atividade enzimática diversas em relação aos substratos preferenciais. Li *et al.* (2006) observaram em maçãs 'Golden Delicious', que o clone MdAAT2 é expresso e a enzima respectiva possui atividade exclusivamente no fruto, diferentemente do MdAAT1 que se expressa e tem atividade em todos os tecidos da planta. Esses mesmos autores também localizaram a MdAAT2 ativa em extratos preparados a partir de casca dos frutos. O tratamento de maçãs com 1-MCP diminuiu fortemente a expressão de mRNAs de AAT e atividade AAT e, por consequência, resultou em menor produção de ésteres, indicando que o etileno tem papel importante na regulação da produção de aromas nesse fruto (Li *et al.*, 2006).

De melões 'Charentais', (grupo Cantaloupe) Yahyaoui *et al.*, (2002) isolaram e caracterizaram os clones AAT denominados Cm-AAT1 e Cm-AAT2, com homologia de 87% entre si. Esses clones demonstraram atividade fruto específico. Quando expressos em sistema heterólogo (levedura), revelou-se que o Cm-AAT1 possui atividade AAT, enquanto Cm-AAT2, não possui essa atividade. Foi demonstrado que a proteína correspondente ao Cm-AAT1 é capaz de produzir ésteres a partir de uma grande variedade de álcoois, tanto alifáticos, como ramificados e aromáticos, e de Acil CoAs, como Acetil CoA, Propionil CoA e Hexanoil CoA. Na seqüência dos estudos El-Sharkawy *et al.* (2005), isolaram e caracterizaram o Cm-AAT3 e o Cm-AAT4, que se expressam especificamente durante a maturação dos frutos. Esses clones demonstraram atividade AAT, sendo que a enzima Cm-AAT4 produz majoritariamente acetatos. Complementarmente, observou-se que esses clones são etileno-dependentes, indicando que os compostos voláteis, principais componentes do aroma em frutos climatéricos, têm sua síntese dependente das AATs etileno-dependentes, mas há possibilidades de AATs etileno-independentes (El-Sharkawy *et al.* 2005). Dentro de uma das regiões conservadas desses clones (Cm-AAT1 a Cm-AAT4), na posição do aminoácido 268, somente Cm-AAT2 possui Alanina (A) na seqüência, ao contrário dos outros que possuem Timina (T). Na para busca de explicar a não atividade de Cm-AAT2, El-Sharkawy *et al.* (2005)

substituíram A por T num sistema de mutação dirigida, o que resultou no Cm-AAT2 mutado com atividade AAT semelhante à Cm-AAT1. Com isso, os autores afirmam que esse aminoácido é fundamental para aquisição da atividade AAT.

Contudo, até o momento não testou-se a capacidade dessas AAT recombinantes de produzir ésteres sulfurados, apesar da grande importância desses compostos no aroma de melões e outros frutos. A única demonstração de capacidade das AATs sintetizarem ésteres sulfurados foi observada em estudos com extratos protéicos brutos de melões obtidos por Shalit *et al.*, (2001), que detectaram a produção de 3-(methylthio) propil acetato.

O CoA-SH, produto da esterificação, pode ter efeito sobre os parâmetros cinéticos da reação, dependendo da concentração e das propriedades cinéticas das enzimas. Estudos já foram realizados nos quais elimina-se esse efeito, fazendo uso de uma fosfotransacetilase, uma enzima capaz de reciclar o CoA-SH (Szutowiz & Bielarczyk, 1987).

3 ARTIGO “I”



Available online at www.sciencedirect.com



Postharvest Biology and Technology 32 (2004) 263–268

**Postharvest
Biology and
Technology**

www.elsevier.com/locate/postharvbio

Characterization of ripening behavior in transgenic melons expressing an antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene from apple

Jorge A. Silva^a, Tatiane S. da Costa^a, Luciano Lucchetta^a, Leonor J. Marini^a,
Márcio R. Zanuzo^a, Leonardo Nora^b, Fabiana R. Nora^b,
Richard M. Twyman^c, Cesar V. Rombaldi^{a,*}

UFPEl/FAEM, Depto. Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Campus Universitário, Caixa Postal 354 – CEP 90010900 Pelotas – RS. e-mail: cesarvrf@ufpel.tche.br

ABSTRACT

In order to discriminate between ethylene-regulated and ethylene-independent ripening pathways in climacteric fruits, we analyzed different features of the ripening process in wild type and AS3 transgenic melons, the latter showing profound inhibition of ethylene production. The transgenic melons took an average of 10 days longer than wild type melons to reach the harvesting stage, which resulted in the accumulation of larger amounts of soluble solids. The transgenic fruits also remained firmer and showed higher levels of chlorophyll and titratable acidity compared to wild type fruits. In contrast, the carotenoid content of the wild type and transgenic fruits was similar because carotenes accumulate before the climacteric stage.

Key words: fruit ripening, ethylene, pigments, gene regulation, melon

3.1 INTRODUCTION

The ripening of climacteric fruit is regulated by the hormone ethylene. In some species, such as melon, ethylene accumulates rapidly during the climacteric stage. The fruit, therefore, ripen quickly and have a limited shelf life, which restricts the potential for transport and commercial expansion (Pech *et al.*, 1994, Latché *et al.*, 1995, Silva, 2000). The genetic manipulation of ethylene production is one way in which climacteric fruit ripening can be controlled in order to increase storability (Brady, 1987, Kende, 1993, Latché *et al.*, 1995, Fluhr and Mattoo, 1996).

The inhibition of ripening has been achieved in transgenic tomato plants by reducing ethylene production (reviewed by Stearns and Glick, 2003). One approach involves the down-regulation of genes encoding key enzymes in the ethylene biosynthetic pathway. For example, antisense constructs have been expressed to reduce the activity of ACC synthase (Oeller *et al.*, 1991) and ACC oxidase (Hamilton *et al.*, 1990, Rombaldi *et al.*, 1996). An alternative approach is the diversion of metabolic flux away from ethylene synthesis by overexpressing enzymes involved in ACC degradation. This has been achieved using constructs encoding the enzymes ACC deaminase (Klee *et al.*, 1991, Klee, 1993) and *S*-adenosyl methionine (SAM) hydrolase (Good *et al.*, 1994). While such experiments were initially restricted to tomato as a model species, similar studies have now been performed in other fruit including melon. The first such experiment was reported by Ayub *et al.* (1996), who used an antisense construct to suppress ACC oxidase gene expression in Cantaloupe melons. In a similar approach, Peters *et al.* (1999) generated four transgenic melon lines expressing an antisense ACC oxidase gene from apple. Despite the antisense ACC oxidase gene being from apple, showing less than 100% identity to the orthologous gene in the melon plant, one of these lines (AS3) showed extreme inhibition of ethylene production.

In this article, we discuss the ripening characteristics of the AS3 line, which we investigated by analyzing the pigment content, color, firmness, titratable total acidity, soluble solids content and internal ethylene concentration of the fruit. Our analysis began at the early stages of fruit development and continued until the late stages of maturation. Our results confirm that the ripening process in melon includes both ethylene-dependent and ethylene-independent pathways, as observed by Guis *et al.* (1997). However, in contrast to the data obtained by Guis and colleagues, our results indicate that organic acid metabolism is ethylene-dependent.

We have demonstrated that the antisense 1-aminocyclopropane- 1-carboxylate (ACC) oxidase gene from apple can suppress ethylene production in melons. Therefore, it is likely that equivalent results can be now achieved in perennial species, such as apple, which can take up to 4 years to accomplish technological responses similar to those achieved in melon in a few months.

3.2 MATERIALS AND METHODS

3.2.1 Plant material and transformation

The AS3 transgenic melon line (*Cucumis melo*, L. var. *cantalupensis* Naudin cv. Védraçais) contains an antisense ACC oxidase gene from apple that is constitutively expressed under the control of the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter (Dupille *et al.*, 1993, Barry *et al.*, 1996). The line was generated by isolating a *Hind*III restriction fragment from clone pAP4, corresponding to the coding region of the gene and 40 bp of untranslated region (Dong *et al.*, 1992). This fragment was inserted in the reverse orientation between the CaMV 35S promoter and nopaline synthase (*nos*) polyadenylation site in plant transformation vector pGA643. Transformation was carried out using *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404 as previously described by Peters *et al.* (1999). T3 progeny of the AS3 line were cultivated in glasshouses under natural light at approximately 25°C. Untransformed wild-type plants (WT) were used as controls.

3.2.2 Fruit ripening and analysis

Flowers were self-pollinated manually and date tagged. Only four fruit were retained on each plant. At 20, 25, 30, 35 and 40 days after anthesis (DAA), we measured the quantity of chlorophyll and carotenoids in the fruit, as well as the firmness, soluble solids content, titratable acidity, color of the rind and internal ethylene concentration. The statistical analysis (Fisher's LSD test and Duncan's multiple range test) was performed using the software SANEST® (Zonta and Machado, 1991).

3.2.3 Color and pigments

The *b* parameter, corresponding to the chromaticity (which coordinates the yellow-blue axis in the $L^* \cdot a^* \cdot b^*$ color system) was measured with a Minolta CR-300 chromameter. The measurements were taken from the equatorial region of melon fruit. The levels of

chlorophyll in the rind, and the levels of carotenoids in the rind and flesh, were determined as described by Romojaro *et al.* (1979) and Hill *et al.* (1985).

3.2.4 Firmness

Flesh firmness in cut fruit was determined using an 8-mm Effegi tester and was recorded in Newtons (N).

3.2.5 Total soluble solids and acidity

The amount of total soluble solids in mesocarp tissue was determined by refractometric measurement of two samples collected from each fruit, and was expressed in °Brix (equivalent to percentage). Titratable acidity was measured by titration against 0.01M NaOH and recorded as meq. 100 g⁻¹ fw (milliequivalents per 100 g of fresh weight), according to the method of Alavoine *et al.* (1988).

3.2.6 Internal ethylene concentration

The internal ethylene concentration of individual fruit was monitored on the vine as described by Peters *et al.* (1999) using a method adapted from that of Saltveit (1993). The ethylene content was determined by gas chromatography.

3.3 RESULTS

3.3.1 Carotenoid and chlorophyll levels

Carotenoids accumulated slightly faster in the rind and flesh of wild-type melons compared to AS3 melons, but by 35 DAA there was no difference between the wild-type and transgenic fruit (Fig. 1a and b). In wild-type melons, the chlorophyll content in the rind decreased sharply throughout the ripening process whereas in AS3 melons the level of chlorophyll remained high (Fig. 1c).

3.3.2 Firmness, soluble solids content and titratable acidity

The wild-type melons softened rapidly during the ripening process and to avoid over-ripening and post harvest deterioration they were harvested 35 DAA. The AS3 melons remained firm until they were harvested 40 DAA (Fig. 1d). The soluble solids

content increased in both wild-type and AS3 melons until 35 DAA. After that, it decreased in wild-type melons, but remained constant in AS3 melons (Fig. 1e). The titratable acidity decreased sharply in wild-type fruit after 25 DAA. Conversely, in AS3 melons the titratable acidity remained high until harvest (Fig. 1f).

3.3.3 Color development in the rind and internal ethylene concentration

In wild-type melons, the *b* value for rind color increased sharply after 25 DAA, reaching 34 by 40 DAA. In contrast, the *b* value remained constant in AS3 melons and never exceeded 17 (Fig. 1g). The ethylene concentration in wild-type melons rose dramatically after 25 DAA, increasing from 0.14 to 3.76 $\mu\text{L.L}^{-1}$ at 30 DAA, and reaching 4.9 $\mu\text{L.L}^{-1}$ by the harvest stage (35 DAA). After harvest, the levels of ethylene decreased rapidly to 0.76 $\mu\text{L.L}^{-1}$. In AS3 melons, the ethylene concentration remained consistently low, never exceeding 0.09 $\mu\text{L.L}^{-1}$ (30 DAA) (Fig. 1h).

3.4 DISCUSSION

The carotenoid content of the rind and flesh increased in both wild-type and AS3 transgenic fruit. Carotenoid accumulation was faster in wild-type melons, but no difference in carotenoid content was observed between control and ethylene-inhibited fruit 35 DAA. The changes in carotenoid levels occurred well before the onset of the climacteric ripening process in wild-type melons indicating that carotenoid synthesis is ethylene-independent. This is in agreement with previous reports showing that pigments in fruit such as muskmelon, apple and banana accumulate well before the onset of ethylene production (Pech *et al.*, 1994, Latché *et al.*, 1995) and that the phytoene synthase gene, which encodes an enzyme involved in the early steps of carotenoid biosynthesis, is expressed at an early stage of fruit development (Karvouni *et al.*, 1995). In the case of tomato, however, there is some controversy. Some authors have shown that blocking ethylene synthesis through the expression of antisense ACC oxidase results in the severe inhibition of carotenoid biosynthesis (Murray *et al.*, 1993, Gray *et al.*, 1994), while no reduction was found in our experiments (Rombaldi *et al.*, 1996).

In wild-type melons, the ripening process involved a dramatic loss of chlorophyll in the rind. In contrast, the chlorophyll content remained high in transgenic fruit (Fig. 1c). The results are correlated with the color changes (Fig. 1g). Our data suggest that a minimum

amount of ethylene is necessary and sufficient to initiate chlorophyll loss, prior to the dramatic increase in ethylene content that accompanies climacteric ripening. In AS3 melons, it appears that the extremely low ethylene concentration is not sufficient to trigger chlorophyll loss (Fig. 1c and h). Our data are consistent with a previous report demonstrating that chlorophyll degradation is ethylene-regulated (Latché *et al.*, 1995). Furthermore, exposure to exogenous ethylene expedites the ripening process and increases the rate of chlorophyll degradation (Kende, 1993).

The flesh of wild-type melons softened rapidly during ripening, however, the flesh of the transgenic fruit remained firm (Fig. 1d). This indicates that the suppression of ethylene production inhibited fruit softening, suggesting that cell wall disassembly is controlled by ethylene. In transgenic tomato fruit producing low levels of ethylene, the rate of softening was similar to that of wild-type fruit during ripening but was retarded during the over-ripening phase (Klee, 1993, Murray *et al.*, 1993). Differences between melon and tomato could reflect the relatively high levels of residual ethylene (3–10 $\mu\text{L.L}^{-1}$) in transgenic tomatoes compared to the levels found in our melons (0.05–0.09 $\mu\text{L.L}^{-1}$). In wild-type melons, as in the case of chlorophyll loss, the firmness started to decrease while the ethylene level was still very low, between 20 and 25 DAA. This suggests that even a small amount of ethylene is sufficient to induce fruit softening. However, the results obtained with AS3 melons suggest these fruit contain such a low level of ethylene that the softening process is not initiated.

The soluble solids content is an important sensory attribute of melons. In this study, after the peduncular abscission zone of the wild-type plants gave way (~30–32 DAA) the soluble solids content started to decrease (Fig. 1e). In contrast, the transgenic fruit remained attached to the vine until more than 40 DAA and the soluble solids content continued to increase until harvest. Moreover, the AS3 plants remained green, sprouting and flowering for over 160 days after germination while the wild-type plants started to become senescent at approximately 135 days after germination (data not show). It was evident that a reduction in ethylene synthesis affected not only fruit formation but also the development cycle of the plant. In order to avoid over-ripening and post harvest deterioration, wild-type fruit are commercially harvested when they reach 11°Brix, 30 DAA (Fig 1e). Since the AS3 fruit can be harvested later than 35 DAA without the risk of over-ripening and fruit abscission, they can accumulate larger amounts of sugar (the major component of soluble solids in melon) and therefore gain weight.

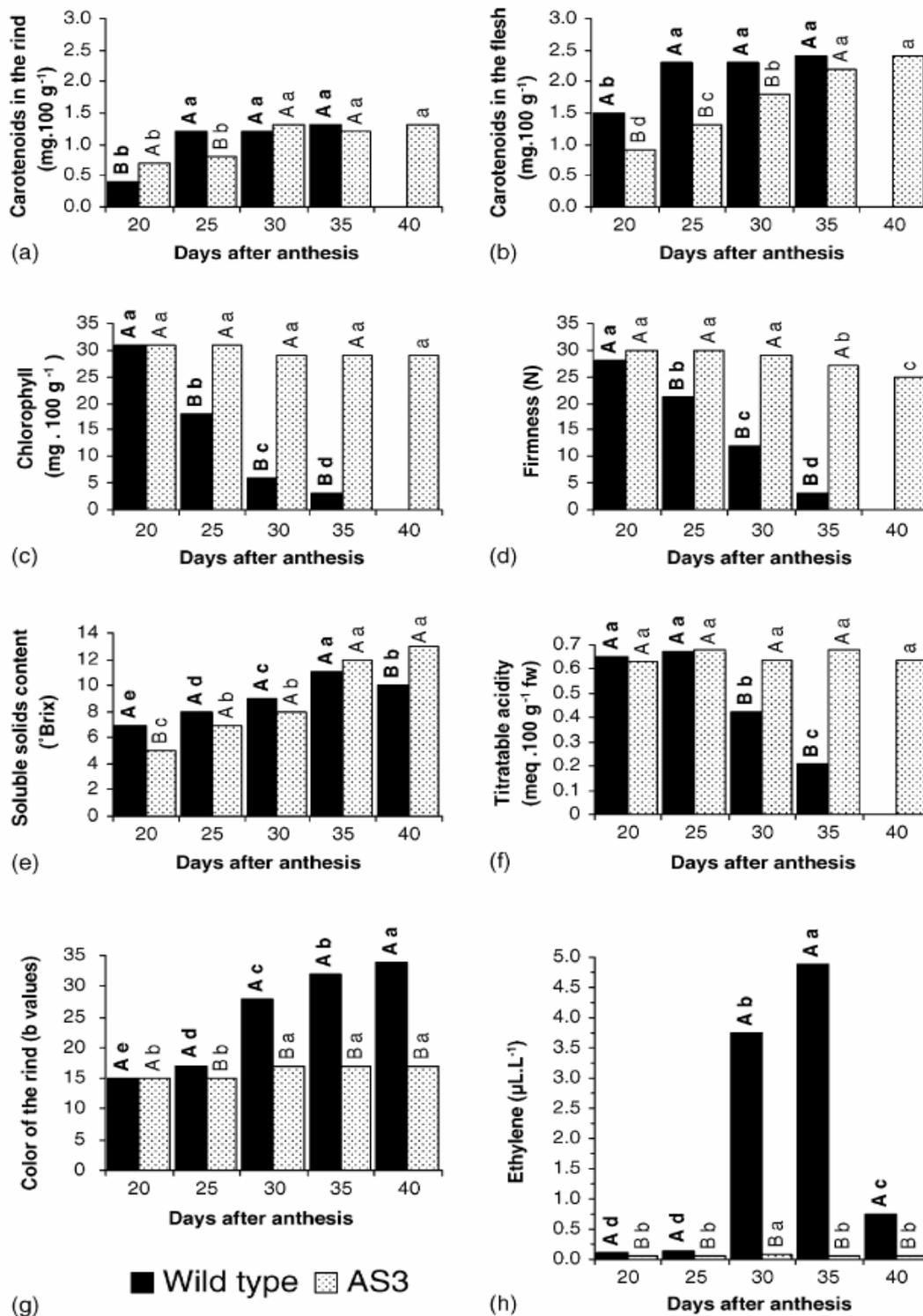


Figure 1. Characterization of ripening behaviour in wild-type and transgenic melons (*C. melo*, L. var. *cantalupensis* Naudin cv. Védrantais). The transgenic melons (AS3) express an antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene from apple. The results, means of three replicates, were compared using Duncan's test. Results for wild-type and AS3 melons, for the same number of days after anthesis (DAA), do not differ from each other ($P > 0.01$) if the upper case letter on the top of the columns is the same. Results for wild-type melons, on different DAA, do not differ from each other ($P > 0.01$) if the bold lower case letter on the top of the columns is the same. Results for AS3 melons, on different DAA, do not differ from each other ($P > 0.01$) if the lower case letter on the top of the columns is the same. Due to over ripening of the fruits, some results are not available for wild-type melons 40 DAA.

In wild-type fruit, we observed sharp decrease in titratable acidity after 25 DAA, but the titratable acidity remained high in AS3 fruit (Fig. 1f). The titratable acidity and ethylene concentration (Fig. 1h) show an inverse relationship. The sharp increase in ethylene concentration in wild-type melons after 25 DAA corresponds perfectly to the sharp decrease observed in the titratable acidity over the same period. In AS3 melons, where the ethylene concentration was always low ($\leq 0.09 \mu\text{L.L}^{-1}$), the titratable acidity remained consistently high. This suggests that organic acid metabolism in melon fruit is an ethylene-dependent process. Guis *et al.* (1997) similarly observed a sharp decrease in titratable acidity in wild-type melons, but they found the same trend in transgenic melons with a low ethylene concentration ($< 0.5 \mu\text{L.L}^{-1}$). This led them to conclude that organic acid accumulation and/or degradation are ethylene-independent processes. It is likely that the ethylene concentration in the transgenic melons studied by Guis and colleagues was not low enough to prevent the net reduction in organic acids.

Internal ethylene levels in the AS3 transgenic fruit remained very low during ripening ($\leq 0.09 \mu\text{L.L}^{-1}$). In contrast, ethylene levels in wild-type fruit showed a dramatic increase characteristic of the respiratory burst in climacteric ripening (Fig. 1h). Upon harvesting at 30–32 DAA, there was no further increase in the internal ethylene content of transgenic melons (data not shown).

We have presented a comprehensive comparative analysis of ripening behavior in wild-type melons and transgenic melons constitutively expressing an antisense ACC oxidase construct. This study provides data that can be used to discriminate between ethylene-regulated and ethylene-independent ripening pathways. The loss of chlorophyll in the rind, softening of the flesh, reduction of acidity and maturation of the peduncular abscission zone are inhibited in transgenic fruit, indicating that these processes are ethylene dependent. In contrast, the accumulation of carotenoids and soluble solids occurs as normal in the transgenic fruit indicating that these processes are not significantly influenced by ethylene.

3.4 REFERENCES

ALAVOINE, F., CROCHON, M., FADY, C., FALLOT, J., PECH, J.C., 1988. La qualité gustative des fruits. **Méthodes pratiques d'analyse**. CEMAGREF, vol. 362. ed. 92160 Antony, France, pp. 119–127 (ISSN 1163–9768).

- AYUB, R., GUI, M., BENAMOR, M., GILLOT, L., ROUSTAN, J.P., LANCHE, A., BOUZAYEN, M., PECH, J.C., 1996. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. **Nat. Biotechnol.** 14, 862–866.
- BARRY, C.S., BLUME, B., BOUZAYEN, M., COOPER, W., HAMILTON, A.J., GRIERSON, D., 1996. Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. **Plant J.** 9, 525–535.
- BRADY, C.J., 1987. Fruit ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 38, 155–178.
- DONG, J.G., OLSON, D., SILVERSTONE, A., YANG, S.F., 1992. Sequence of a cDNA coding for a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog from apple fruit. **Plant Physiol.** 98, 1530–1531.
- DUPILLE, E., ROMBALDI, C., LELIÈVRE, J.M., CLEYETMAREL, J.C., PECH, J.C., LANCHE, A., 1993. Purification, properties and partial amino-acid-sequence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase from apple fruits. **Planta** 190, 65–70.
- FLUHR, R., MATTOO, A.K., 1996. Ethylene: biosynthesis and perception. **Crit. Rev. Plant Sci.** 15, 479–523.
- GOOD, X., KELLOGG, J.A., WAGONER, W., LANGHOFF, D., MATSUMURA, W., BESTWICK, R.K., 1994. Reduced ethylene synthesis by transgenic tomatoes expressing S-adenosylmethionine hydrolase. **Plant Mol. Biol.** 26, 781–790.
- GRAY, J.E., PICTON, S., GIOVANNONI, J.J., GRIERSON, D., 1994. The use of transgenic and naturally-occurring mutants to understand and manipulate tomato fruit ripening. **Plant Cell Environ.** 17, 557–571.
- GUI, M., BOTONDI, R., BENAMOR, M., AYUB, R., BOUZAYEN, M., PECH, J.C., LANCHE, A., 1997. Ripening-associated biochemical traits of Cantaloupe Charentais melons expressing an antisense ACC oxidase transgene. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.** 122, 748–751.
- HAMILTON, A.J., LYCETT, G.W., GRIERSON, D., 1990. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. **Nature** 346, 284–287.
- HILL, C.M., PEARSON, S.A., SMITH, A.J., ROGERS, L.J., 1985. Inhibition of chlorophyll synthesis in *Hordeum vulgare* by 3-amino 2,3-dihydrobenzoic acid (gabaculin). **Biosci. Rep.** 5, 775–781.
- KARVOUNI, Z., JOHN, I., TAYLOR, J.E., WATSON, C.F., TURNER, A.J., GRIERSON, D., 1995. Isolation and characterization of a melon cDNA clone encoding phytoene synthase. **Plant Mol. Biol.** 27, 1153–1162.
- KENDE, H., 1993. Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 283–307.
- KLEE, H.J., 1993. Ripening physiology of fruit from transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants with reduced ethylene synthesis. **Plant Physiol.** 102, 911–916.
- KLEE, H.J., HAYFORD, M.B., KRETZMER, K.A., BARRY, G.F., KISHORE, G.M., 1991. Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. **Plant Cell.** 3, 1187–1193.
- LANCHE, A., AYUB, R.A., MARTINEZ, G., GUI, M., BEN AMOR, M., ROMBALDI, C.V., PECH, J.C., BOUZAYEN, M., 1995. Biosynthèse et mode d'action de l'hormone végétale éthylène. **Fruits** 50, 379–396 (ISSN 0248-1294).
- MURRAY, A.J., HOBSON, G.E., SCHUCH, W., BIRD, C.R., 1993. Reduced ethylene synthesis in EFE antisense tomatoes has differential effects on fruit ripening processes. **Postharvest Biol. Technol.** 2, 301–313.
- OELLER, P.W., WONG, L.M., TAYLOR, L.P., PIKE, D.A., THEOLOGIS, A., 1991. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. **Science** 254, 437–439.

- PECH, J.C., BALAGUÉ, C., LATCHÉ, A., BOUZAYEN, M., 1994. Postharvest physiology of climacteric fruits—recent developments in the biosynthesis and action of ethylene. **Sci. Aliments** 14, 3–15.
- PETERS, J.A., SCHUCH, M.W., SILVA, J.A., ROMBALDI, C.V., 1999. Transformação genética do meloeiro e da macieira. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 11, 10–13 (ISSN 1414-4522).
- ROMBALDI, C.V., CHAVES, A.L., SILVA, J.A., LEMOS, M.R.B., AYUB, R.A., BALAGUÉ, C., PECH, J.C., 1996. Expressão da enzima ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano oxidase em tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), cultivar Kadá. **Revista Brasileira de Agrociência**. 2, 5–10 (ISSN 0104-8996).
- ROMOJARO, F., BANET, E., LLORENTE, S., 1979. Carotenoids en flavedo y pulpa de pomelo. **Revista de Agroquímica Y Tecnología de Alimentos** 19, 385–392.
- SALTVEIT, M.E.J., 1993. Internal carbon dioxide and ethylene levels in ripening tomato fruit attached to or detached from the plant. **Physiol. Plant.** 89, 204–210.
- SILVA, J.A., 2000. **Caracterização bioquímico-molecular e inibição da síntese da ACC oxidase em frutos climatéricos**. Ph.D. Thesis. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil, 128 pp.
- STEARNS, J.C., GLICK, B.R., 2003. Transgenic plants with altered ethylene biosynthesis or perception. **Biotechnol. Adv.** 21, 193–210.
- ZONTA, E.P., Machado, A.A., 1991. **Manual do SANEST: Sistema de análise estatística para microcomputadores**. DMEC/IFM/UFPEL, Pelotas, RS, Brasil, 102 pp.

4 ARTIGO “II” (projecto)

ETILENO E CITOCININAS NA SÍNTESE DE ÉSTERES EM MELÕES ‘CANTALOUPE’, TRANSFORMADOS GENETICAMENTE COM UM CLONE DA ACC OXIDASE DE MAÇÃ EM ORIENTAÇÃO ANTISENSE

Lucchetta, L., Zanuzo, M. R., Pegoraro, C., Ferrareze, J., Dal Cero, J., Silva, J.A., Nora, L., Latche, A., Pech, J.C., Rombaldi, C.V.

UFPel/FAEM, Depto. Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Campus Universitário, Caixa Postal 354 – CEP 90010900 Pelotas – RS

RESUMO

Melões ‘Cantaloupe’ ‘Vedrantais’ transformados com um clone da ACC oxidase de maçã ‘Royal Gala’, em orientação antisense, apresentaram maior conservabilidade, mas houve significativa redução na produção de compostos voláteis em relação aos não transformados. Além disso, ocorreram alterações fenotípicas dessas plantas (AS3), com destaque para a menor senescência de folhas e maior emissão de brotações. Buscando confirmar a hipótese de que a síntese de compostos voláteis é evento etileno-dependente, aplicou-se etileno nos frutos AS3. Entretanto, a reversão do processo foi apenas parcial, ou seja, não houve total recuperação da produção de compostos voláteis, diferentemente de trabalhos precedentes com outros frutos. Buscando verificar se a baixa produção de compostos voláteis estava relacionada à não indução de uma das principais enzimas da via de biossíntese de compostos voláteis, a Álcool Acil Transferase (AAT), monitorou-se a expressão por RT-PCR e western blot. Foi demonstrado que há transcrição dos respectivos mRNAs (RT-PCR), e há a tradução da proteína (western blot), sugerindo que não é essa a causa da baixa produção de compostos voláteis. Como as plantas AS3 apresentaram alterações de fenótipo compatíveis com respostas à ação de citocininas, buscou-se monitorar a concentração desse fitormônio nos melões AS3 e não transformados. Foram detectadas concentrações entre 4 e 6 vezes maiores de zeatina e zeatina ribose na polpa e na casca de melões AS3 do que em melões não transformados.

Esse resultado sugere que a elevada redução da produção de etileno nos melões AS3 resultou em alterações no ciclo vegetativo da planta, favorecendo a síntese de citocininas, conhecidas como retardadoras da senescência e de respostas ao etileno.

Palavras-chave: frutos, maturação, ésteres, zeatina, zeatina ribose, álcool acil tranferase

ABSTRACT

ETHYLENE AND CYTOKININS IN THE ESTER SYNTHESIS IN 'CANTALOUPE' MELON TRANSFORMED WITH AN ANTISENSE ACC OXIDASE GENE FROM APPLE

Transgenic melon (*Cucumis melo* L. var. *cantalupensis* Naudin cv. Védraçais) containing an antisense ACC oxidase gene from 'Royal Gala' apple constitutively expressed under the control of the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter was superior than untransformed melon in terms of postharvest preservation. However, significant reduction in the production of volatile compounds occurred. Besides, the transgenic melon (AS3) plants were phenotypically different, noticeably by the delay in the senescence of the leaves and increased emission of shoots. In order to confirm the hypothesis that synthesis of volatile compounds is an ethylene-dependent event, ethylene was applied to AS3 fruit. However, we observed that the stagnation in the ripening process was only partially reversed, as the production of volatile compounds was not fully recovered. Aiming to confirm the hypothesis that low production of volatile compounds is related to noninduction of an essential enzyme in the biosynthesis of volatiles compounds, an alcohol acyltransferase (AAT), the expression of this enzyme was monitored by RT-PCR and western blot. However, as the transcription of mRNAs and translation of proteins from the AAT was confirmed, this hypothesis was ruled out. As the AS3 plants showed phenotype changes that resemble responses to cytokinins, the concentration of this phytohormone was monitored in both AS3 and untransformed melon. The concentration of zeatin and zeatin ribose in the skin and pulp of AS3 melon was 4 to 6 fold higher than in untransformed melon. This result suggest that reduction of ethylene production in AS3 melon induced changes in the vegetative cycle of the plant, favouring the synthesis of cytokinins, known as retardants of ethylene response and senescence.

Keywords: fruit, ripening, esters, zeatin, zeatin ribose, alcohol acyltransferase.

4.1 INTRODUÇÃO

Visando prolongar o período de conservação de melões ‘Cantaloupe’ Ayub *et al.* (1996) e Silva *et al.* (2004), realizaram transformações genéticas dessa espécie visando a redução da produção de etileno. Ayub *et al.* (1996) utilizaram um clone da ACC oxidase do próprio meloeiro (pMEL 1), previamente isolado e caracterizado por Balagué *et al.* (1993). Já, Silva *et al.* (2004) utilizaram o clone pAP4, isolado de maçã ‘Royal Gala’ em estágio climatérico de maturação.

Ao analisarem-se os frutos provenientes desses transformantes, verificou-se que, nos dois casos (Ayub *et al.*, 1996, Silva *et al.*, 2004) houve significativa redução da produção de etileno, maior preservação da firmeza de polpa e de clorofilas na casca, e prolongamento da vida de prateleira. Além disso, verificou-se que a síntese de compostos carotenóides não foi afetada pela transformação genética. Porém, Silva *et al.* (2004), verificaram que o ciclo de maturação dos frutos de plantas transgênicas prolongou-se, em média, em 10 dias, favorecendo o maior acúmulo de açúcares, em média, 2,5°Brix acima daquele detectado em melões não transformados. Além disso, observaram alterações fenotípicas significativas, como por exemplo, prolongamento do ciclo vegetativo, aumento da massa dos frutos, aumento de brotações laterais e menor senescência de folhas na base da planta. Esse comportamento não foi descrito nos estudos precedentes de Ayub *et al.* (1996) e Bauchot *et al.* (1998).

A intensidade aromática foi significativamente reduzida nos melões transgênicos obtidos por Ayub *et al.* (1996) e também estudados por Bauchot *et al.* (1998), bem como obtidos por Silva *et al.* (2004). Bauchot *et al.* (1998) trataram os melões transgênicos com etileno, tendo havido restauro da intensidade aromática pelo aumento da produção de compostos voláteis. Houve, também, indução do amarelecimento da casca, da formação de halo de abscisão e do amolecimento da polpa. Em estudos complementares, Flores *et al.* (2002) e Yahyaoui *et al.* (2002), verificaram que o restabelecimento da produção de compostos voláteis, em particular os ésteres, foi consequência da indução da síntese de álcool acil transferases (AAT), enzimas-chave na via de biossíntese desses compostos. Quatro clones de AAT (Cm-AAT1, Cm-AAT2, Cm-AAT3 e Cm-AAT4) foram isolados e parcialmente caracterizados em melões, sendo Cm-AAT1 e Cm-AAT4 mais fortemente expressas durante a maturação e sob a ação do etileno (Yahyaoui *et al.*, 2002, El-Sharkawy *et al.*, 2005).

Porém, em ensaios preliminares com melões transformados com o clone pAP4 antisense, denominados AS3, verificou-se que as respostas à aplicação de etileno foram distintas daquelas observadas por Bauchot *et al.* (1998), Flores *et al.* (2002) e Yahyaoui *et al.* (2002), ou seja, não houve o completo restabelecimento da maturação, com destaque para a não restauração da intensidade aromática, embora as condições de tratamento com etileno tenham sido similares às descritas por esses autores.

Baseando-se nas características morfológicas dos meloeiros transgênicos obtidos por Silva *et al.* (2004), nos quais observou-se em cultivos sucessivos que o ciclo vegetativo é mais prolongado e o volume radicular é mais expressivo, emitiu-se a hipótese de que, provavelmente, essas alterações pudessem estar associadas à síntese de citocininas. Essa hipótese é baseada em estudos que demonstram que condições de manejo pré-colheita que estimulem a síntese de citocininas (Hedden & Philips, 2000) ou a aplicação desse fitoregulador após a colheita reduzem a velocidade de senescência (Tian *et al.* 1995, Downs *et al.* 1997). Essa hipótese também é embasada nos trabalhos de Chen *et al.*, (2001) que transformaram brócolis com um clone da isopentil tranferase (*ipt*) e observaram que as inflorescências preservaram a coloração esverdeada por maior período de tempo do que os não transformados. Outras transformações com *ipt*, onde se aumentou a produção de citocininas, houve retardo da senescência foliar e aumento do acúmulo de açúcares, como é o caso da alface (MacCabe *et al.*, 2001), aumento da matéria seca no tabaco (Hedden & Philips, 2000) e aumento do número de frutos no caso do tomate (Martineau *et al.* 1995). A praticamente inexistência de relatos similares em frutos sugere a necessidade de estudarem-se as possíveis inter-relações entre as mudanças ocorridas com a redução significativa da produção de etileno (maior do que 99%), com a biosíntese de citocininas e o comportamento pós-colheita dos melões.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal

Neste trabalho foram usados melões Cantaloupe (*Cucumis melo* var. *Cantalupensis*, Naud cv.Vedrantais) não transformados (NT) e transformados com clone pAP4 ACC oxidase antisense (AS3) (Silva *et al.*, 2004). Os meloeiros foram cultivados em casa de vegetação de acordo com as normas de biossegurança estabelecidos pela CTNBio (Brasil) seguindo os padrões de cultivo desse fruto. As flores foram polinizadas a

mão e identificadas. Os frutos NT foram colhidos 32 dias após a polinização (DAP) e os frutos AS3, em função do retardo de maturação, 42 DAP, sendo imediatamente realizado o tratamento com etileno ($500 \mu\text{L.L}^{-1}$) por 24, 48 e 120 h em frascos de 7,2 L. As raízes foram coletadas imediatamente após a colheita do segundo fruto em cada planta. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas à -80°C .

4.2.2 Análise do etileno

Para determinar a produção de etileno, os melões foram pesados e acondicionados em frascos de 7,2 L à uma temperatura de $23\pm 3^\circ\text{C}$. Depois de 30 min, 1 mL do gás existente dentro do frasco, foi utilizado para análise em cromatógrafo gasoso (Varian® 3300). Os tratamentos eram realizados em três repetições e o resultado expresso em nL de etileno. $\text{g}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

4.2.3 RT-PCR da ACC oxidase e Cm-AAT

O RNA total foi extraído de 50 mg de polpa de melão congelada com tampão TRIZOL® Reagent (Invitrogen). O cDNA foi sintetizado a partir de 1 μg do RNA total (tratado com DNase) usando poli T como primer e o Kit SuperScript™ First-Strand System for RT-PCR (Invitrogen). A reação foi finalizada a 70°C por 10 min, e tratada com RNase H. Os primers Forward (F) e reverse (R) usados para o PCR foram os seguintes: para Cm-AAT1 (F 5'-GTGATGGTGTGAGTCACACTGTTC-3' e R 5'-CGACCAGCAAGGTCCAAAC-3', John, I. 1997), para β -Actin (F - 5'-GGAAACAATGCAAACCATCG-3' e R - 5'-CCCTAATGGTATGTGATC-3', Bouquin *et al.*, 1997) e para ACC oxidase (F -5'-AAGGATCCGCACAAACCAATCTTGAC-3' e R - 5'-AAGGATCCTAAGCTGAAAGTGAATTTAAATTA-3', Lassere *et al.*, 1996). As condições de PCR foram as seguintes: 35 ciclos a 95°C por 30 s (2 min para o primeiro ciclo), 47°C por 1 min para Cm-AAT e 53°C para β -Actin e ACC oxidase, e 72°C por 1min (5 min para o último ciclo).

4.2.4 Compostos voláteis

Todas as análises foram realizadas através de cromatógrafo gasoso HP5890 acoplado a um espectrômetro de massa Hewlett-Packard 5972 de acordo com o descrito por Bauchot *et al.*, (1998). Os compostos voláteis foram identificados por comparação de

cado espectro de massa de compostos autênticos e/ou com coleção de referência do aparelho (NIST/ EPA/NIH Mass Spectral database).

4.2.5 Western Blot

As proteínas totais foram extraídas de 4g de polpa de melão congelada e macerada com nitrogênio líquido. A esse homogeneizado adicionou-se 1 volume (4 mL) de tampão (250 mM de Tris-HCl, pH 7,5, contendo 1 mM DTT), e centrifugou-se a 40.000 g por 20 min. O sobrenadante foi recuperado e saturado com 80 % de sulfato de amônia (w/v) (NH₄)SO₄. O extrato saturado foi novamente centrifugado a 40.000 g por 20 min, o pellet foi recuperado (proteínas concentradas) com tampão fosfato de sódio (fosfato de sódio 50 mM pH 7.5, 10% v/v Glycerol, 300 mM NaCl e contendo 2 mM β-Mercaptoethanol), dessalinizado em coluna de Sephadex[®] G-25 (Pharmacia) e eluído com o mesmo tampão, fosfato de sódio.

As proteínas (20µg por amostra) foram separadas em SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com TTBS 1x (25 mM Tris-HCl, pH 7,0, 125 mM NaCl, e 0,1 % Tween-20) contendo 5 % de leite desnatado, lavou-se três vezes com TTBS 1x e incubou-se com um anticorpo policlonal (1:2.000), produzido em coelho, por 3 h a temperatura ambiente. Para a obtenção dos anticorpos policlonais, primeiramente desenhou-se a seqüência de um epitopo concenso (NPSLEGRDPVKVIK) comuns à Cm-AAT1 e Cm-AAT2. Foi sintetizado o peptídeo, em seguida cortado com KLH e injetado em um coelho, de onde obteve-se o soro com os anticorpos. Os anticorpos foram obtidos pelo “Laboratoire Génomique et Biotechnologie des Fruits” (Toulouse-France) e EUROGENTEC (Bélgica).

A membrana foi lavada com TTBS 1x por três vezes e incubada com um anticorpo secundário, anti-rabbit IgG-HRP conjugado (1:3.000). Finalmente a membrana foi lavada três vezes TTBS 1x e realizou-se a revelação e/ou detecção com ECL[®] system (Amersham).

4.2.6 Zeatina e Zeatina ribose em casca e polpa

A separação da Zeatina (Z) e Zeatina ribose (ZR) em HPLC, e a enzima imunoensaio de Z e ZR foram realizadas de acordo com Zieslin & Algom (2004). As amostras de casca e polpa de NT e AS3 foram maceradas em nitrogênio líquido, e as

citocininas foram extraídas em etanol 100% por 30 min. Posteriormente, foram adicionados 9 volumes de acetato de amônio 40 mM (pH 6,5), filtrado com filtro 0,22 µm Milipore® filter e purificado em coluna contendo polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). As citocininas eluídas foram separadas por HPLC em uma coluna ET 250/4 Nucleasil 150-5 C₁₈ com detector Varian® UV a 254 nm. As frações contendo citocininas foram submetidas a uma detecção imunológica, usando anticorpos monoclonais contra Z e ZR. Os anticorpos são reativos com as bases livres, 9-glucosídeo and 9-ribosídeo. A quantidade de citocininas foi expressa em ng de Z ou ZR.g⁻¹ de massa fresca (mF). Como controle técnico foi usado moléculas padrões de Z e ZR (Sigma®).

4.3 RESULTADOS

Ao estudar-se a expressão de mRNAs da ACC oxidase de melões, verificou-se fraca expressão em melões AS3 (figure 1A). A aplicação de etileno nos melões AS3 induziu a transcrição, observado nos níveis de expressão 24 h e 48 horas sob a ação do etileno (Figure 1A). A exposição por períodos mais prolongados (120 h) resultou em diminuição da quantidade de transcritos.

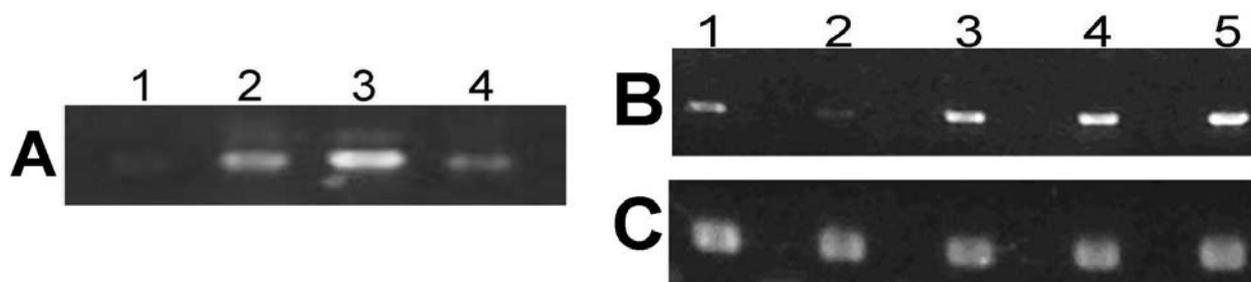


Figura 1 – Análise de RT-PCR de ACC oxidase (A), álcool acil transferase (B) e β -Actin (C). (A) Coluna 1 a 4 – melões AS3 tratados com etileno por 0 h, 24 h, 48 h e 120 h, respectivamente, (B and C) Coluna 1 – melões não transformados, coluna 2 a 5 – melões AS3 tratados com etileno por 0 h, 24 h, 48 h e 120 h, respectivamente.

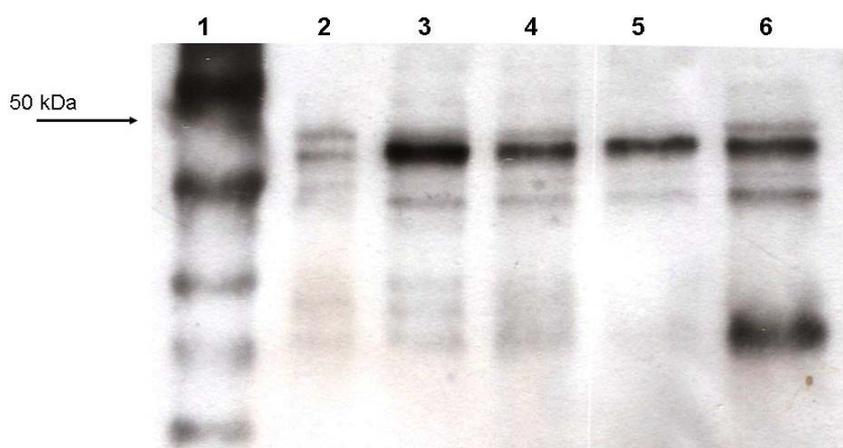


Figura 2 – Imunodeteccção de proteínas em polpas de melões NT and AS3. Coluna 1- Marcador de proteína, Coluna 2– proteínas de melão AS3, Coluna 3– proteínas de melão NT, Colunas- 4, 5 e 6 proteínas de melão AS3 tratados com etileno por 24h, 48h e 120h, respectivamente.

Tabela 1 – Produção de compostos voláteis e etileno em melões NT e AS3, tratados e não tratados com etileno.

Compostos (ng.g de fruto⁻¹)	NT	AS	AS + Etileno 24h	AS + Etileno 120h
Ethyl acetate	140	8	12	41
2-Methylpropyl acetate	49	2	4	30
1-Butyl acetate	78	8	9	25
2-Methyl-1-butyl acetate	180	8	16	25
1-Hexyl acetate	45	8	10	3
2-Phenylethyl acetate	40	2	5	9
Methyl propanoate	14	5	6	6
Ethyl propanoate	36	10	tr	tr
Methyl butanoate	2	2	4	5
Ethyl butanoate	87	10	4	12
2-methylethyl butanoate	19	8	tr	2
Produção de etileno (nL.h ⁻¹ .g ⁻¹)	60	0,5	32	10

Quando analisou-se a transcrição de mRNAs de Cm-AAT1, verificou-se que é fortemente expresso em melões NT e fracamente expresso em melões AS3 (Figura 1B). Esse comportamento é coerente com o fato desse clone ser induzido durante a maturação e sob a ação do etileno (Flores *et al.*, 2002) à semelhança do que ocorre com o clone pMEL da ACC oxidase (Lassere *et al.*, 1996). A aplicação de etileno nos melões AS3 induziu a transcrição do Cm-AAT1, obtendo-se elevados níveis de expressão de mRNAs desse clone, atingindo níveis similares aos dos melões NT 24 h sob a ação do etileno, mantendo esses níveis elevados até o final do ensaio (Figura 1B). Como controle técnico da reação utilizou-se a expressão constitutiva do gene da β -actina de melão (Figura 1C), permitindo validar os resultados da expressão diferencial da Cm-AAT1 entre melões não transformados e AS3, bem como frente à aplicação de etileno nos melões AS3.

Como o objetivo de monitorar a expressão de proteínas da AAT realizou-se western blot, a partir de melões AS3 tratados com etileno (Figura 2). Por essa técnica, verificou-se que melões AS3 apresentaram menor intensidade de bandas (Figura 2, coluna 2) do que nos melões não transformados (Figura 2, coluna 3). A aplicação de etileno, além de ter induzido a síntese de mRNAs (Figura 1B), resultou na tradução dessa proteína, obtendo-se bandas de intensidades semelhantes aos de frutos não transformados (Figura 2, colunas de 4 a 6). A massa molecular aparente de 50 kDa é coerente com o descrito por Duradeva *et al.* (1998), Aharoni *et al.* (2000), D'Auria *et al.* (2002), Shalit *et al.* (2003), Souleyre *et al.* (2005), que caracterizaram outras isoformas, citando que essas proteínas, em condições desnaturantes, têm, em média, 53 a 58kDa.

Por outro lado, a produção de compostos voláteis em melões AS3 não foi restaurada com a suplementação com etileno (Tabela 1). A aplicação desse hormônio induziu a transcrição do Cm-AAT1 (Figura 1A), a tradução de AAT (Figura 2), mas não houve a resposta esperada no que concerne à produção de compostos voláteis (Tabela 1), contrariamente aos resultados de Flores *et al.*, (2002).

Com o objetivo de verificar a possível interferência da redução da produção de etileno no acúmulo de citocininas e sua possível relação com as respostas à aplicação de etileno, determinou-se o teor de zeatina (Z) e zeatina ribose (ZR) na polpa e na casca dos frutos (Tabela 2). Dessa avaliação, ficou evidente que nos melões AS3, o teor das citocininas estudadas é significativamente superior ao detectado nos melões NT, em média 4 a 6 vezes maior. Além disso, o teor de citocininas é maior na casca do que na polpa, tanto para melões AS3 quanto para os NT.

Como o órgão responsável pela síntese de citocininas são as raízes, a determinação da massa radicular de plantas AS e NT, constitui-se numa boa variável que possa explicar as diferenças de concentrações de citocinina. Nessa avaliação, verificou-se que a massa de raízes das plantas AS3 em torno de 40% superior àquelas dos melões NT.

Tabela 2 – Teor de citocininas (Z e ZR) na casca e polpa, e massa radicular de melões AS3 não transformados (NT).

Meloeiros		Citocinias (mf)		Massa	
		Z (ng.g ⁻¹)	ZR (ng.g ⁻¹)	(g/planta, mf)	(g/planta, ms)
	Raízes	-	-	125	48
NT	Casca	5,02±1,25	6,23±1,58	nd	nd
	Polpa	2,52±1,07	5,25±2,01	nd	Nd
	Raízes	-	-	175	71
AS3	Casca	21,01±3,25	36,84±3,69	nd	nd
	Polpa	8,25±2,05	30,63±4,25	nd	nd

Nd. Não determinado.

4.4 DISCUSSÃO

A diminuição da produção de etileno em plantas transgênicas nas quais reduziu-se a expressão de genes da ACC oxidase (Hamilton *et al.*, 1990, Ayub *et al.*, 1996, Silva *et al.*, 2004) melhorou a conservabilidade dos frutos. Mas, o fato de ter-se alterado o metabolismo do etileno, alterações causadas pela ação do etileno, também foram modificadas. Por exemplo, na maioria desses trabalhos verificou-se menor degradação de clorofilas, não formação do halo de abscisão, retardamento da senescência de folhas, menor amolecimento da polpa e menor síntese de compostos voláteis (Ayub *et al.*, 1996, Bauchot *et al.*, Silva *et al.*, 2004). Porém, Flores *et al.* (2002) demonstraram que o tratamento dos frutos com etileno restabelece o amadurecimento. Entretanto, essa situação não foi confirmada nos melões AS3 obtidos por Silva *et al.* (2004). Neste trabalho, Silva *et al.* (2004), confirmou-se que a transformação genética do meloeiro com o clone pAP4 antisense praticamente suprimiu a transcrição do principal clone da ACC

oxidase expresso durante a maturação dessa espécie, denominado pMEL1 (Figura 1A). Como consequência obteve-se uma redução na produção de etileno superior a 99%, mas os frutos tornaram-se menos aromáticos. Para melhor compreender esse evento, quantificaram-se os principais compostos voláteis desse fruto, à semelhança do que já havia sido feito por Bauchot *et al.* (1998). Esses frutos, quando não transformados, são altamente produtores de ésteres. Com a redução da produção de etileno pela transformação genética houve significativa redução da síntese desses compostos, o que explica o comportamento de menor intensidade aromática previamente citada (Bauchot *et al.*, 1998, Yahyaoui *et al.*, 2002, Silva *et al.*, 2004).

Esperava-se que com a aplicação de etileno se restaurasse a produção de compostos voláteis, como ocorreu nos trabalhos de Flores *et al.* (2002) e de Bauchot *et al.* (1998). Essa resposta ocorreu apenas parcialmente, tendo-se recuperado em torno de 30% dos compostos voláteis, mesmo com a manutenção dos frutos durante 120h sob a ação do etileno (Tabela 2). Esse comportamento não é resultado de falhas no tratamento com etileno, já que empregaram-se, além das condições descritas por outros autores (Bauchot *et al.*, 1998, Yahyaoui *et al.*, 2002, Flores *et al.*, 2002) outras concentrações e tempos de exposição ao etileno, sem melhoria nas respostas (dados não apresentados).

Com o intuito de desvendar as possíveis causas desse comportamento, buscou-se verificar se a aplicação do etileno induziria ou não a expressão de enzimas-chave da via de biossíntese do próprio hormônio, a ACC oxidase, e de ésteres, a Cm-AAT1. Ao monitorarem-se a expressão mRNAs desses genes verificou-se que houve estímulo à transcrição (Figuras 1), resultados semelhantes à Yahyaoui *et al.* (2002). No caso da Cm-AAT1 realizou-se avaliação complementar, por western blot, pelo qual pôs-se em evidência a indução da tradução dessa proteína sob a ação do etileno (figura 2). Mesmo assim, não houve restauro da produção de compostos voláteis nos patamares dos melões não transformados (Tabela 1). Uma das hipóteses prováveis desse comportamento é de que possa ter havido controle do processo em fases pós-transcricionais, e/ou pela redução da velocidade de outras vias metabólicas responsáveis pela produção de substratos para essa enzima, ou seja, redução de disponibilidade de acil CoA, ácidos orgânicos, aldeídos ou álcoois, provindos da degradação de ácidos graxos e/ou aminoácidos (Song & Bangerth, 2003, Fellman *et al.*, 2000). Como, de modo geral, o metabolismo fica reduzido com a redução da produção de etileno, acredita-se que a degradação das reservas, gerando substratos para eventos fisiológicos do metabolismo secundário seja afetada (Baldwin *et al.*, 2000, Bauchot *et al.*, 1998). Além disso, ainda não

está esclarecido o efeito do etileno no processo de reciclagem de CoA-SH, produto resultante da reação de formação de ésteres pela ação de AATs. Essa hipótese não foi testada neste trabalho.

O fato das plantas AS3 apresentarem alterações fenotípicas marcantes como menor senescência de folhas, a maior brotação lateral e o maior ciclo de maturação dos frutos, pressupõe que se tenha alterado as interações entre hormônios, afetando a sensibilidade ao etileno. É conhecido, por exemplo, que em brócolis (Chen *et al.*, 2001) e tomateiro (Martineau *et al.* 1995) onde induziu-se o incremento da concentração de citocininas houve interferência significativa nas respostas ao etileno. Mais detalhadamente, foi observado que o manejo do aporte hídrico pode estimular a emissão de raízes e incrementar a síntese e translocação de citocininas, reduzindo as respostas ao etileno e reduzindo a senescência de folhas e flores (Chang *et al.*, 2003, Hedden & Philips, 2000, Martineau *et al.* 1995). Adicionalmente, foi verificado que a aplicação exógena de citocinina em brócolis reduziu as respostas ao etileno, contribuindo para a melhor preservação da coloração esverdeada (Tian *et al.* 1995, Downs *et al.* 1997). Embora o mecanismo fisiológico não tenha sido descrito, os autores relacionam o incremento da síntese e/ou do acúmulo de citocininas com o prolongamento da vida de prateleira. Em função desse conhecimento, e por ter-se observado que plantas AS3 apresentavam maior ciclo vegetativo e maior massa radicular (Tabela 2), buscou-se avaliar a concentração de citocininas na polpa e casca de melões NT e AS3. A hipótese foi confirmada, ou seja, há uma maior concentração de citocininas na casca e na polpa de frutos AS3. Em média, na casca de melões AS3 há, em média, 400% e 600% mais Z e ZR, respectivamente, do que na de melões NT. Na polpa, essa diferença é menor, passando para 320% e 580%, respectivamente, para Z e ZR. Esses resultados, embora não relacionem causa-efeitos, corroboram com os previamente obtidos por Martineau *et al.* (1995), sugerindo que a significativa redução da produção de etileno, além de ter prolongado a vida de prateleira dos melões, prolongou o ciclo vegetativo das plantas, estimulando uma maior emissão de raízes, e em consequência, maior síntese e acúmulo de citocininas, reduzindo as respostas à aplicação do etileno.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHARONI, A., KEIZER, L.C.P., BOUWMEESTER, H.J., SUN, Z., ALVAREZ-HUERTA, M., VERHOEVEN, H.A., BLASS, J., VAN HOUWELINGEN, A.M.M.L., DE VOS, R.C.H.,

- VAN DER VOET, H., JANSEN, R.C., GUIJ, M., MOL, J., DAVIS, R.W., SCHENA, M., VAN TUNEN, A.J. AND O'CONNELL, A.P. 2000. Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. **Plant Cell** 12: 647-661.
- AYUB, R., GUIJ, M., BEN-AMOR, M., GILLOT, L., ROUSTAN, J-P., LATCHÉ, A., BOUZAYEN, M., PECH, J-C. 1996. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. **Nat Biotech**, 14, 862–866.
- BALAGUÉ, C., WATSON, C.F., TURNER, A.J., ROUGE, P., PICTON, S., PECH, J-C., GRIERSON, D. 1993. Isolation of a ripening and wound-induced cDNA from *Cucumis melo* L. encoding a protein with homology to the ethylene-forming enzyme. **Eur J Biochem** 212: 27–34 bell pepper. **Plant Physiol.** 112, 615–622.
- BAUCHOT, A. D., MOTTRAM, D. S., DODSON, A. T., JOHN, P. 1998. Effect of aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase antisense gene on the formation of volatile ester in cantaloupe charentais melon (cv. Védrandais). **J. Agric. Food Chem.**, 46, 4787-4792.
- BUTTERY, R., LING, L. in *Bioactive Volatiles from Plants*, R. Teranishi, R. G. Buttery, H. Sugisawa, Eds. (**ACS Symposium Series 525, American Chemical Society, Washington, DC,**) 23, 1993.
- BALDWIN EA, SCOTT JW, SHEWMAKER CK, SCHUCH W. 2000. Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. **HortScience** 35, 1013–1022.
- CHANG, H., JONES, M.L., BANOWETZ, G.M., CLARK, D.G. Overproduction of cytokinins in petunia flowers transformed with PSAG12-IPT delays corolla senescence and decreases sensitivity to ethylene. **Plant Physiol.**, 132, 2174-2183, 2003.
- CHEN, L.F., HWANG, J.Y., CHARNG, Y.Y., SUN, C.W., YANG, S.F. 2001. Transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) with isopentenyltransferase gene via *Agrobacterium tumefaciens* for post-harvest yellowing retardation. **Molecular Breeding**, 7, 243-257.
- D'AURIA, J., CHEN F. AND PICHERSKY, E. 2002. Characterization of an acyltransferase capable of synthesizing benzylbenzoate and other volatile esters in flowers and damaged leaves of *Clarkia breweri*. **Plant Physiol.** 130: 466-476.
- DOWNS, C.G., SOMERFIELD, S.D., DAVEY, M.C. 1997. Cytokinin treatment delays senescence but not sucrose loss in harvested broccoli. **Postharvest Biol. and Technol.**, v.11, p.93-100.
- DUDAREVA, N., D'AURIA, J.C., NAM, K.H., RAGUSO, R.A., PICHERSKY, E. 1998. Acetyl-CoA: benzylalcohol acetyltransferase- an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. **Plant J.** 14: 297-304.
- EL-SHARKAWY, I., MANRÍQUEZ, D., FLORES, F., REGAD, F., BOUZAYEN, M., LATCHÉ, A. AND PECH, J.C. 2005. Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity. **Plant Mol. Biol.** 39: 345-362.
- FELLMAN JK, MILLER TW, MATTISON DS, MATTHEIS JP. 2000. Factors that influence biosynthesis of volatile flavor compounds in apple fruits. **HortScience** 35, 1026–1033.
- FELLMAN., J.K., MATTHEIS, J.P., MATTHINSON, D.S. AND BOSTICK, B.C. 1991. Assay of acetyl-CoA alcohol transferase in 'Delicious' apples. **HortScience**, 27, 773-776.
- FLORES, F., EL YAHYAOU, F., DE BILLERBECK, G., ROMOJARO, F., LATCHÉ, A., BOUZAYEN, M., PECH, J.C., AND AMBID, C. 2002. Role of ethylene in the

- biosynthetic pathway of aliphatic ester aroma volatiles in Charentais Cantaloupe melons. **J. Exp. Bot.** 53, 201-206.
- HAMILTON, A.J., BOUZAYEN, M., GRIERSON, D. 1991. Identification of a tomato gene for the ethylene forming enzyme by expression in yeast. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 88, 7434-7437.
- HEDDEN, P. & PHILIPS, A.L. 2000. Manipulation of hormone biosynthetic genes in transgenic plants. **Current Opinion in Biotechnology**, vol.11, p.130-137.
- KAKIMOTO, T. 2001. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. **Plant Cell Physiol.**, 42, 677-685.
- KONING, R. E. "Fruit Growth and Ripening". *Plant Physiology Website*. 1994. http://koning.ecsu.ctstateu.edu/plants_human/fruitgrowripe.html. Acessado em dezembro de 2004.
- LASSERE, E., BOUQUIN, T., HERNANDEZ, J.A., BULL, J., PECH, J-C., BALAGUÉ, C., 1996. Structure and expression of three genes encoding ACC oxidase homologs from melon (*Cucumis melo* L.) **Mol. Gen. Genet.** 251:81-90.
- MARTINEAU, B., SUMMERFELT., K.R., ADAMS, D.F., DEVERNA, J.W. 1995. Production of high solids tomatoes through molecular modification of levels of the plant growth regulator cytokinin. **Biotechnology**, 13, 250-254.
- MCCABE, M.S., GARRATT, L.C., SCHEPERS, F., JORDI, W.J.R.M., STOOPEN, G.M., DAVELAR, E., VAN RHIJN, J. H. A., POWER, J. B., DAVEY, M. R. 2001. Effects of PSAG12-IPT gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. **Plant Physiol.**, 127, 505-516.
- OELLER, P.W., WONG, L.M., TAYLOR, L.P., PIKE, D.A., Theologis, A., 1991. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. **Science**, 254, 437-439.
- SHALIT, M., GUTERMAN, I., VOLPIN, H., BAR, E., TAMARI, T., MENDA, N., ADAM, Z., ZAMIR, D., VAINSTEIN, A., WEISS, D., PICHERSKY, E., LEWINSOHN, E., 2003. Volatile ester formation in roses. Identification of an acetyl-coenzyme A geraniol/citronellol acetyl transferase in developing rose petals. **Plant Physiol.** 131, 1868-1876.
- SILVA, J.A., DA COSTA, T.S., LUCCHETTA, L., MARINI, L.J., ZANUZO, M.R., NORA, L., NORA, F.R., TWYMAN, R.M., ROMBALDI, C.V. 2004. Characterization of ripening behavior in transgenic melons expressing an antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene from apple. **Postharvest Biol. Technol.**, 32, 263-268.
- SONG, J. & BANGERTH, F. 1996. The effect of harvest date on aroma compound production from 'Golden Delicious' apple fruit and relationship to respiration and ethylene production. **Postharvest Biol. Technol.**, 8, 259-269.
- SOULEYRE, E.J.F., GREENWOOD D.R., FRIEL, E.N., KARUNAIRETNAM, S., AND NEWCOMB, R.D. 2005. An alcohol acyl transferase from apple (cv Royal Gala), MpAAT1, produces esters involved in apple fruit flavor. **FEBS Journal**, 272, 3132-3144.
- TAKEI, K., SAKAKIBARA, H., SUGYAMA, T. 2001. Identification of genes encoding adenylate isopentenyl-transferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Chemistry**, 276, 26405-26410.
- TIAN, M. S., DAVIES, L., DOWNS, C. G., LIU, X. F., LILL, R. E. 1995. Effects of floret maturity, cytokinin and ethylene on broccoli yellowing after harvest. **Postharvest Biol. Technol.**, 6, 29-40.
- WURR, D.C.E., HAMBIGDE, A.J., FELLOWS, J.R., LYNN, J.R., PINK, D.A.C. 2002. The influence of water stress during crop growth on the postharvest quality of broccoli. **Postharvest Biol. Technol.**, 25, 193-198.

YAHYAOUÏ, F. E. L., WONGS-AREE, C., LATCHÉ, A., HACKETT, R., GRIERSON, D., PECH, J-C. 2002. Molecular and biochemical characteristics of a gene encoding an alcohol acyl transferase involved in the generation of aroma volatile esters during melon ripening. **European Journal of Biochemistry/FEBS**, 269, 2359-2366.

5 ARTIGO “III”

JOURNAL OF
**AGRICULTURAL AND
FOOD CHEMISTRY**

Biochemical and Catalytic Properties of Three Recombinant Alcohol Acyltransferases of Melon. Sulfur-Containing Ester Formation, Regulatory Role of CoA-SH in Activity, and Sequence Elements Conferring Substrate Preference

LUCIANO LUCCHETTA,^{#,§,†} DANIEL MANRIQUEZ,^{#,†} ISLAM EL-SHARKAWY,[#]
FRANCISCO-BORJA FLORES,[#] PALOMA SANCHEZ-BEL,[#] MOHAMED ZOUINE,[#]
CHRISTIAN GINIES,[‡] MONDHER BOUZAYEN,[#] CESAR ROMBALDI,[§]
JEAN-CLAUDE PECH,^{*,#} AND ALAIN LATCHÉ[#]

INRA/INP-ENSAT, UMR990 “Génomique et Biotechnologie des fruits”, Avenue de l’Agrobiopole,
B.P. 32607, 31326 Castanet-Tolosan, France; UFPel/FAEM, Departamento Ciência e Tecnologia,
Campus Univeritario, Caixa Postal 354, CEP 90010-900 Pelotas, RS, Brazil; and INRA,
Université d’Avignon, UMRA408, “Qualité et Sécurité des Produits d’Origine Végétale”,
Domaine St-Paul, Site Agroparc, 84914 Avignon, France

ABSTRACT: Alcohol acyltransferases (AAT) play a key role in the biosynthesis of ester aroma volatiles in fruit. Three ripening-specific recombinant AATs of cantaloupe Charentais melon fruit (Cm-AAT1, Cm- AAT3, and Cm-AAT4) are capable of synthesizing thioether esters with Cm-AAT1 being by far the most active. All proteins, as well as AAT(s) extracted from melon fruit, are active as tetramers of around 200 kDa. Kinetic analysis demonstrated that CoA-SH, a product of the reaction, is an activator at low concentrations and an inhibitor at higher concentrations. This was confirmed by the addition of phosphotransacetylase at various concentrations, capable of modulating the level of CoA-SH in the reaction medium. Site-directed mutagenesis of some amino acids that were specific to the Cm- AAT sequences into amino acids that were consensus to other characterized AATs greatly affected the selectivity of the original protein and the number of esters produced.

KEY WORDS: *Cucumis melo*, alcohol acyltransferases, sulphur-containing esters, aroma volatiles, site-directed mutagenesis

5.1 INTRODUCTION

Fruit aroma is a complex mixture of a wide range of compounds among which volatile esters represent a major contribution to the odor of many fruits [apple and pear (1), banana (2), pineapple (3), and strawberry (4)]. In cantaloupes a large majority of compounds identified were alcohols, aldehydes, ketones, esters, and sulfur-containing compounds (5, 6). Sulfurcontaining esters often contribute to the typical aromatic note of melons. For instance, ethyl (methylthio)acetate, has been considered by Buttery et al. (7) to be responsible for a specific note of honeydew melons (*Cucumis melo* var. *inodorus*). Several authors have identified a number of sulfur compounds in the aroma profile of muskmelon (*C. melo* var. *reticulatus*) that include mainly sulfur esters (8-10). Some sulfur-containing esters such as ethyl (methylthio)acetate, ethyl 3-(methylthio)- propanoate, and 3-(methylthio)propyl acetate have high odor values and strongly contribute to the overall aroma perception of ripe fruit (11, 12), and ethyl 3-(methylthio)propanoate has a typical aroma note of melon (8).

Esters are synthesized from alcohols and acyl-CoAs through the action of alcohol acyltransferases (AATs) (13). AAT activity as been measured in a number of fruits [banana (14), apple (15), strawberry (16), melon (17), and grape (18)]. On some occasions, the catalytic properties of the enzyme(s) have been determined after partial purification (19). In recent years genes encoding AATs have been isolated and characterized from cultivated strawberry (20), wild strawberry and banana (21), melon (22), apple (23), and grapes (18). In melon at least three genes encoding AATs have been characterized that show fruitspecific and ethylene-dependent expression (24). Proteins encoded by the three genes show differential substrate preference and are, therefore, considered to be participating in different notes of the aroma of melon. However, so far, none of the recombinant proteins have been tested for their capacity to produce sulfur esters despite the strong importance of these compounds in the odor of melon and other fruits. The only demonstration of the capacity of AATs to synthesize sulfurcontaining esters arises from studies on protein extracts of intact fruit. Shalit et al. (25) showed production of 3-(methylthio)- propyl acetate by protein from crude extract of melon.

In this paper, we have produced recombinant proteins by expressing the three Cm-AAT genes in the yeast and have purified the proteins by affinity chromatography. This has allowed the study of the biochemical characteristics of the three recombinant proteins. Because no information was available on the proteins and genes participating in the biosynthesis of sulfurcontaining esters, we have first evaluated the capacity of the three Cm-AAT proteins to produce such compounds. Other biochemical characteristics of the proteins have been determined, particularly the molecular weight and kinetics properties. Large variations exist in the evaluation of the size of the protein going from 400 kDa in melon (17) to 70 kDa in partially purified AAT of strawberry (16) and to 53-58 kDa in various recombinant AATs (20, 23, 26-28). So far, the kinetic properties of fruit AATs, whether native or recombinant, have been studied without considering a feedback role of the CoASH liberated by the reaction. In this work, we demonstrate that CoA-SH can have stimulatory or inhibitory effect in vitro depending on the concentration, and this greatly influences the kinetic properties of the enzymes. Our previous data (24) had demonstrated the crucial role of a single amino acid, threonine, in enzyme activity. Here we extend our study to the search of the role of amino acids that are specific to each of the melon sequences as compared to other active plant AATs. Site-directed mutagenesis has been used to replace these amino acids by their consensus counterparts to evaluate the impact of these amino acids on the specificity and substrate preferences of the enzymes.

5.2 MATERIAL AND METHODS

5.2.1 Expression of Cm-AAT in Yeast and Purification of the Recombinant Proteins.

All *Cm-AAT* cDNAs were cloned in the pYES2.1 TOPO-TA cloning vector for regulated protein expression in yeast as described in El-Sharkawy *et al.* (24). Cells were collected by centrifugation (1800 *g*, 10 min at room temperature) from 50 mL of yeast cultures induced with galactose and resuspended in buffer A (50 mM sodium phosphate pH 7.5, 10% v/v glycerol, 0.3 M NaCl) containing 2 mM β -mercaptoethanol. The cells were mechanically ground in liquid nitrogen for 2 min and stored at -80°C until needed. To extract AAT enzyme, the powder was thawed and centrifuged at 45 000 *g* for 20 min at 4°C. The crude extract obtained was purified by an affinity column designed to purify

polyhistidine-tagged proteins (BD Talon Metal Affinity, BD Biosciences), according to the manufacturer protocol. Proteins were quantified according to Bradford (29).

5.2.2 AAT Enzyme Activity Assay

Cm-AAT activity of recombinant proteins or crude proteins extracts of melon fruit (Yahyaoui *et al.*, 2002) was assayed in 500 μL total volume containing 70 μL of purified protein (10-15 μg), 2 mM alcohol, 250 μM acyl-CoA and adjusted to final volume with buffer B (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, 10% v/v glycerol, 1 mM DTT). The mixture was incubated at 30°C for 20 min. Immediately after reaction 5 μL the internal standard (methyl benzoate 0.5 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$) were added into the mixture. Volatile compounds others than sulphur esters were extracted with 250 μL of pentane, vortexed for 1.5 min and the pentanolic phase was concentrated. The quantification of these compounds was done by gas chromatography (GC), 1 μL of concentrated pentanolic phase was injected into the GC equipment with a flame ionisation detector (GC-FID). The GC-FID equipment was made up of a Hewlett-Packard gas chromatograph (model 5890) equipped with a HP-Innowax cross-linked polyethylene glycol column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm). Injector and detector temperatures were 250°C. The oven temperature was programmed from 40°C (1 min) to 60°C (1 min) at a rate of 2°C min^{-1} and finally to 190°C (5 min) at a rate of 10°C min^{-1} . Nitrogen was used as a carrier gas at 100 kPa. Compounds were identified by comparison of retention times with those of authentic standards. Sulphur-containing esters were analysed with a QP2010 GC/MS (Shimadzu Co, Ltd., Kyoto, Japan) equipped with a 30 m x 0.25 mm x 0.5 μm fused silica CP-SIL 8 CB LB/MS capillary column (Varian). One μL of extract was injected in split less mode (purge open after 30 s.) at 240°C. The He Carrier constant velocity was 35 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$. The oven temperature was held at 40 °C for 2 min and then ramped to 230 °C at 6 °C/min. The mass spectra were recorded at the rate of 2 scans/s over the mass range from 29 to 300 (m/z). Compounds were identified by comparison of their mass spectra with mass spectra library (NIST) and quantification was performed by reference to authentic standards. Proteins were quantified according to Bradford (1976).

5.2.3 Determination of Molecular Weight.

Molecular weights were determined using a fast protein liquid chromatograph (FPLC) by gel filtration on a Sephacryl S-200 HR (Amersham Bioscience) column. The

column was pre-equilibrated and developed with Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, 10% (v/v) glycerol and 1mM DTT at a flow rate of 1mL min⁻¹.

5.2.4 Kinetic Analysis and Effects of CoA-SH.

For the determination of K_m and V_{max} for acetyl-CoA (the preferred acyl-CoA for all proteins), reactions were carried out at pH 7.5 and 30°C with acetyl-CoA concentrations varying from 0 to 6 mM (Cm-AAT1), 0 to 12 mM (Cm-AAT3) and 0 to 2 mM (Cm-AAT4). The alcohol co-substrate was maintained at constant saturating concentration (4 mM). The determination of K_m and V_m for alcohols was carried out in the same conditions in the presence of the preferred compounds (E-2-hexenol for Cm-AAT1, benzyl alcohol for Cm-AAT3 and cinnamoyl alcohol for Cm-AAT4). Concentration of alcohols varied from 0 to 6 mM while acetyl-CoA was maintained at saturation concentrations (4 mM for Cm-AAT1, 8 mM for Cm-AAT3 and 2 mM for Cm-AAT4). The effect on enzyme activity of 0 to 5 mM of CoA-SH was studied in the same conditions of assay as described above. Kinetic studies in the presence of either low (1, 5, or 50 μ M) or high (1 or 2.5 mM) concentrations were performed as described in the previous paragraph. In order to lower the concentration of the product of the reaction, CoA-SH, 4 units of phosphotransacetylase (EC 2.3.1.8., Sigma) and 4 mM of acetylphosphate were added to the reaction medium. The K_m and V_m values were calculated using the Lineweaver-Burk graphic method.

5.2.5 Site-directed mutagenesis.

Protein sequences of a number of AAT for which enzymatic activity has been tested after expression in *E. coli* or yeast have been aligned using the ClustalX program (30). Site-directed-mutagenesis has been performed using the QuickChange (Stratagene, San Diego, CA, USA) PCR-based method with Cm-AAT genes cloned in the pYES2.1 TOPO-TA cloning vector. The mutated clones were then transferred into *Saccharomyces cerevisiae* as described in El-Sharkawy *et al.* (24).

Data Analysis. Each experiment was performed at least in triplicate. Results are expressed as the mean value (standard error (SE)).

5.3 RESULTS

Differential capacity of the three recombinant AATs to produce sulphur-containing-esters. Figure 1 shows that all proteins were capable of synthesizing the two thioether esters, 3-(methylthio)-1-propyl and 2-(methylthio)-ethyl acetate with an activity ranging from about 10 to 60 pKat.mg prot.⁻¹. Cm-AAT1 was about twice more active than Cm-AAT3 and 3 to 6 times more active than Cm-AAT4.

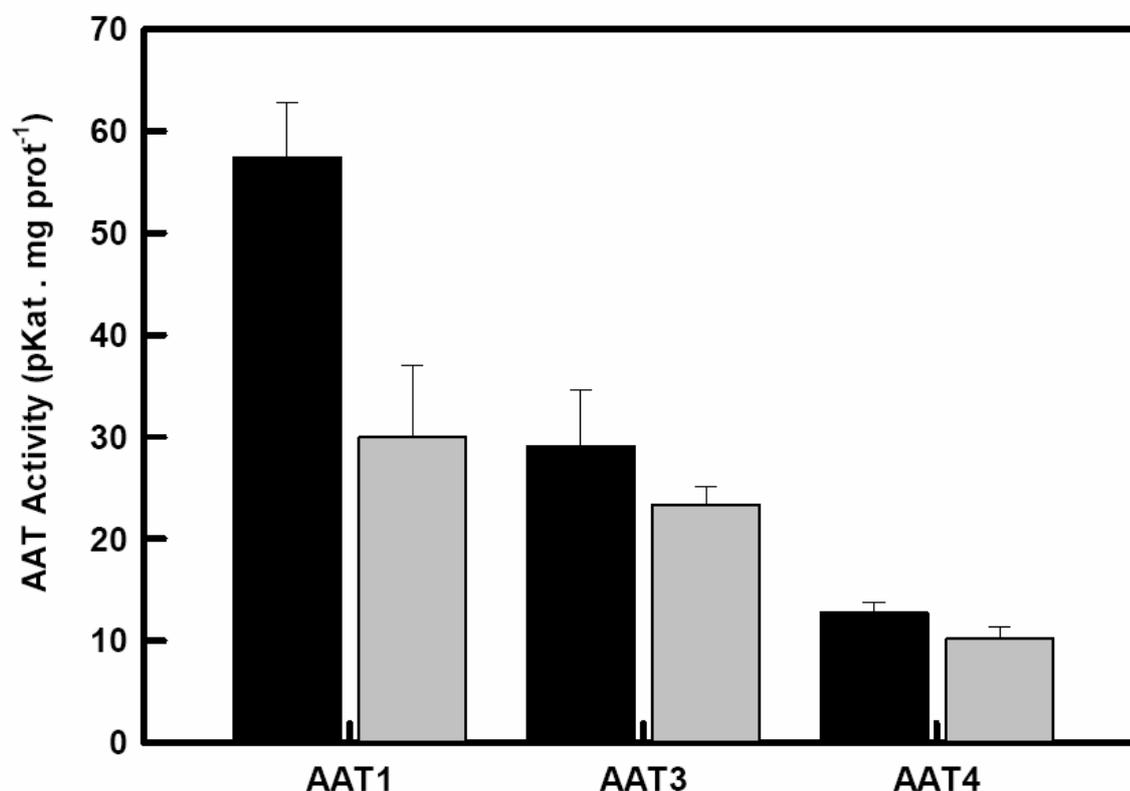


Figure 1 - Activity of thioether esters formation of the three recombinant AATs of melon. Activity for 3-(methylthio)-1-propyl acetate is represented in dark and for 2-(methylthio)-ethyl acetate in grey. Values represent the mean \pm SE of three replicates.

Table 1. Effect of Adding Variable Units of Phosphotransacetylase (0, 0.5, 1.0, and 2.0 Units) in the Reaction Medium on the Activity of the Cm-AAT1 Mutated Recombinant Protein (MT1 VA65) for Butanoyl-CoA (2 mM) and Ethanol (4 mM)

units of phosphotransacetylase	activity ^a [pkat (mg of protein ⁻¹)]
0	2156 ± 45
0.5	3012 ± 237
1.0	4474 ± 180
2.0	traces

^a Values represent the mean of three replicates ± SE.

Molecular Mass. The molecular mass, estimated by molecular sieve chromatography on the basis of enzymatic activity, was around 200 kDa for all three purified recombinant Cm- AATs. The apparent molecular mass of the native AAT in crude extracts of melon fruit was estimated at 196 kDa (data not shown). Under denaturing conditions (SDS-PAGE), the molecular mass of the three recombinant proteins was estimated at 51 kDa (data not shown), therefore indicating that the native proteins are tetramers.

Effect of CoA-SH on Activity. Preliminary experiments aimed at determining the optimum concentration of substrates showed an inhibition of AAT activity at high levels of acyl- CoA. Because the product of the reaction is often involved in this type of process, the effects of various concentrations of CoA-SH were assessed. Results in **Figure 2** indicate that CoASH stimulated the activity of the Cm-AAT4 protein up to 50 µM concentration. The optimum concentration was 2.5 µM where activity was increased by 400% as compared to the control. Above 50 µM, CoA-SH significantly reduced AAT activity by 20% at 500 µM and by 80% at 5000 µM. Kinetic studies, with acetyl-CoA as a substrate, were performed in the presence of low and high concentrations of CoA-SH. For Cm- AAT4 taken as an example, 1 or 5 µM concentration of CoASH stimulated activity through an increase of the V_{max} of the reaction clearly visible on direct kinetics graph (**Figure 3A**) without affecting the K_m as shown in the double-reciprocal plot (**Figure 3B**). At 1 and 2.5 mM concentrations of CoA-SH, the V_{max} of the reaction was unaffected (**Figure 3C**) but the K_m was increased, characteristic of a competitive inhibition with a K_i estimated at 0.96 mM (**Figure 3D**).

Effect of Removal of CoA-SH Using Phosphotransacetylase. During the enzymatic reaction, CoA-SH is released and possibly accumulates at inhibitory concentrations that may affect AAT activity. To modulate the level of CoA-SH in the reaction medium, a phosphotransacetylase was used, which is capable of performing the following reaction: CoA-SH + phosphoacetate acetyl-CoA + Pi. The addition of phosphotransacetylase at variable concentration affects AAT activity (**Table 1**). At high concentrations of phosphotransacetylase (2.0 units), activity was abolished, consistent with the role of CoA-SH as an activator but further demonstrating that CoA-SH is absolutely required for activity. At lower concentrations (0.5 and 1.0 unit), AAT activity was stimulated, thus confirming the inhibitory role of CoA-SH at high concentrations.

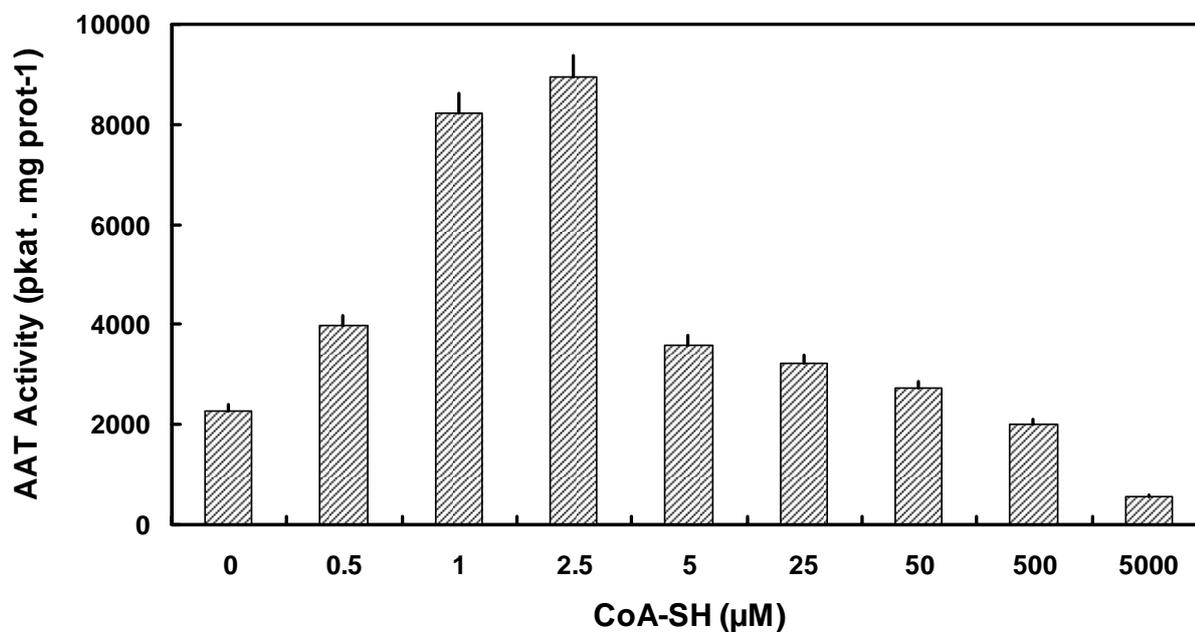


Figure 2 - Effect of free CoA-SH on activity of Cm-AAT4. Values represent the mean \pm SE of three replicates.

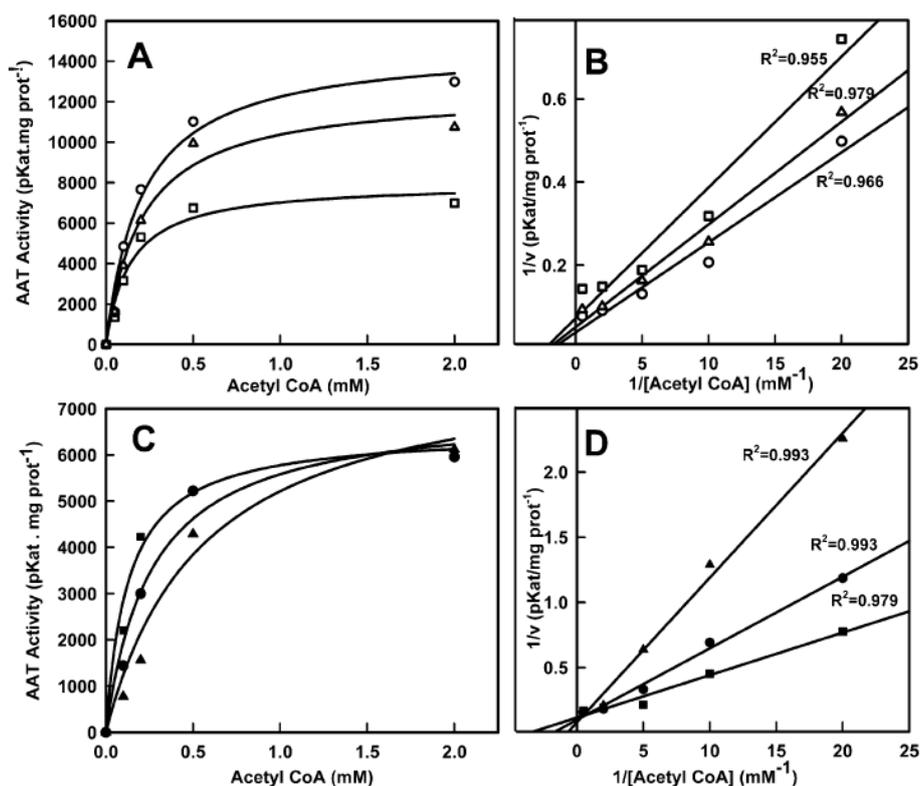


Figure 3. Kinetic analysis of CoA-SH inhibition and stimulation of Cm-AAT4 activity. The data are represented in direct kinetics (A, C) and double-reciprocal form (B, D). Panels A and B represent noncompetitive activation by several concentrations of CoA-SH (squares, 0 μM ; circles, 1.0 μM ; triangles, 5.0 μM) toward acetyl-CoA. [Values of kinetic parameters are, respectively, $K_m = 150, 200,$ and $170 \mu\text{M}$; $V_{\text{max}} = 7990, 12500,$ and $11400 \text{ pKat} (\text{mg of protein})^{-1}$]. Panels C and D represent competitive inhibition by several concentrations of CoA-SH (squares, 0 mM; circles, 1.0 mM; triangles, 2.5 mM) toward acetyl-CoA. [Values of kinetic parameters are, respectively, $K_m = 150, 280,$ and $560 \mu\text{M}$; $V_{\text{max}} = 7990, 7500,$ and $8100 \text{ pKat} (\text{mg of protein})^{-1}$]. $1/v$ is plotted versus $1/[\text{acetyl-CoA}]$ at fixed concentration (2 mM) of cinnamyl alcohol. Each value is the mean of three measurements.

Effect of Site-Directed Mutagenesis on Activity. Previous experiments had shown that a cDNA clone, Cm-AAT2, with strong homology to Cm-AAT1 was unable to form volatile esters unless the 268-alanine was replaced by threonine, which is present in all active AATs (24). Conversely, replacing the 268-threonine by alanine in Cm-AAT1 resulted in almost complete abolition of ester volatile formation. By further comparing the amino acid sequence in silico of eight active AATs with the melon sequences, it appeared that some amino acids were unique to the melon AATs (**Figure 4**). By comparing the Cm-AAT1 sequence with other AATs, it was found that the Cm-AAT1 sequence has an aromatic amino acid, phenylalanine at the 49 position (F49), whereas all other AATs have an aliphatic amino acid in the corresponding position (**Figure 4A**). The replacement of F49 by leucine (L) in the Cm-AAT1 sequence resulted in several changes in AAT activity (**Figure 5A**). The most remarkable one is a change in stereoisomer preference for the hexenol substrate with a strong increase in the capacity of forming *Z*-2-hexenyl acetate (no. 6 in **Figure 5**) and concomitant reduction of the formation of *E*-2-hexenyl acetate (7). There was also a decrease in the formation of hexyl hexanoate (29) and a strong decrease

or abolition of the synthesis of butyl, hexyl, heptyl, *Z*-3-hexenyl, and 2-phenylethyl acetates and 2-phenylethyl hexanoate (**2-4**, **8**, **15**, and **30**). Overall, the mutation has reduced the range of esters being produced. Most of the AAT sequences, including Cm-AAT1, contain a valine (V), leucine (L), or isoleucine (I) residue at the 65 position (**Figure 4B**), except Ban-AAT and Cm-AAT3 that harbor an alanine (A). This position is located just upstream of a consensus sequence. Replacing V65 by A in Cm-AAT1 (**Figure 4B**) reduced the synthesis of many esters (**Figure 5B**) except ethyl butyrate (**22**), which was strongly increased. Therefore, the mutated Cm-AAT1 gained specificity by showing very high preference for the formation of ethyl butyrate, and at the same time the synthesis of many other esters produced by the native Cm-AAT1 protein was reduced (**Figure 5B**). Conversely, the mutation of A61 into V in Cm-AAT3 (**Figure 4B**) greatly extended the range of esters synthesized (**Figure 5C**). The mutated protein produced much less of benzyl acetate (**14**) but instead synthesized hexyl hexanoate (**29**) at a very high rate, and many esters that were either not produced or produced at a low rate are now synthesized at significant rates. Among these are hexyl acetate (**3**), heptyl acetate (**4**), *Z*-2-hexenyl acetate (**7**), *E*-2-hexenyl acetate (**8**), hexyl propanoate (**20**), and 2-phenylethyl propanoate (**21**). The Cm-AAT4 sequence compared to other AATs has an amino acid that is unique to the sequence: Q135 (**Figure 4C**). When Q135 was replaced by L in Cm-AAT4 so as to resemble all other AATs, there was a strong change of substrate preference (**Figure 5D**). Whereas the native Cm-AAT4 had strong preference for forming cin-namoyl acetate (**16**), the mutated form synthesized preferentially *Z*-2-hexenyl acetate (**6**), geranyl acetate (**13**), benzyl acetate (**14**), and butyl hexanoate (**27**). On the other hand, Cm-AAT4, contrary to Cm-AAT1 and Cm-AAT3, but similarly to SAAT, VAAT, and Rh-AAT1, has a L residue at the 339 position instead of A. Mutation of L339 into A in Cm-AAT4 (**Figure 4D**) gave stronger activity for most of the short-chain acetates (**4-8**), with *E*-2-hexenyl acetate (**7**) being now the ester produced at the highest rate (**Figure 5E**). Another mutation, consisting in the replacement of I59 of Cm-AAT4 by V (**Figure 4B**), did not result in any significant changes in substrate preference (not shown).

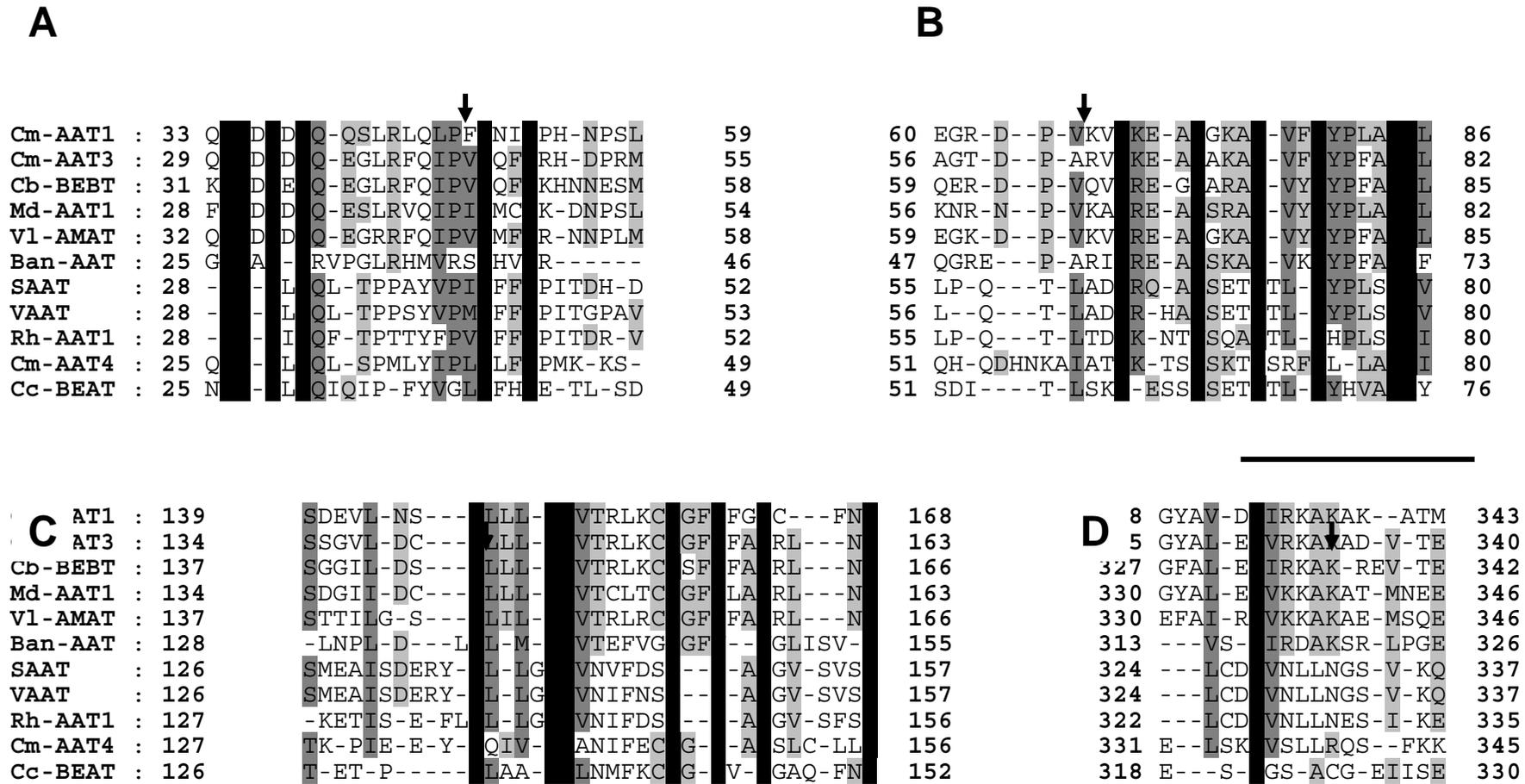


Figure 4. Partial amino acid sequence alignment of the *Cucumis melo* enzymes, Cm-AAT1 (CAA94432), Cm-AAT3 (AAW51125), and Cm-AAT4 (AAW51126) with closely related sequences *Clarkia breweri* Cb-BEBT (AAN09796), *Malus domestica* Md-AAT1 (AAU14879), *Vitis labrusca* Vl-AMAT (AY705388), *Musa sapientum* Ban-AAT (CAC09063), *Fragaria × ananassa* SAAT (AAG13130), *Fragaria vesca* VAAT (CAC09062), *Rosa hybrida* Rh-AAT (AAW31948), and *Clarkia breweri* Cb-BEAT (AAF04787) using the ClustalX program. Conserved residues are shaded in black. Dark gray shading indicates similar residues in 8 of 10 of the sequences, and clear gray shading indicates similar residues in 9 of 11 of the sequences. The arrows represent the residues that have been replaced by site-directed mutagenesis: (A) F49 replaced by L in Cm-AAT1 (MT1 FL49); (B) V65 replaced by A in Cm-AAT1 (MT1 VA65); A61 replaced by V in Cm-AAT3 (MT3 AV61) and I59 replaced by V in Cm-AAT4 (MT4 IV59); (C) Q135 replaced by L in Cm-AAT4 (MT4 QL135); (D) L339 replaced by A in Cm-AAT4 (MT4 LA339).

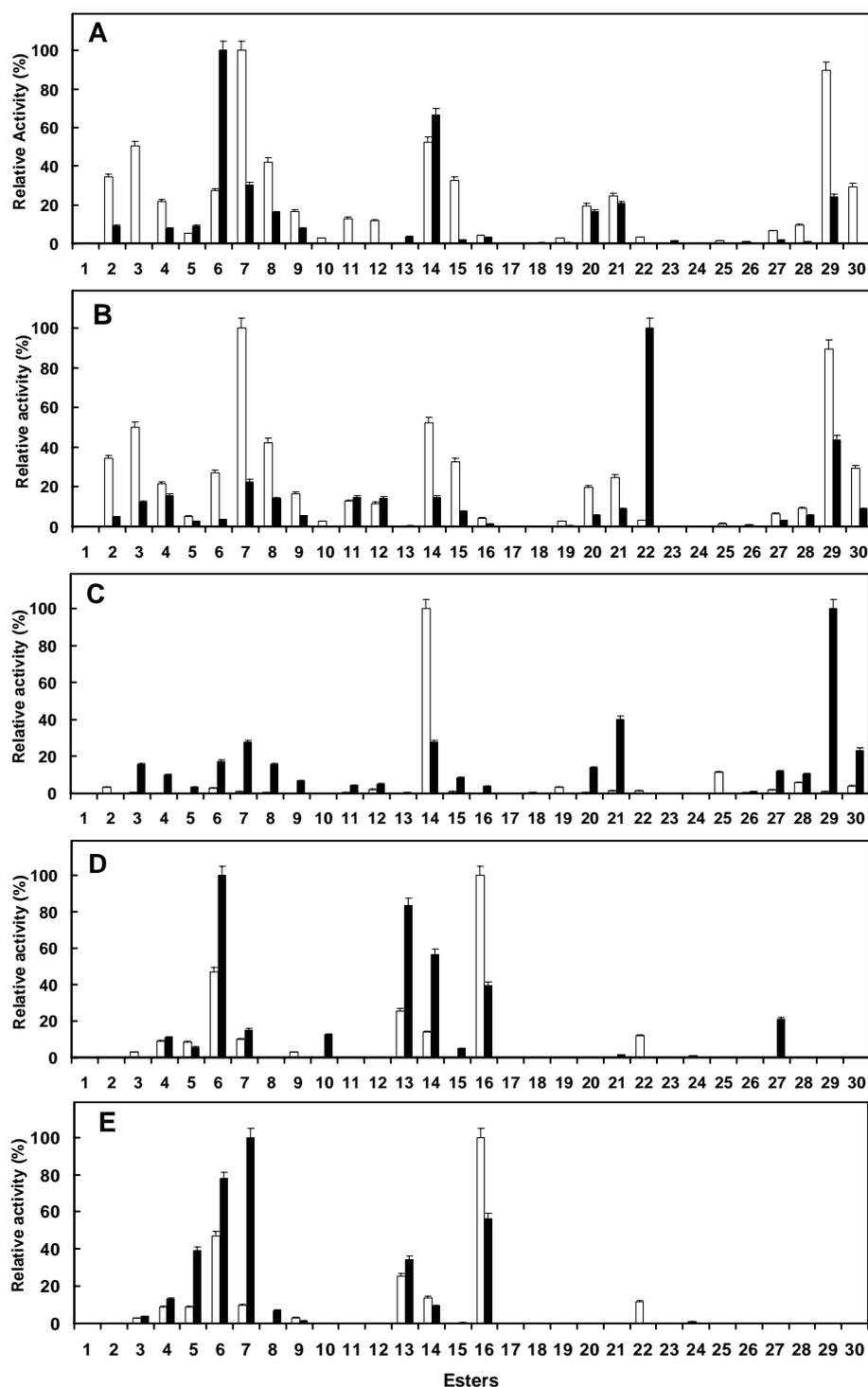


Figure 5. Substrate preference of the original (open bars) and mutated (black bars) recombinant Cm-AAT enzymes toward different alcohols and acyl-CoAs: (A) Cm-AAT1 MT1 FL49 mutation; (B) Cm-AAT1 MT1 VA65 mutation; (C) Cm-AAT3 MT3 AV61 mutation; (D) Cm-AAT4 MT4 QL135 mutation; (E) Cm-AAT4 MT4 LA239 mutation. Activity was measured after purification of the proteins as described under Materials and Methods. Activity is expressed as percent of the most active substrate: (A, B) 2490 pkat mg^{-1} ; (C) 16285 pkat $(\text{mg of protein})^{-1}$; (D, E) 3961 pkat $(\text{mg of protein})^{-1}$. The numbers at the X-axis correspond to the following esters: 1, ethyl acetate; 2, butyl acetate; 3, hexyl acetate; 4, heptyl acetate; 5, octyl acetate; 6, Z-2-hexenyl acetate; 7, E-2-hexenyl acetate; 8, Z-3-hexenyl acetate; 9, E-3-hexenyl acetate; 10, 2-methylpropyl acetate; 11, 2-methylbutyl acetate; 12, 3-methylbutyl acetate; 13, geranyl acetate; 14, benzyl acetate; 15, 2-phenylethyl acetate; 16, cinnamoyl acetate; 17, ethyl propanoate; 18, butyl propanoate; 19, 3-methylbutyl propanoate; 20, hexyl propanoate; 21, 2-phenylethyl propanoate; 22, ethyl butanoate; 23, butyl butyrate; 24, ethyl 2-methylpropanoate; 25, 3-methylbutyl 2-methylbutanoate; 26, ethyl hexanoate; 27, butyl hexanoate; 28, 3-methylbutyl hexanoate; 29, hexyl hexanoate; 30, 2-phenylethyl hexanoate.

5.4 DISCUSSION

We demonstrate here that the alcohol acyltransferases of melon are capable of synthesizing sulfur-containing esters (thioether esters). Cm-AAT1 is by far the most active. The observed activities [10-60 pkat (mg of protein-1)] are much lower than those observed with the preferred substrates of the three recombinant enzymes, but are in the same order of magnitude as for many other compounds (24). Thioether esters are a set of volatile substances that are probably derived from the amino acid methionine and that are very important in the aroma profile of many varieties of melon fruit (11). Buttery et al. (7) reported that one of the typical aroma notes in *C. melo* var. *inodorus* cv. Honeydew was due to a sulfur compound, ethyl (methylthio)acetate. Analyzing the aroma profile of *C. melo* var. *reticulatus*, Jordan et al. (8) identified five sulfur compounds: 2-(methylthio) ethanol, 3-(methylthio)propan-1-ol, ethyl (methylthio)acetate, methyl 2-(methylthio)acetate, and ethyl 3-(methylthio)propanoate. In *C. melo* var. *cantalupensis*, Wyllie and Leach (9) and Homatidou et al. (10) reported a total of nine sulfur compounds. The thioether esters ethyl (methylthio) acetate, 3-(methylthio)propyl acetate, and ethyl 3-(methylthio) propanoate have very high odor values, which indicate that they contribute to the overall aroma perception of ripe fruit (11) with 3-(methylthio)propyl acetate and ethyl (methylthio)acetate having a sweet grassy and a fruity grassy odor, respectively (12), and ethyl 3-(methylthio)propanoate giving a note of fresh and green melon (8). The sulfur compound 2-(methylthio)ethyl acetate is present at substantial concentrations in Charentais melon (31) but has a very weak odor (12), whereas 3-(methylthio) propyl acetate is the most abundant sulfur-containing ester in Charentais melon (31) and strongly contributes to the melon note, as mentioned above. The molecular mass was estimated at about 200 kDa for the three recombinant proteins and 196 kDa for the native AAT extracted from melon fruit. The higher molecular mass of the recombinant AATs can be explained by the fact that they bear a C-terminal V5 epitope (GKPIPPLLGLDST) and 6 His-tag. Because the molecular mass determined by SDS-PAGE and predicted by sequence analysis was around 50 kDa, it can be concluded that the melon AAT proteins are tetramers. It was verified that all of them were active under the tetrameric form. The presence of polymeric forms of AATs has already been mentioned in oriental sweet melon fruit but, in that case, the molecular mass was estimated at 400 kDa, corresponding to an octomer (17). The apparent molecular masses of native AATs extracted reported for other

fruit ranged from 40 kDa in banana (14) to 70 kDa in strawberry (16), indicating that, contrary to melon, they are monomers. All data on recombinant AATs of fruits and flowers indicate that the proteins have a molecular mass, in both native or denaturing conditions, between 53 and 58 kDa (20, 23, 26-28). However, the situation of the melon is not unique among the superfamily of BAHD acyltransferases because dimers and trimers are commonly found (32).

The K_m values reported in the literature for AATs producing volatile esters in fruits and flowers are highly variable. For instance, the K_m for acyl-CoAs may range from around 0.02 mM (27) to around 2 mM (21), and the K_m for the alcohols can vary from 0.2 mM (26) to 46.5 mM (20). The K_m values for the melon AATs are highly different between the three proteins. For acetyl-CoA, K_m values were 1.23 mM for Cm-AAT1, 3.75 mM for Cm-AAT3, and 0.15 mM for Cm-AAT4. Souleyre et al. (23) have shown that great variations of K_m were observed with different combinations of acyl-CoAs and alcohols. Our results indicate that CoA-SH can either stimulate or inhibit the reaction depending on its concentration. This has been confirmed both by adding variable concentrations of CoA-SH in the reaction medium (**Figure 3**) and by modulating the level of CoA-SH produced by the reaction using phosphotransacetylase (**Table 1**). Such an effect of CoA-SH had never been reported for the BAHD superfamily. However, a strong stimulation of free CoA-SH has been reported for animal fatty acid synthetase (33) and for a plant 6-hydroxymellein synthase (34) that are not related to the BAHD superfamily but are involved in the condensation of acetyl- and malonyl-CoAs. The inhibitory effect of CoA-SH at high concentrations is competitive in nature, indicating an interaction of CoA-SH with the acyl-CoA substrate at its enzymatic site. The absence of significant effect on the K_m for alcohols is in agreement with the idea of two-step reactions for the binding of acyl-CoAs and alcohols (23). The stimulatory effect of CoA-SH at low concentrations is more difficult to interpret. By analogy to animal fatty acid synthetases (35), it can be hypothesized that CoA-SH would facilitate the unloading of the inappropriately bound substrates, allowing better access to the enzymatic site of the free substrates. Because, in our case, the effect of low levels of CoA-SH was mainly on the V_{max} for the acetyl-CoA moiety, it is probable that it is the access to the enzymatic site of this cosubstrate, which would be preferentially facilitated. This assumption is consistent with the fact that an independent binding of the two cosubstrates has been deduced from crystallographic studies of a member of the BAHD superfamily, the vinorine synthase (36).

Previous experiments had shown that a cDNA clone, Cm- AAT2, with strong homology to Cm-AAT1 was unable to form volatile esters. Replacing A268 of Cm-AAT2 by T268, which is present in all active AATs, restored Cm-AAT2 enzyme activity, whereas substituting T268 by A268 abolished the activity of Cm-AAT1 (24). To identify the functional amino acid residues involved in the Cm-AATs mechanism, we have screened the amino acid sequence in silico of eight characterized AATs with the melon AAT sequences to find the amino acid residues that were unique to the melon AATs. It appeared that at least four amino acid residues were unique to the melon Cm- AATs in general or to a specific melon AAT (F49 in Cm-AAT1, A61 in Cm-AAT3, Q135 and L339 in Cm-AAT4). In addition to the consideration that these amino acids were unique to the Cm-AATs or to a specific Cm-AAT, the importance of these amino acids comes from their position in the protein. By comparing the melon Cm-AATs sequences with the sequences and the predicted structure of vinorine synthase, the first crystallized BAHD superfamily protein (36), it appeared that the concerned amino acid residues are located in areas of the protein that are important for AATs activity. As mentioned earlier, a hydrophilic amino acid at the 268 position (T or S) is required for the activity of volatile esters formation (24). By referring to the structure of the vinorine synthase protein, the 268 amino acid is located within the end of the R9 helix, which is close to the substrate-accessible channel. It can be hypothesized that the 268 located amino acid controls the entry of the substrate(s). The hydrophilic residue in Cm-AAT1 would allow the entry of low molecular weight alcohols to produce volatile esters, whereas, in the native Cm-AAT2, the hydrophobic residue would prevent the entry of low molecular weight alcohols and allow the access of other substrates that are yet unknown, probably resulting in the production of nonvolatile esters. Replacing F49 by L in Cm-AAT1 induced a change in stereoisomer recognition of the preferred substrate and a reduction of the range of esters being produced. This mutation is located in the $\alpha 2$ strand, which is proximate to the catalytic site and the substrate-accessible channel and therefore could differentiate between different steric conformations. Substituting V65 by A in Cm-AAT1 resulted in a strong restriction of substrate specificity. Inversely, replacing A61 by V at the corresponding position in Cm-AAT3 greatly extended the range of substrates accepted by the enzyme. These amino acids have different hydrophobicities, V being more hydrophobic than A. They belong to the R2 helix in a not very well conserved area located at the external surface of the protein, which does not interfere in the polymeric arrangement of the protein. Changing hydrophobicity could slightly modify the overall conformation of the enzyme under either

the monomeric or polymeric form. When Q135, an uncharged polar amino acid, was replaced by L, a hydrophobic amino acid, in Cm-AAT4 so as to resemble all other AATs, there was a strong change of substrate preference. The α -6 strand in which the Q-135 is located is close to the catalytic site of the protein, which contains His160 in vinorine synthase and in Cm-AAT4. On the other hand, substituting L339 by A in Cm-AAT4 gave higher activity for most of the short-chain acetates. L339 is located in the R10 helix at the periphery of the protein. Lowering hydrophobicity in this region by introducing an A residue may induce conformational changes improving the accessibility to low molecular weight substrates. The expression of mutated proteins in melon fruit through biotechnology may also be considered. However, the nature of the esters synthesized is dependent not only of the substrate specificity of the AATs but also on the availability of the precursors. Besides providing information on the mechanisms of substrate preference, these experiments may have other biotechnological outcomes such as the expression of native or mutated Cm-AAT genes in bacteria or yeasts to generate fermented food with specific aromas.

In conclusion, this paper demonstrates that the three Cm- AATs of melon have differential capacities to synthesize thioether esters, compounds that confer specific aromatic notes to melon fruit. They function under a tetrameric form and are strongly regulated by the product of the reaction, CoA-SH, which has stimulatory or inhibitory effects depending on the concentration. We have also identified some amino acids in the sequence that contribute to the preference for some substrates.

ACKNOWLEDGMENT. We thank Drs. Lucien Stella, Marius Réglier, and Michel Jorgi (University of Marseille, France) for helpful discussions.

This work was supported in part by the “Midi-Pyrénées” Regional Council (Grant 06003789), CAPES from Brazil (doctoral scholarship to L.L.), CONYCIIT from Chile (doctoral scholarship to D.M.), Fundación Séneca, Murcia, Spain (postdoctoral fellowship to P.S.-B.), and the Spanish Ministry of Education and Sciences (postdoctoral fellowship to F.-B.F.). Part of this study has been funded by an INP-INSA grant (BQR 2006).

5.5 LITERATURE CITED

- (1) Paillard, N. M. The flavour of apples, pears and quinces. In *Food Flavours, Part C. The Flavour of Fruit*, Morton, I. D., McLeod, A. J., Eds., Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1990, pp 1-41.
- (2) Shiota, H. New esteric components in the volatiles of banana fruit (*Musa sapientum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 2056-2062.
- (3) Elss, S., Preston, C., Hertzog, C., Heckel, F., Richling, E., Schreier, P. Aroma profiles of pineapple fruit (*Ananas comosus* L., Merr.) and pineapple products. *Lebensm. Wiss. Technol.* **2005**, *38*, 263-274.
- (4) Zabetakis, I., Holden, M. A. Strawberry flavour: analysis and biosynthesis. *J. Sci. Food Agric.* **1997**, *74*, 421-434.
- (5) Beaulieu, J. C., Grimm, C. Identification of volatile compounds in cantaloupe at various developmental stages using solid phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1345-1352.
- (6) Aubert, C., Bourger, N. Investigation of volatiles in Charentais cantaloupe melons (*Cucumis melo* var. *Cantalupensis*). Characterization of aroma constituents in some cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4522-4528.
- (7) Buttery, R. G., Seifert, R. M., Ling, L. C., Soderstrom, E. L., Ogawa, J. M., Turnbaugh, J. G. Additional aroma components of honeydew melon. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, *30*, 1208-1211.
- (8) Jordan, M. J., Shaw, P. E., Goodner, K. L. Volatile components in aqueous essence and fresh fruit of *Cucumis melo* cv. Athena (muskmelon) by GC-MS and GC-O. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5929-5933.
- (9) Wyllie, S. G., Leach, D. N. Additional aroma volatiles of *Cucumis melo*. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 2042-2044.
- (10) Homatidou, V., Karvouni, S., Dourtouglou, V., Poulos, C. Determination of total volatile components of *Cucumis melo* L. variety *Cantalupensis*. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 1385-1388.
- (11) Wyllie, S. G., Leach, D. N. Sulfur-containing compounds in the aroma volatiles of melons (*Cucumis melo*). *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 253-256.
- (12) Sakamoto, T., Hayata, Y., Kozuka, H., Sakamoto, K., Nishimura, O., Masuda, H., Osajima, Y. Sulfur-containing compounds in the aroma volatiles of melon fruit 'Miyabi'. *J. Jpn. Soc. Hortic.Sci.* **2002**, *71*, 388-390.
- (13) Sanz, C., Olias, J. M., Pe'rez, A. G. Aroma biochemistry of fruit and vegetables. In *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*, Tomas-Barberan, F. A., Robins, R. J., Eds., Oxford Science Publishing: Oxford, U.K., 1997, pp 313-329.
- (14) Harada, M., Ueda, Y., Iwata, T. Purification and some properties of alcohol acyltransferase from banana fruit. *Plant Cell Physiol.* **1985**, *26*, 1067-1074.
- (15) Fellman, J. K., Mattheis, J. P., Matthinson, D. S., Bostick, B. C. Assay of acetyl-CoA alcohol transferase in 'Delicious' apples. *HortScience* **1991**, *27*, 773-776.
- (16) Pe'rez, A. G., Sanz, C., Oli'as, J. M. Partial purification and some properties of alcohol acyltransferase from strawberry fruits. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1462-1466.
- (17) Ueda, Y., Fujishita, N., Chachin, K. Presence of alcohol acyltransferase in melons (*Cucumis melo* L.). *PostharVest Biol. Technol.* **1997**, *10*, 121-126.
- (18) Wang, J., De Luca, V. D. The biosynthesis and regulation of biosynthesis of Concord grape fruit esters, including 'foxy' methylantranilate. *Plant J.* **2005**, *44*, 606-619.

- (19) Olias, R., Perez, A. G., Sanz, C. Catalytic properties of alcohol acyltransferase in different strawberry species and cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4031-4036.
- (20) Aharoni, A., Keizer, L. C. P., Bouwmeester, H. J., Sun, Z., Alvarez-Huerta, M., Verhoeven, H. A., Blass, J., van Houwelingen, A. M. M. L., De Vos, R. C. H., van der Voet, H., Jansen, R. C., Guis, M., Mol, J., Davis, R. W., Schena, M., Van Tunen, A. J., O'Connell, A. P. Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell* **2000**, *12*, 647-661.
- (21) Beekwilder, J., Alvarez-Huerta, M., Neef, E., Verstappen, F. W. A., Bouwmeester, H. J., Aharoni, A. Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. *Plant Physiol.* **2004**, *135*, 1865-1878.
- (22) Yahyaoui, F., Wongs-Aree, C., Latché, A., Hackett, R., Grierson, D., Pech, J. C. Molecular and biochemical characteristics of a gene encoding an alcohol acyltransferase involved in the generation of aroma volatile esters during melon ripening. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 2359-2366.
- (23) Souleyre, E. J. F., Greenwood, D. R., Friel, E. N., Karunaitnam, S., Newcomb, R. D. An alcohol acyl transferase from apple (cv Royal Gala), MpAAT1, produces esters involved in apple fruit flavor. *FEBS J.* **2005**, *272*, 3132-3144.
- (24) El-Sharkawy, I., Manriquez, D., Flores, F., Regad, F., Bouzayen, M., Latché, A., Pech, J. C. Functional characterization of a melon alcohol acyltransferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity. *Plant Mol. Biol.* **2005**, *39*, 345-362.
- (25) Shalit, M., Katzir, N., Tadmor, Y., Larkov, O., Burger, Y., Schalechet, F., Lastochkin, E., Ravid, U., Amar, O., Edelstein, M., Karchi, Z., Lewinsohn, E. Acetyl-CoA: alcohol acetyl transferase activity and aroma formation in ripening melon fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 794-799.
- (26) Shalit, M., Guterman, I., Volpin, H., Bar, E., Tamari, T., Menda, N., Adam, Z., Zamir, D., Vainstein, A., Weiss, D., Pichersky, E., Lewinsohn, E. Volatile ester formation in roses. Identification of an acetyl-coenzyme A geraniol/citronellol acetyl transferase in developing rose petals. *Plant Physiol.* **2003**, *131*, 1868-1876.
- (27) D'Auria, J., Chen, F., Pichersky, E. Characterization of an acyltransferase capable of synthesizing benzylbenzoate and other volatile esters in flowers and damaged leaves of *Clarkia breweri*. *Plant Physiol.* **2002**, *130*, 466-476.
- (28) Dudareva, N., D'Auria, J. C., Nam, K. H., Raguso, R. A., Pichersky, E. Acetyl-CoA: benzylalcohol acetyltransferase an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. *Plant J.* **1998**, *14*, 297-304.
- (29) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of proteindye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
- (30) Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G., Gibson, T. J. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem. Sci.* **1998**, *23*, 403-405.
- (31) Aubert, C., Baumann, S., Arguel, H. Optimization of the analysis of flavor volatile compounds by liquid-liquid microextraction (LLME). Application to the aroma analysis of melons, peaches, grapes, strawberries, and tomatoes. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8881-8895.
- (32) St-Pierre, B., De Luca, V. Evolution of acyltransferase genes: origin and diversification of the BAHD superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism. In *Recent Advances in Phytochemistry Evolution of Metabolic Pathways*, John, R. I., Romeo, R., Varin, L., De Luca, V., Eds., Elsevier Science Publishing: Oxford, U.K., 2000, Vol. 34, pp 285-315.

- (33) Linn, T. C., Stark, M. J., Srere, P. A. Coenzyme A is required for rat liver fatty acid synthetase activity. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 1388-1392.
- (34) Kurosaki, F., Arisawa, M. Free CoA as activator of 6-hydroxymellein synthase, a multifunctional polyketide biosynthetic enzyme in carrot. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 565-569.
- (35) Stern, A., Sedgwick, B., Smith, S. The free coenzyme A requirement of animal fatty acid synthetase. Participation in the continuous exchange of acetyl and malonyl moities between coenzyme A thioester and enzyme. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 799-803.
- (36) Ma, X., Koepke, J., Panjikar, S., Fritzch, G., Sto"ckigt, J. Crystal structure of vinorine synthase, the first representative of the BAHD superfamily. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 13576-13583.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como era esperada, a redução da produção de etileno de melões ‘Cantaloupe’ ‘Vedrantais’, via transformação genética com um clone *antisense* da ACC oxidase, resultou em prolongamento da vida pós-colheita dos frutos em pelo menos 10 dias. Além disso, os frutos transgênicos apresentaram prolongamento do ciclo de maturação, maior acúmulo de sólidos solúveis, manutenção de maior firmeza de polpa, acidez e clorofilas do que os não transformados. O teor de carotenóides foi semelhante em frutos transgênicos e frutos não transformados. Entretanto, a intensidade aromática dos melões transgênicos foi significativamente menor do que dos não transformados. Além disso, observaram-se alterações fenotípicas nas plantas transgênicas, caracterizadas por uma menor senescência das folhas e maior brotação lateral.

Considerando-se que a síntese de ésteres em frutos climatéricos é um evento etileno-dependente, esperava-se que a aplicação exógena de etileno recuperasse a síntese desses compostos voláteis em melões transgênicos. Porém, não houve restauro da produção de compostos voláteis nos patamares detectados em melões não transformados, embora o etileno aplicado tenha induzido a transcrição e a tradução da Cm-AAT1, que corresponde a um clone da AAT, considerada enzima-chave na produção de ésteres. Isso sugere que a AAT não é o único fator limitante na retomada da produção de ésteres. Uma hipótese provável desse comportamento é a baixa expressão de enzimas intermediárias da via de biossíntese de ésteres, como é o caso de álcool desidrogenases (ADHs), reduzindo a disponibilidade de substratos para as AATs, por exemplo.

Outra mecanismo citado como causa provável da não recuperação da produção de ésteres é o aumento dos teores de citocininas nos frutos. Essa avaliação foi adotada tendo em vista que, nos meloeiros transgênicos, além do prolongamento do ciclo vegetativo das plantas, houve menor senescência de folhas e maior emissão de brotos laterais, que também são respostas clássicas da ação de citocininas. Desse estudo verificou-se que os meloeiros transgênicos apresentam maior massa radicular e, nos frutos, a concentração de citocininas é 4 a 6 vezes maior do que nos frutos não transformados. Essa maior concentração de citocininas pode ser uma das causas da menor sensibilidade dos frutos ao etileno, ao menos para alguns genes, o que também já foi observado em outros vegetais.

Melões 'Cantaloupe' 'Charantais' transformados com o clone pMEL1 respondem à aplicação de etileno, restaurando a produção de compostos voláteis. A partir desse modelo vegetal foram isolados três clones de AAT, denominados Cm-AAT1, Cm-AAT3 e Cm-AAT4). O estudo bioquímico das enzimas recombinantes desses clones demonstrou que todas têm síntese de ésteres sulfurados, com destaque para a Cm-AAT1 que é a mais ativa. Essas AATs são ativas na forma tetramérica e são fortemente reguladas pelo produto da reação, o CoA-SH, que tem efeitos estimulador e inibidor dependendo da concentração. Além disso, demonstrou-se, por mutações dirigidas, que alguns aminoácidos dessas enzimas conferem especificidade pelo substrato e influenciam a velocidade da reação.

Desse conjunto de resultados, o trabalho traz contribuições científicas, confirmando o conhecimento amplamente disponível de que a redução da produção de etileno contribui para a conservação de frutos, mas que há eventos denominados de etileno-dependentes que não são apenas regulados por esse fitormônio. É o caso da produção dos compostos voláteis, na qual se demonstrou que as citocininas também podem desempenhar função reguladora, provavelmente reduzindo a sensibilidade ao etileno. Afora isso, demonstrou-se em AATs recombinantes que há diferenças de preferência por substratos e que alterações específicas de determinados aminoácidos pode alterar essa propriedade.

Do ponto de vista tecnológico este trabalho também traz contribuições destacadas. A primeira relaciona o fato de que quando se adota uma estratégia de prolongamento de vida-de-prateleira, se altera, no mínimo, alguns quesitos de qualidade sensorial, como no caso em estudo, o aroma. Além disso, ao buscar-se alterar o metabolismo de um hormônio (etileno), se alterou, no mínimo, a síntese de outro fitoregulador importante em vegetais, neste caso as citocininas. Como consequência, o comportamento vegetativo das plantas e de maturação dos frutos não é apenas dependente do etileno, como por exemplo, o ciclo vegetativo, brotação lateral, senescência de folhas, síntese de compostos voláteis e a degradação de clorofilas da casca. Complementarmente, o fato de ter-se observado maior massa radicular em plantas transgênicas, sugere que ações que promovam a formação de raízes (órgão no qual há síntese de citocininas) podem contribuir para reduzir a senescência de folhas, flores e frutos. Evidentemente, essa hipótese deve ser testada em cada espécie.

Para o esclarecimento das causas que levam os melões transgênicos a não responderem, na integridade, à ação do etileno, sugere-se:

- Estudar a expressão de ADHs. Nos frutos transgênicos pode estar ocorrendo menor fornecimento de substrato para a produção de ésteres, em função da menor atividade de ADHs, enzimas que catalisam a redução dos aldeídos a álcoois, esses últimos substratos das AATs.
- Aplicar propileno em melões transgênicos. A aplicação dessa molécula, com efeito análogo ao etileno, permitirá observar se o sistema de recepção e indução da produção do etileno e seus efeitos sobre os demais eventos da maturação estão efetivamente ativos. No trabalho já realizado, com a aplicação de etileno, demonstrou-se que, pelo menos em parte, o sistema de recepção e transdução do sinal está funcional, tendo em vista que houve intensa expressão de genes da ACCO e da AAT.
- Aplicar etileno em melões das demais linhagens AS. A aplicação de etileno nos frutos das demais linhagens obtidas pela transformação genética, permitiria identificar a possível existência de diferentes comportamentos entre os transformantes devido à inserção gênica, o que poderia explicar as respostas distintas entre esses melões.
- Estudar, separadamente, as respostas à aplicação do etileno na casca e na polpa de melões transgênicos. Por ter-se observado (embora não mensurado) que a intensidade aromática da fração casca dos melões não transformados é maior do que a da polpa, acredita-se que a alteração do metabolismo das plantas AS3, resultando na maior síntese de citocininas, esteja afetando mais a casca do que a polpa. É justamente na casca que se observaram as menores variações de coloração e de teor de clorofilas.
- Identificação de alvos de silenciamento correspondentes a siRNAs derivados do transgene ACC oxidase de maçã. Conforme modelo de Silhavy & Burgyn (2004) para silenciamento gênico em plantas, elaborado a partir de uma ampla revisão de literatura, seqüências curtas de RNAs interferentes (siRNA, *short interfering RNAs*) são formadas a partir de longas seqüências duplas de RNA (dsRNA, *double stranded RNA*) pela ação de uma nuclease (DICER, semelhante à RNAase-III). Os siRNAs conferem especificidade a complexos efetores tais como RISC (*RNA inducing silencing complex*) que atuam na mediação do silenciamento do mesmo gene do qual são derivados ou de genes similares. Neste contexto, é possível que a expressão em melão do transgene ACC oxidase de maçã em orientação antisense, resultou na formação de siRNAs que afetaram a atividade de outros genes, direta ou indiretamente, inclusive de genes associados à biossíntese de citocininas.
-

• 7 REFERÊNCIAS GERAIS

- AGIUS, F., GONZÁLEZ-LAMOTHE, R., CABALLERO, J.L., MUÑOZ-BLANCO, J., BOTELLA, M.A., VALPUESTA, V., 2003 Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. **Nat. Biotech.**, 21, 177-181.
- AHARONI, A., KEIZER, L.C.P., BOUWMEESTER, H.J., SUN, Z., ALVAREZ-HUERTA, M., VERHOEVEN, H.A., BLASS, J., VAN HOUWELINGEN, A.M.M.L., DE VOS, R.C.H., VAN DER VOET, H., JANSEN, R.C., GUIJ, M., MOL, J., DAVIS, R.W., SCHENA, M., VAN TUNEN, A.J., O'CONNELL, A.P., 2000. Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. **Plant Cell**, 12, 647-661.
- AUBERT, C. AND BOURGER N., 2004. Investigation of volatiles in Charentais Cantaloupe melons (*Cucumis melo* Var *Cantalupensis*). Characterization of aroma constituents in some cultivars. **J. Agric. Food Chem.**, 52, 4522-4528.
- AUSUBEL, F.M., BRENT, R., GISTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K., 1994. The polymerase chain reaction,. **In: K. Jansen (Ed.), Current protocols in molecular biology-Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons**, 2. p.15.1.1. - 15.1.4. New York.
- AYUB, R., GUIJ, M., BEN-AMOR, M., GILLOT, L., ROUSTAN, J-P., LATCHÉ, A., BOUZAYEN, M., PECH, J-C., 1996. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. **Nat. Biotech.**, 14, 862–866.
- BACHEM, C.W., VAN DER HOEVEN, R.S., DE BRUIJN, S.M., VREUGDENHIL, D., ZABEAU, M., VISSER, R.G., 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. **Plant J.**, 9, 745-53.
- BALAGUÉ, C., WATSON, C.F., TURNER, A.J., ROUGE, P., PICTON, S., PECH, J-C., GRIERSON, D., 1993. Isolation of a ripening and wound-induced cDNA from *Cucumis melo* L. encoding a protein with homology to the ethylene-forming enzyme. **Eur. J. Biochem.** 212: 27–34 bell pepper. **Plant Physiol.** 112, 615–622.
- BALDWIN, E.A., SCOTT, J.W., SHEWMAKER, C.K., SCHUCH, W., 2000. Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. **HortScience**, 35, 1013–1022.
- BALDWIN, E.A., NISPEROS, M.O., MOSHONAS, M.G., 1991. Quantitative analysis of flavor and other volatiles and for other constituents of two tomato varieties during ripening. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, 116, 265–269.
- BANGERTH, F., STREIF, J., 1987. Effect of aminoethoxyvinylglycine and low-pressure storage on the post-storage production of aroma volatiles by Golden Delicious apples. **J. Science Food Agric.**, 41, 351-360.
- BAUCHOT, A. D., MOTTRAM, D. S., DODSON, A. T., JOHN, P., 1998. Effect of aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase antisense gene on the formation of volatile ester in cantaloupe charentais melon (cv. Védrandais). **J. Agric. Food Chem.**, 46, 4787-4792.
- BEEKWILDER, J., ALVAREZ-HUERTA, M., NEEF, E., VERSTAPPEN, F.W.A., BOUWMEESTER, H.J., AHARONI A., 2004. Substrate usage by recombinant alcohol acyltransferases from various fruit species. **Plant Physiol.**, 135, 1865–1878.
- BENDER, R. J., SEIBERT, E., CASALI, M. E., LEÃO, M. L. de, BRANDELLI, A., 2004. Avaliação de maturação e de danos de frio em pêssegos da cv. Chimarrita submetidos ao pré-resfriamento em água.. In: XVIII Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2004, Florianópolis. Resumos do XVIII CBF.

- BLEECKER, A.B. & KENDE, H., 2000. Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** 16, 1–18.
- BRADY, J.C., 1987. Fruit ripening. **Annual review of Plant Physiology.** 38, 155-178.
- BROWN, D.S., BUCHANAN, J.R., HICKS, J.R., URIU, K., MURAOKA, T., 1968. Volatiles from apple fruits as affected by phosphorus fertilization. **Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.** 93, 705–715.
- BROWN, D.S., BUCHANAN, J.R., HICKS, J.R., 1968. Volatiles from apples, as related to variety, season, maturity and storage. **Ilgardia**, 39, 37–67.
- BOUQUIN, T., LASSERRE, E., PRADIER, J., PECH, J.-C., BALAGUÉ, C., 1997. Wound and ethylene induction of the ACC oxidase melon gene CM-ACO1 occurs via two direct and independent transduction pathways. **Plant Mol. Biol.**, 35, 1029-1035.
- BOUZAYEN, M., COOPER, W., BARRY, C., ZEGZOUTI, H., HAMILTON, A.J., GRIERSON, D., 1993. EFE multi-gene family in tomato plants: expression and characterization. In: CELLULAR AND MOLECULAR ASPECTS OF THE PLANT HORMONE ETHYLENE. Pech, J.C., Latché, A. & Balagué, C. (eds). **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, The Netherlands, 76-81.
- BUFLER, G., 1986. Ethylene-promoted conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in peel of apple at various stages of fruit development. **Plant Physiol.**, 80, 539-543.
- BURG, S.P., 1962. The physiology of ethylene formation. **Annual Review of Plant Physiol.**, 13, 265-302.
- BUTTERY, R., LING, L., 1993. in Bioactive Volatiles from Plants, R. Teranishi, R. G. Buttery, H. Sugisawa, **Eds. (ACS Symposium Series 525, American Chemical Society, Washington, DC)**, 23.
- CHANG, H., JONES, M.L., BANOWETZ, G.M., CLARK, D.G., 2003 Overproduction of cytokinins in petunia flowers transformed with PSAG12-IPT delays corolla senescence and decreases sensitivity to ethylene. **Plant Physiol.**, 132, 2174-2183.
- CHAVES, A. L., ROMBALDI, C. V., ARAUJO, P.J., BALAGUÉ, C., PECH, J.-C., AYUB, R., 1998. Ciclo de maturação e produção de etileno de tomates (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) transgênicos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 18, 116-120.
- CHAVES, A. L., BIHERALS, J.D., ZIMMER, P.D., SILVA, J., ROMBALDI, C.V., 1997. Caracterização da ACC oxidase em frutos climatéricos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 3, 320-324.
- CHEN, L.F., HWANG, J.Y., CHARNG, Y.Y., SUN, C.W., YANG, S.F., 2001. Transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) with isopentenyltransferase gene via *Agrobacterium tumefaciens* for post-harvest yellowing retardation. **Molecular Breeding**, 7, 243-257.
- CHITARRA, M.I.F., CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manejo**. 2.ed. Lavras: Ufla, 2005. 785p.
- CLIJSTERS, H., 1975. Retation possible entre l'activité photosynthétique de la pomme et as maturation. In: FACTEUR ET RÉGULATION DE LA MATURATION DES FRUITS, 1974, Paris: **Colloques internationaux du Centre National de la Recherche Scientifique**, 238, 41-47.
- COSTA, C. P., PINTO, C. A. B. P., 1977. **Melhoramento de hortaliças**. Piracicaba: ESALQ, 164-178.
- D'AURIA, J., CHEN, F., PICHERSKY, E., 2002. Characterization of an acyltransferase capable of synthesizing benzylbenzoate and other volatile esters in flowers and damaged leaves of *Clarkia breweri*. **Plant Physiol.** 130, 466-476.

- DE BRUXELLES, G., PEACOCK, W., DENNIS, E. AND DOLFERUS, R., 1996. Abscisic acid induces the alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** 111, 381-91.
- DEFILIPPI, B.G., DANDEKAR, A.M., KADER, A.A., 2004 Impact of suppression of ethylene action or biosynthesis on flavor metabolites in apple (*Malus domestica* Borkh) fruits. **J. Agr. Food Chem.** 52, 5694-5701.
- DEFILIPPI, B.G., KADER, A.A., DANDEKAR, A.M., 2005. Apple aroma: alcohol acyltransferase, a rate limiting step for ester biosynthesis, is regulated by ethylene. **Plant Science.**, 168, 1199-1210.
- DIRINCK, P., DE POOTER, H., SCHAMP, N., 1989. Aroma development in ripening fruits. **In: Teranishi, R., Buttery, R.G., Shadidi, F. (Eds.), Flavor Chemistry, Trends and Developments. ACS Press, Washington, 23–34.**
- DONG, D.J., OLSON, D., SILVERSTONE, A. & YANG, S.F., 1992. Sequence of a cDNA coding for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog from apple fruit. **Plant Physiol.**, 98, 1530-1531.
- DOWNS, C.G., SOMERFIELD, S.D., DAVEY, M.C., 1997. Cytokinin treatment delays senescence but not sucrose loss in harvested broccoli. **Postharvest Biol. Technol.**, 11, 93-100.
- DUDAREVA, N., D'AURIA, J.C., NAM, K.H., RAGUSO, R.A., PICHERSKY, E., 1998. Acetyl-CoA: benzylalcohol acetyltransferase- an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. **Plant J.** 14, 297-304.
- ECHEVERRIA, G., GRAELL, J., LOPEZ, M.L. AND LARA, I., 2004. Volatile production, quality, and aroma-related enzyme activities during maturation of "Fuji" apples. **Postharvest Biol. Technol.**, 31, 217-227.
- ECKER, J.R., 1995. The ethylene signal-transduction pathway in plants. **Science**, v. 268, n. 5211, p. 667-675.
- EL-SHARKAWY, I., MANRÍQUEZ, D., FLORES, F., REGAD, F., BOUZAYEN, M., LATCHÉ, A. AND PECH, J.C., 2005. Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity. **Plant Mol. Biol.** 39, 345-362.
- FALLIK, E., TUVIA, S. A., HOREV, B., COPEL, A., RODOV, V., AHARONI, Y., ULRICH, D., SCHULZ, H., 2001. Characterisation of 'galia' melon aroma by gc and mass spectrometric sensor measurements after prolonged storage. **Postharvest Biol. Technol.** 22, 85–91.
- FELLMAN, J.K., MILLER, T.W., MATTISON, D.S., MATTHEIS, J.P., 2000. Factors that influence biosynthesis of volatile flavor compounds in apple fruits. **HortScience**, 35, 1026–1033.
- FELLMAN., J.K., MATTHEIS, J.P., MATTHINSON, D.S., BOSTICK, B.C., 1991. Assay of acetyl-CoA alcohol transferase in 'Delicious' apples. **HortScience**, 27, 773-776.
- FERNANDES, M.S., 2006. Perspectivas de mercado para as frutas brasileiras. **In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2006, Cabo Frio-RJ, Brasil: Palestras do Congresso Brasileiro de Fruticultura.**
- FLORES, F., EL YAHYAOU, F., DE BILLERBECK, G., ROMOJARO, F., LATCHÉ, A., BOUZAYEN, M., PECH, J.C., AMBID, C., 2002. Role of ethylene in the biosynthetic pathway of aliphatic ester aroma volatiles in Charentais Cantaloupe melons. **J. Exp. Bot.** 53, 201-206.
- FLUHR, R. & MATTOO, A.K., 1996. Ethylene: Biosynthesis and perception. **Critical Reviews in Plant Science**, 5, 479-523.

- FONSECA, S., HACKLER JR, L., ZVARA, A., FERREIRA, S., BALDÉ, A., DUDITS, D., PAIS, M.S. AND PUSKAS, L.G., 2004. Monitoring gene expression along pear fruit development, ripening and senescence using cDNA microarrays. **Plant Science**, 167, 457-469.
- FRANCO, M. R. B., RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., 1983. Trapping of soursop (*Anona muricata*) juice volátiles on Porapak Q by suction. **J. Sci. Food Agric.**, 34, 293-299.
- FRAY, R.G. & GRIERSON, D., 1993. Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and co-suppression. **Plant Mol. Biol.** 22: 589-602.
- GALLARDO, K., LE SIGNOR, C., VANDEKERCKHOVE, J., THOMPSON, R.D., BURSTIN, J., 2003. Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse metabolic processes related to reserve accumulation. **Plant Physiol.**, 133, 664-82.
- GAN, S., AMASINO, R. M. , 1995. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. **Science**, 270, 1986-1987.
- GARRUTI, D. DOS S., FRANCO, M. R. B., SILVA, M. A. A.A.P. DA, JANZANNTI, N. S., AALVES, G. L. 2001. Compostos voláteis do sabor de pseudofrutos de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.). **Boletim de pesquisa e desenvolvimento: Embrapa Agroindústria Tropical**, 29 p.
- GIOVANNONI, J.J., DELLAPENNA, D., BENNETT, A.B., FISCHER, R.L. Expression of a Chimeric Polygalacturonase Gene in Transgenic rin (Ripening Inhibitor) Tomato Fruit Results in Polyuronide Degradation but not Fruit Softening. **Plant Cell** 1: 53-63, 1989.
- GIOVANNONI, J.J., 2004. Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. **Plant Cell**, 16, 170–180.
- GOFF, S.A. AND H.J. KLEE., 2006 Plant Volatile Compounds: Sensory Cues for Health and Nutritional Value? **SCIENCE**, 311, 815-819.
- GOMEZ, M. L. P. A., LAJOLO, F.M., CORDENUNSI, B.R., 1999. Metabolismos de carboidratos durante o amadurecimento do mamão: influência da irradiação gama. **Ciência e Tecnol. de Aliment.**, 19, 246-252.
- GRAY, J., PICTON, S., SHABBER, J., SCHUCH, W, & GRIERSON, D., 1992Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes. **Plant Mol. Biol.**, 19, 69-87.
- GRIERSON, D., TUKER, G.A., KNEE, J., RAY, J., BIRD, C.R., SCHUCH, W. Sequencing and identification of a cDNA clone for tomato polygalacturonase. , 1986. **Nucleic Acids Research**, 14, 8595-8603.
- GROB, K. JR., ROMANN, A. , 1981. Sample transfer in splitless injections in capillary gas chromatographic. **J. Chromatogr.**, 214, p.118.
- GUILLÉN, P., DOMENECH, A., LARRIGAUDIÈRE, C., VENDRELL, M., 1998. Ethylene-induced rise of abscisic acid levels and ACC oxidase activity in immature melons. **J. Hort. Science Biotechnol.**, 73, 313-316.
- GUIS, M., BOTONDI, R., BEM-AMOR, M., AYUB, R. A., BOUZAYEN, M., PECH, J. C., LATCHE, A., 1997. Ripening-associated biochemical traits of Cantaloupe Charentais melons expressing an antisense ACC oxidase transgene. **J. Amer. Hort. Sci.**, 122, 748-751.
- GUO, H. E ECKER, J.R., 2004. The ethylene signaling pathway: new insights. **Curr. Opin. Plant Biol.**, 7, 40-49.
- HADFIELD, KA, DANG, T., GUIS, M., PECH, J-C., BOUZAYEN, M., BENETT, A.B., 2000Characterization of Ripening-Regulated cDNAs and Their Expression in Ethylene-Suppressed Charentais Melon Fruit1. **Plant Physiol.**, 122, 977–983.

- HAMILTON, A.J., LYCETT, G.W., GRIERSON, D., 1990. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. **Nature**, 346, 284-287.
- HAMILTON, A.J., BOUZAYEN, M., GRIERSON, D., 1991. Identification of a tomato gene for the ethylene forming enzyme by expression in yeast. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 88, 7434-7437.
- HARADA, M., UEDA, Y., IWATA, T. Purification and some properties of alcohol acyltransferase from banana fruit. *Plant Cell Physiol.* 26: 1067-1074, 1985.
- HARKETT, P.J., HULME, A.C., RHODES, M.J.C., WOOLTORTON, L.S.C., 1971. The threshold value for physiological action of ethylene on apple fruits. **J. Food Technol.**, 6, 39-45.
- HARTMANN, C., DROUET, A., MORIN, F., 1987. Ethylene and ripening of apple, pear and cherry fruit. *Plant physiol. biochem.*, 25, 505-512.
- HEDDEN, P. & PHILIPS, A.L., 2000. Manipulation of hormone biosynthetic genes in transgenic plants. **Current Opinion in Biotechnology**, 11, 130-137.
- HENEGARIU, O., HEREMA, N.A., DLOUHY, S.R., VANCE, G.H., VOGT, P.H., 1997. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. **Bio Techniques**, 23, 504-511.
- HOFFMAN, N. E. AND YANG, S. F., 1980. Changes of 1-aminocyclopropane-1 carboxylic acid content in ripening fruits in relation to their ethylene production rates. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, 105, 492-495.
- HOMATIDOU, V.I., KARVOUNI, S.S., DOURTOGLOU, V.G. & POULOS, C.N., 1992. Determination of total volatile components of *Cucumis melo* L. variety *cantaloupensis*. **J. Agric. Food Chem.**, 40, 1385-1388.
- INABA, A., 1993. Recent studies on postharvest physiology and technology of horticultural crops in Japan. **Postharvest News and Information**, 4, 101-114.
- JANZANNTTI, N. S., FRANCO, M. B. B., LANÇAS, F. M., 2000. Identificação de compostos voláteis de maçãs, cultivar Fuji, por cromatografia gasosa-espectrometria de massas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 20, 164-171.
- JANZANNTTI, N. S. **Composição de voláteis de maçãs (*Malus domestica*) cultivar Fuji. II. Efeito do processamento e armazenamento na composição de voláteis de suco clarificado de maçã Fuji.** Campinas, 1996. 180 p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- JOHNSON, R.P. & ECKER, J.R., 1998. The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. **Annual Review of Genetics**, 32, 227-254.
- KAKIMOTO, T., 2001. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. **Plant Cell Physiol.**, 42, 677-685.
- KANELLIS, A., 1998. Ethylene: cellular and molecular aspects. **Kluwer Pub.** 256p.
- KENDE, H., 1993. Ethylene biosynthesis. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 44, 283-307.
- KLANN, E. M. HALL, B. BENNETT, A. B., 1996. Antisense Acid Invertase (TIV1) Gene Alters Soluble Sugar Composition and Size in Transgenic Tomato Fruit. **Plant Physiol.** 112, 1321-1330.
- KLEE, H. J., HAYFORD, M. B., KRETZMER, K. A. BARRY, G. F., KISHORE G. M., 1991. Control of Ethylene Synthesis by Expression of a Bacterial Enzyme in Transgenic Tomato Plants. **The Plant Cell**, 3, 1187-1193.
- KONING, R. E. "Fruit Growth and Ripening". *Plant Physiology Website*. 1994. http://koning.ecsu.ctstateu.edu/plants_human/fruitgrowripe.html. Acessado em dezembro de 2004.

- LALEL, H.J.D., SINGH, Z., TAN, S.C., 2003. Aroma volatile production during fruit ripening of 'Kensington Pride' mango. **Postharvest Biol. Technol.**, 27, 323-336.
- LASSERE, E., BOUQUIN, T., HERNANDEZ, J.A., BULL, J., PECH, J.-C., BALAGUÉ, C., 1996. Structure and expression of three genes encoding ACC oxidase homologs from melon (*Cucumis melo* L.) **Mol. Gen. Genet.** 251, 81-90.
- LAU, O.L., LIU, Y., YANG, S.F., 1986. Effects of fruit detachment on ethylene biosynthesis and loss of flesh firmness, skin color, and starch in ripening Golden Delicious apples. **J. Amer. Soc. Hortic. Sci.**, 111, 731-734.
- LELIÈVRE, J. M., LATCHE, A., JONES, B., BOUZAYEN, M., PECH, J. C., 1997a. Ethylene and fruit ripening. **Physiol. Plantarum**, 101, 727-739.
- LELIÈVRE, J. M., TICHIT, L., DAO, P., FILLION, L., NAM, Y. W., PECH, J. C., LATCHÉ, A., 1997. Effects of chilling on the expression of ethylene biosynthetic genes in Passe-Crassane pear (*Pyrus communis*, L.) fruits. **Plant Mol. Biol.**, 33, 847-855.
- LI, Y., DARLEY, C.P., ONGARO, V., FLEMING, A., SCHIPPER, O., BALDAUF, S.L. ET MCQUEEN-MASON, S.J., 2002. Plant expansins are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin. **Plant Physiol.**, 128, 854-864.
- LIANG, P.E. & PARDEE, A.B., 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, 257, 967-971.
- LIEBERMAN, M., MAPSON, L. W., KUNISHI, A. T., WARDALE, D. A., 1996. Stimulation of ethylene production in apple tissue slices by methionine. **Plant Physiol.**, 41, 376-382.
- LIEBERMAN, M., MAPSON, L. W., KUNISHI, A. T., WARDALE, D. A., 1965. Ethylene production from methionine. **Biochem. J.**, 97, 449-459.
- LIU, X., SHIOMI, S., NAKATSUKA, A., KUBO, Y., NAKAMURA, R., INABA, A., 1999. Characterization of ethylene biosynthesis associated with ripening in banana fruit. **Plant Physiol.**, 121, 1257-1267.
- LIU, Y., SU, L.Y., YANG, S.F., 1985. Ethylene promotes the capability to manonylate 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and D-amino acids in preclimateric tomato fruits. **Plant Physiol.**, 77, 891-895.
- LURIE, S., PRE-AYMARD, C., RAVID, U., LARKOV, O., FALLIK, E., 2002. Effect of 1-methylcyclopropene on volatile emission and aroma in cv Anna apples. **J. Agr. Food Chem.** 50, 4251-4256.
- MAISTRO, L. C., 2001. Alface minimamente processada: uma revisão. **Rev. Nutr.**, 14, 219-224.
- MANRIQUEZ, D., EL-SHARKAWY, I., FLORES, F.B., EL-YAHYAOU, F., REGAD, F., BOUZAYEN, M., LATCHE, A., PECH J.C., 2006. Two highly divergent alcohol dehydrogenases of melon exhibit fruit ripening-specific expression and distinct biochemical characteristics. **Plant Mol. Biol.** 61, 675-85.
- MANSOUR, R. & SAFTNER, R.A., 1995. Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid N-malonyltransferase from tomato fruit. **Plant Physiol.**, 108, 1241-1249.
- MARODIN, G. A. B. & BENDER, R. J., 2004. Sistemas de classificação de frutas de caroço na região metropolitana de Porto Alegre. In: **Encontro Nacional de Padronização e Classificação de Pêssegos e Nectarinas, 2004, Bento Gonçalves**. Palestras do Encontro Nacional de Padronização e Classificação de Pêssegos e Nectarinas. Bento Gonçalves : Embrapa Uva e Vinho.
- MARTINEAU, B., SUMMERFELT., K.R., ADAMS, D.F., DEVERNA, J.W., 1995. Production of high solids tomatoes through molecular modification of levels of the plant growth regulator cytokinin. **Biotechnology**, 13, 250-254.

- MATHOOKO, F.M., 1996. Regulation of ethylene biosynthesis in higher plants by carbon dioxide. **Postharvest Biol. Technol.**, 7, 1-26.
- MATTON, D.P., CONSTABLE, P. AND BRISSON, N., 1990. Alcohol dehydrogenase gene expression in potato following elicitor and stress treatment. **Plant Mol. Biol.**, 14, 775-83.
- MATTHEIS, J.P., FELLMAN, J.K., 1999 Preharvest factors influencing flavor of fresh fruit and vegetables. **Postharvest Biol. Technol.**, 15 227–232.
- MCCABE, M.S., GARRATT, L.C., SCHEPERS, F., JORDI, W.J.R.M., STOOPEN, G.M., DAVELAR, E., VAN RHIJN, J. H. A., POWER, J. B., DAVEY, M. R., 2001. Effects of PSAG12-IPT gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. **Plant Physiol.**, 127, 505-516.
- McGLASSON, W.B. Ethylene and fruit ripening. **HortScience**, v. 20, n.1, p.51-54, 1985.
- MCKEON, T. A., FERNANDEZ-MACULET, J. C. AND YANG, S. F., 1995. "Biosynthesis and metabolism of ethylene". *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. **Dordrecht: Kluwer.**, pp. 118-139.
- MILLER, T.W., FELLMAN, J.K., MATTHEIS, J.P., MATTINSON, D.S., 1998. Factors that influence volatile ester biosynthesis in 'Delicious' apples. **Acta Hort.** 464, 195–200.
- MINK, G.I., 1973. The apple industry in Japan. **HortScience**, 8, 81–86.
- MOURA, C. F. H., ALVES, R. E. PAIVA, J. R., ALMEIDA, A. DA S., FIGUEIREDO, R., W., 2004. Características físico-químicas de frutos verdes e maduros de clones de aceroleira (*Malpighia emarginata*). **Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture**, 47, 96-98.
- MPELASOKA, B.S. & BEHBOUDIAN, M.H., 2002. Production of aroma volatiles in response to deficit irrigation and to crop load in relation to fruit maturity for 'Braeburn' apple. **Postharvest Biol. Technol.**, 24, 1–11.
- NOWACKI, J. & PLICH, H., 1984. Changes of free methionine and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid contents in ripening apple fruits in relation to the rate of ethylene production. **Scientia Horticulturae**, 22, 75-80.
- OELLER, P.W., WONG, L.M., TAYLOR, L.P., PIKE, D.A., THEOLOGIS, A. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. **Science** 254, 437–439, 1991.
- PAILLARD, N. M., 1990. The flavour of apples, Pears and Quinces. **In: MORTON, I. D. & MacLEOD, A. J. The flavours of fruits. New York. Elsevier Inc.**, 1-42.
- PECH J.C., BALAGUE, C., LATCHE A., BOUZAYEN, M., 1994. Postharvest physiology of climacteric fruits : recent developments in the biosynthesis and action of ethylene. **Sci. Alim.**, 14, 3-15.
- PENROSE, D. M., GLICK, B.R., 1997. Enzymes that regulate ethylene levels. **Indian J. Exp. Biol.**, 35, 1-17.
- PERES, L.E.P., 2002. As bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*: um conhecimento útil para o desenvolvimento de protocolos biotecnológicos. **Revista Biotecnol. Ciênc. Desenvolv.**, 25, 44-48.
- PEREZ, A.G., OLIAS, R., SANZ, C., OLIAS, J.M., 1996. Furanones in strawberries: evolution during ripening and postharvest shelf life. **J. Agric. Food Chem.**, 44, 3620-3624.
- PEREZ, A.G., SANZ, C., RIOS, J.J., OLIAS, J.M., 1993. Estudio comparativo de los perfiles aromáticos de manzana, plátano y fresa. **Rev. Española . Cien. Tecnol. Aliment.** 33, 665-677.
- PETERS, J.S. & FRENKEL, C., 2004. Relationship between alcohol dehydrogenase activity and low-temperature in two maize genotypes, Silverado F1 and Adh1-Adh2-doubly null. **Plant Physiol. Biochem.**, 42, 841-846.

- PHAN, C.T., 1975. Occurrence of active chloroplasts in the internal tissue of apple. Their possible role in fruit maturation. **In: Facteurs et Régulation de la Maturation des Fruits, 1974 Paris: Colloques internationaux du Centre National de la Recherche Scientifique**, 238, 49-56.
- PICHERSKY, E. AND GANG, D.R., 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. **Trends Plant Sci.** 5, 439-445.
- PICTON, S., GRAY J., BARTON, S., ABUBAKAR, U., LOWE, A., GRIERSON, D., 1993. cDNA cloning and characterisation of novel ripening-related mRNAs with altered patterns of accumulation in the ripening inhibitor (*rin*) tomato ripening mutant. **Plant Mol. Biol.** 23:193-207.
- PLICH, H., 1989. The rate of ethylene production as related to 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid formation and ethylene-forming enzyme activity in ripening apples. **Fruit Science Reports**, 16, 141-154.
- PRATT, H.K., 1975. The role of ethylene in fruit ripening. **In: Facteurs et Régulation de la Maturation des Fruits, 1974, Paris: Colloques internationaux du Centre National de la Recherche Scientifique**, 238, 153-160.
- RANDLE, W., 1997. Onion flavor chemistry and factors influencing flavor intensity. In: Risch, S. J., Ho, C.T. (Eds.), Spices: Flavor Chemistry and Antioxidant Properties. **In: ACS Symposium Series**, vol. 660. ACS Press, Washington, DC, pp. 41–52.
- RIETH, S., SEIBERT, E., CASALI, M. E., LEÃO, M. L., CORRENT, A. R., BENDER, R. J. . Avaliação pêssegos da cv. Marli produzidos nos sistemas de produção integrada e convencional.. **In: XVIII Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2004, Florianópolis. Resumos do XVIII CBF, 2004.**
- ROMANI, R., LABAVITCH, J., YAMASHITA, T., HESS, B., RAE, H., 1983. Preharvest AVG treatment of 'Bartlett' pear fruits: effects on ripening, color change, and volatiles. **J. Am. Soc. Hort. Sci.**, Alexandria, 108, 1046-1049.
- ROMBALDI, C. Potencial de conservação e qualidade de frutas: aspectos biotecnológicos de pré e pós-colheita. **In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2006, Cabo Frio-RJ, Brasil: Palestras do Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2006.**
- ROMBALDI, C. V., FACHINELLO, J.C., TIBOLA, C. S., SILVA, J.A. Percepção do consumidor do RS quanto aos atributos de qualidade de frutos e hortaliças. **Ver. Brasil. Frutic.** 2007. (prelo).
- ROMBALDI, C. V., CHAVES, A. L. S., SILVA, J. A., LEMOS, M. R., AYUB, R., BALAGUÉ, C., PECH, J.-C., 1996. Expressão da enzima ácido 1-carboxílico-1-aminopropano oxidase em tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) cv. Kadá. **Rev. Brasil. Agrociênc.** 2, 5-10.
- SALTVEIT, J.M.E., 1993. Internal carbon dioxide and ethylene levels in ripening tomato fruits attached to or detached from the plant. **Physiol. Plantarum**, 89, 204-210.
- SARAVANAN, R.S. E ROSE, J.K.C., 2004. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. **Proteomics**, 4, 2522-2532.
- SARRY, J.E., SOMMERER, N., SAUVAGE, F.X., BERGOIN, A., ROSSIGNOL, M., ALBAGNAC, G., ROMIEU, C., 2004. Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp. **Proteomics**, 4, 201-215.
- SCHENA, M., SHALON, D., DAVIS, R.W., BROWN, P.O., 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, 270, 467-470.
- SHALIT, M., GUTERMAN, I., VOLPIN, H., BAR, E., TAMARI, T., MENDEL, N., ADAM, Z., ZAMIR, D., VAINSTEIN, A., WEISS, D., PICHERSKY, E. AND LEWINSOHN, E., 2003. Volatile ester formation in roses. Identification of an acetyl-coenzyme A

- geraniol/citronellol acetyl transferase in developing rose petals. **Plant Physiol.**, 131, 1868-1876.
- SILHAVY, D., BURGYAN, J., 2004. Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. **Trends Plant Sci.** 9, 76.
- SILVA, J.A., DA COSTA, T.S., LUCCHETTA, L., MARINI, L.J., ZANUZO, M.R., NORA, L., NORA, F.R., TWYMAN, R.M., ROMBALDI, C.V., 2004 Characterization of ripening behavior in transgenic melons expressing an antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene from apple. **Postharvest Biol. Technol.**, 32, 263–268.
- SILVA, J.A. **Caracterização bioquímico-molecular e inibição da síntese da ACC oxidase em frutos climatéricos.** Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2000. 128p. (Tese, Doutorado em Biotecnologia).
- SMITH, C.J.S., WATSON, C.F., MORRIS, P.C., BIRD, C.R., SEYMOUR, G.B., GRAY, J.E., ARNOLD, C., TUCKER, G.A., SCHUCH, W., HARDING, S., 1990 Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. **Plant Mol. Biol.**, 14, 369–379.
- SMOGYI, L.P., CHILDERS, N.F., CHANG, S.S., 1964. Volatile constituents of apple fruits as influenced by fertilizer treatments. **Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.**, 84, 51–58.
- SOLANO, R. & ECKER, J.R., 1998. Ethylene gas: perception, signaling and response. **Current Opinion in Plant Biol.**, 1, 393-398.
- SONG, J. & BANGERTH, F., 1996 The effect of harvest date on aroma compound production from 'Golden Delicious' apple fruit and relationship to respiration and ethylene production. **Postharvest Biol. Technol.**, 8, 259-269.
- SOULEYRE, E.J.F., GREENWOOD D.R., FRIEL, E.N., KARUNAIRETNAM, S., AND NEWCOMB, R.D., 2005 An alcohol acyl transferase from apple (cv Royal Gala), MpAAT1, produces esters involved in apple fruit flavor. **FEBS J.** 272, 3132-3144.
- SOUSA, V. F. DE, RODRIGUEZ, B. H. N., ATHAYDE SOBRINHO, C., COELHO, E. F., VIANA, F. M. P., SILVA, P. H. S., 1999. Cultivo do meloeiro sob fertirrigação por gotejamento no meio norte do Brasil. (**Embrapa Meio-Norte. Circular Técnica, 21**). Teresina: Embrapa Meio-Norte, 68p.
- SPEIRS, J., LEE, E., HOLT, K., YONK-DUK, K., STEELE SCOTT, N., LOVEYS, B. AND SCHUCH, W., 1998. Genetic manipulation of alcohol dehydrogenase levels in ripening tomato fruit affects the balance of some flavor aldehydes and alcohols. **Plant Physiol.** 117, 1047-1058.
- STEVENS, M.A., KADER, A.A., ALBRIGHT-HOLTON, M., 1977. Intercultivar variation in composition of locular and pericarp portions of fresh market tomatoes. **J. Am. Soc. Hort. Sci.**, 102, 689-692.
- SUNAKO, T., SAKURABA, W., SENDA, M., AKADA, S., ISHIKAWA, R., NIIZEKI, M., HARADA, T., 1999 An allele of the ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene (ACS1) in apple fruit with a long storage life. **Plant Physiol.**, 119, 1297-1303.
- SZUTOWIZ, A. & BIELARCZYK, H., 1987. Elimination of CoA-SH interference from Acetyl-CoA cycling assay by maleic anhydride. **Analytical Biochem.**, 164, 292-296.
- TAKAHASHI, N. **Chemistry of Plant Hormones.** Boca Raton: CRC Press., Florida, 1986. 274p.
- TAKEI, K., SAKAKIBARA, H., SUGYAMA, T., 2001 Identification of genes encoding adenylate isopentenyl-transferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. **J. of Biolog. Chem.**, 276, 26405–26410.
- TESNIÈRE, C. & VERRIÈS, C., 2000. Molecular cloning and expression of cDNAs encoding alcohol dehydrogenases from *Vitis vinifera* L. during berry development. **Plant Sc.** 157, 77-88.

- THEOLOGIS, A., 1992. One rotten apple spoils the whole bushel: the role of ethylene in fruit ripening. **Cell**, 70, 181-141.
- TIAN, M. S., DAVIES, L., DOWNS, C. G., LIU, X. F., LILL, R. E., 1995. Effects of floret maturity, cytokinins and ethylene on broccoli yellowing after harvest. **Postharvest Biol. Technol.**, 6, 29-40.
- TIEMAN, D.M., TAYLOR, M.G., CIARDI, J.A., KLEE, H.J., 2000. The tomato ethylene receptors NR and LeETR4 are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 97, 5663-5668.
- TIEMAN, D.M. & KLEE, H.J., 1999. Differential expression of two novel members of the tomato ethylene-receptor family. **Plant Physiol.**, 120, 165-172.
- TREBITSH, T., GOLDSCHMIDT, E.E., RIOV, J., 1993. Ethylene induces de novo synthesis of chlorophyllase, a chlorophyll degrading enzyme, in *Citrus* fruit peel. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 90, 9441-9445.
- TSUCHIYA, T., OHTA, H., OKAWA, K., IWAMATSU, A., SHIMADA, H., MASUDA, T., TAKAMIYA, K., 1999. Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 96, 15362-15367.
- UEDA, Y., FUJICHITA, N., CHACHIN, K., 1997. Presence of alcohol acetyltransferase in melons. **Postharvest Biol. Technol.**, 10, 121-126.
- VAN DER STRAETEN, D., RODRIGUES POUSSADA, R. A., GIELEN, J., AND VAN MONTAGU, M., 1991. Tomato alcohol dehydrogenase. Expression during fruit ripening and under hypoxic conditions. **FEBS Lettres.**, 295, 39-42.
- VAN DER STRAETEN, D., VAN WIEMEERSCH, L., GOODMAN, H.M. & VAN MONTAGU, M., 1990. Cloning and sequence of two different cDNAs encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, 87, 4859-4863.
- VERVERIDIS, P. & JOHN, P., 1991. Complete recovery *in vitro* of ethylene-forming enzyme activity. **Phytochemistry**, 30, 725-727.
- WANG, W., HALL, A.E., O'MALLEY, R., BLEECKER, A.B., 2003. Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis* is not required for signal transmission. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, 100, 352-357.
- WANG, K.L., LI C.H., ECKER, J.R., 2002. Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. **Plant Cell**, S131-S151.
- WANG, Y., WYLLIE, S.G., LEACH, D.N., 1996. Chemical changes during the development and ripening of the fruit *Cucumis melo*. **J. Agric. Food Chem.**, 44, 210-216.
- WURR, D.C.E., HAMBIGDE, A.J., FELLOWS, J.R., LYNN, J.R., PINK, D.A.C., 2002. The influence of water stress during crop growth on the postharvest quality of broccoli. **Postharvest Biol. Technol.**, 25, 193-198.
- XIE, C., ZHANG, Z.G., ZHANG, J.S., HE, X.J., CAO, W.H., HE, S.J. ET CHEN, S.Y., 2002. Spatial expression and characterization of a putative ethylene receptor protein NTHK1 in tobacco. **Plant Cell Physiol.**, 43, 810-815.
- YAHYAOU, F. E. L., WONGS-AREE, C., LATCHÉ, A., HACKETT, R., GRIERSON, D., PECH, J-C., 2002. Molecular and biochemical characteristics of a gene encoding an alcohol acyl transferase involved in the generation of aroma volatile esters during melon ripening. **European Journal of Biochemistry/FEBS**, 269, 2359-2366.
- YAMAUCHI, N., AKIYAMA, Y., KAKO, S., HASHINAGA, F., 1997. Chlorophyll degradation in Wase satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruit with on-tree maturation and ethylene treatment. **Scientia Horticulturae**, 71, 35-42.

- YANG, S.F., 1987. The role of ethylene and ethylene synthesis in fruit ripening. In: THOMSON, W.W., NOTHNAGEL, E.A., HUFFAKER, R.C. (ed.) **Plant Senescence: its Biochemistry and Physiology**, Rockville: ASPP.
- YANG, S.F., 1985. Biosynthesis and action of ethylene. **HortScience**, 20, 41-45.
- YANG, S.F. & HOFFMAN, N. E., 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annual review of Plant physiol.**, 35, 155-189.
- YANG, S.F., 1975. Ethylene biosynthesis in fruit tissues. In: **Facteurs et Régulation de la Maturation des Fruits, 1974, Paris: Colloques internationaux du Centre National de la Recherche Scientifique**, 238. 171-175.
- YOSHIMOTO, H., FUJIWARA, D., MOMMA, T., TANAKA, K., SONE, H., NAGASAWA, N. AND TAMAI, Y., 1999. Isolation and characterization of the ATF2 gene encoding alcohol acyltransferase II in the bottom fermenting yeast *Saccharomyces pastorius*. **Yeast** 15: 409-417.
- YOUNG, J.C., CHU, C.L., LU, X., ZHU, H., 2004. Ester variability in apple varieties as determined by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, 52, 8086–8093.
- ZABETAKIS, I. & HOLDEN, M.A., 1997. Strawberry flavour: analysis and biosynthesis. **J. Sci. Food Agric.**, 74, 421-434.
- ZAICOVSKI, C.B., PEGORARO, C., FERRAREZE, J.P., LUND, D.G. SILVA, J.A., ROMBALDI, C.V., 2007. Effects of watering during growth on cytokinin synthesis and postharvest quality of broccoliflorets. **Postharvest Biol. Technol.**, in press.
- ZEGZOUTI, H., MARTY, C., JONES, B., BOUQUIN, T., LATCHE, A., PECH, J-C., BOUZAYEN, M., 1997. Improved screening of cDNAs generated by mRNA Differential Display enables the selection of true positives and the isolation of weakly expressed messages. **Plant Mol. Biol.** 15, 236-245.