



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

CLESIVAN PEREIRA DOS SANTOS

**TRANSCRIPTOMA DE FRUTOS DE ACEROLA DURANTE O
AMADURECIMENTO: UMA VISÃO DA REGULAÇÃO GÊNICA DO
METABOLISMO DO ASCORBATO, ETILENO, RESPIRAÇÃO E FIRMEZA**

FORTALEZA

2018

CLESIVAN PEREIRA DOS SANTOS

TRANSCRIPTOMA DE FRUTOS DE ACEROLA DURANTE O AMADURECIMENTO:
UMA VISÃO DA REGULAÇÃO GÊNICA DO METABOLISMO DO ASCORBATO,
ETILENO, RESPIRAÇÃO E FIRMEZA

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

Orientador: Prof. Dr. José Hélio Costa.

FORTALEZA

2018

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

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

S234t Santos, Clesivan Pereira dos.

Transcriptoma de frutos de acerola durante o amadurecimento: uma visão da regulação gênica do metabolismo do ascorbato, etileno, respiração e firmeza / Clesivan Pereira dos Santos. – 2018.

153 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. José Hélio Costa.

1. Amadurecimento. 2. ascorbato. 3. etileno. 4. Malpighia emarginata. 5. respiração. I. Título.

CDD 572

CLESIVAN PEREIRA DOS SANTOS

TRANSCRIPTOMA DE FRUTOS DE ACEROLA DURANTE O AMADURECIMENTO:
UMA VISÃO DA REGULAÇÃO GÊNICA DO METABOLISMO DO ASCORBATO,
ETILENO, RESPIRAÇÃO E FIRMEZA

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

Aprovada em: 20/07/2018

BANCA EXAMINADORA

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

Prof.^a Dr.^a Maria Raquel Alcântara de Miranda
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Murilo Siqueira Alves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Bruno Lopes de Sousa
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dr. Fabrício Eulálio Leite Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha família por todo amor, apoio e estímulo aos estudos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder saúde e coragem todos os dias, e tornar possível a conclusão do Doutorado;

À minha família, acima de tudo, pelo amor incondicional e pelo apoio em todas as conquistas da minha vida acadêmica e pessoal;

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Hélio Costa, pela oportunidade, disponibilidade, apoio e ensinamentos;

Ao Dr. Kirley Marques Canuto, por disponibilizar o Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais e auxílio na realização da quantificação do conteúdo de metabólitos;

Ao Dr. Carlos Farley Herbster Moura, por disponibilizar o clone de aceroleira BRS 235 para esta pesquisa, bem como por todo o incentivo, sua sempre disponibilidade e valiosas contribuições aos experimentos de campo;

Aos membros da banca de Defesa, Prof. Dr. Bruno Lopes de Sousa, Dr. Fabrício Eulálio Leite Carvalho, Prof. Dr. Murilo Siqueira Alves e Prof^ª. Dr^ª. Maria Raquel Alcântara Miranda por aceitarem participar da banca e pelas valiosas contribuições ao trabalho;

Ao Mathias Coelho Batista, pela sua simplicidade e indispensável ajuda na parte de programação durante a etapa de análises dos dados RNA-seq;

Ao Antônio Edson Rocha Oliveira, por compartilhar seus novos aprendizados na área de Bionformática e sempre estar disponível para colaborar;

À Kátia Daniella da Cruz Saraiva, pela sua ajuda, incentivo, ensinamentos e momentos de descontração durante essa jornada;

A todos os colegas do Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática, (André, Antônio Netto, Beatriz, Camila, Fernanda, Georgia, Joanna, Karine, Lyndefânia, Michelle, Moacíria, Raquel e Thais), por todo o aprendizado adquirido, incentivo à pesquisa, momentos de lazer e alegrias proporcionadas, indispensáveis para o meu crescimento acadêmico e pessoal;

Aos integrantes do Laboratório de Fisiologia Vegetal – LabFive (Cibele, Daniel, Giedre, Paulo André, Stelamaris e Rafael) pelo apoio e incentivo ao longo do período de doutoramento;

À todos da fazenda experimental da Embrapa, em Pacajus, em especial ao Justino, pelo acolhimento, simplicidade e suporte no período da realização dos experimentos de campo;

À todos os professores e alunos do Curso de Pós graduação em Bioquímica pelos momentos de aprendizado e discussão;

À Universidade Federal do Ceará, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, e ao Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática, pelas valiosas contribuições às atividades de ensino e pesquisa na área de Bioquímica e Biologia Molecular de Plantas, bem como por todo o suporte conferido a esta pesquisa;

À Embrapa Agroindústria Tropical, pela conceção do clone de aceroleira BRS 235 (Apodi) à esta pesquisa, bem como por todo o suporte (estrutura e transporte) disponibilizado para a realização dos experimentos de campo e das análises de metabólitos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo e da taxa de bancada, que tornou possível o sequenciamento do mRNA (RNA-seq) e a compra de reagentes para as análises de metabólitos;

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade (INCT-Sal), especialmente pela compra do computador para o Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática, tornando possível a realização das análises de bioinformática

À todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização desta pesquisa.

“Não existiria evolução sem adversidades,
nem crescimento sem persistência”.

(Autor desconhecido)

RESUMO

O presente trabalho objetivou determinar o perfil transcriptômico de frutos de aceroleira confrontando-o à dinâmica metabólica do ascorbato, etileno, CO₂ e firmeza durante o amadurecimento. Para tanto, RNAs mensageiros totais de frutos em três estádios de desenvolvimento (verde, intermediário e maduro) foram sequenciados e os perfis de ascorbato, etileno, CO₂ e firmeza mensurados na tentativa de identificar genes candidatos à regulação desses processos. Em adição, os transcriptomas de folhas e flores foram analisados para compreender a regulação do AAs em outros órgãos. Os resultados da análise de expressão revelaram 4.326 transcritos diferencialmente expressos (TDEs) durante o amadurecimento. Notavelmente, o acúmulo de AAs reduzido em frutos verdes foi associado a maior abundância de transcritos da fosfomanomutase, GDP-manose pirofosforilase 1, 2 e 3, GDP-manose epimerase 1 e 2, GDP-L-galactose transferase 1 e 2 codificando para a biossíntese (via da L-galactose), vários do transportador nucleobase-ascorbato para translocação e da monodesidroascorbato reductase 2 e desidroascorbato reductase 1 para reciclagem. A acentuada depleção do conteúdo de AAs durante o amadurecimento pôde ser explicada pela regulação negativa de transcritos envolvidos nos processos de biossíntese, translocação e reciclagem, e positiva de ascorbato peroxidase 2 e ascorbato oxidase 2 e 3 da degradação. Em flores e folhas, a regulação negativa dos transcritos da via da L-galactose sugeriu menor taxa de biossíntese, enquanto o grande número de membros da ascorbato peroxidase e ascorbato oxidase regulados positivamente foi consistente com a alta quantidade de desidroascorbato verificada em flores e moderada em folhas. A respeito do etileno e CO₂, seus conteúdos declinaram durante o amadurecimento. A regulação positiva de transcritos da ACC sintase 2 e negativa dos receptores do etileno 1 e 2 em frutos no estádio intermediário sugeriu maior sensibilidade ao etileno. Enquanto, a maior abundância dos transcritos da ACS sintase 1 e 2, ACC oxidase 2 e de vários fatores de resposta ao etileno, em frutos maduros, indicou a ocorrência de regulação pós-transcricional/traducional da biossíntese de etileno. Simultaneamente, a maior taxa respiratória de frutos verdes corroborou com a maior abundância de transcritos codificando para algumas etapas da via glicolítica, várias subunidades dos complexos I, II e IV da CTE e ATP sintases. Entretanto, em frutos maduros, verificou-se a regulação positiva de outros membros das vias glicolítica, complexo piruvato desidrogenase, via das pentoses fosfato, NAD(P)H desidrogenase externa, oxidase alternativa, bem como a regulação negativa de succinato desidrogenase e isocitrato desidrogenase do ciclo de Krebs. Tais resultados sugeriram uma maior atividade das vias não fosforilativas

como estratégia potencialmente eficiente de flexibilizar as demandas energéticas e biossintéticas após o estágio intermediário. A firmeza dos frutos reduziu drasticamente durante o amadurecimento e foi relacionada com a expressão aumentada de pelo menos 54 transcritos codificando proteínas/enzimas responsáveis pela degradação/biossíntese da pectina, hemicelulose e celulose. Em suma, este estudo reflete a identificação de vários genes com potencial aplicabilidade na melhoria da qualidade da acerola e fornece uma vasta quantidade de informações para investigações futuras dedicadas à melhor compreensão dessas e outras particularidades do amadurecimento da acerola.

Palavras-chave: Amadurecimento. ascorbato. etileno. *Malpighia emarginata*. respiração.

ABSTRACT

The present work aimed to determine the transcriptomic profile of acerola fruits, confronting it with the metabolic dynamics of ascorbate, ethylene, CO₂ and firmness during ripening. To that end, total messenger RNAs of fruits in three developmental stages (unripe, intermediate and ripe) were sequenced, and the ascorbate, ethylene, CO₂ and firmness profiles were measured in an attempt to identify candidate genes for the regulation of these processes. In addition, leaves and flowers transcriptomes were analyzed to understand the regulation of AsA in other organs. The expression analysis results revealed 4326 differentially expressed transcripts (DETs) during ripening. Notably, the accumulation of reduced AsA in unripe fruit was associated with greater abundance of transcripts encoding phosphomannomutase, GDP-mannose pyrophosphorylase 1, 2 and 3, GDP-mannose epimerase 1 and 2, GDP L-galactose transferase 1 and 2 for biosynthesis (L-galactose pathway), several other of the nucleobase-ascorbate transporter family, monodehydroascorbate reductase 2 and dehydroascorbate reductase 1 for the translocation and recycling processes. The sharp depletion in the AsA content during ripening could be explained by the downregulation of transcripts involved in the biosynthesis, translocation and recycling processes, and the upregulation of ascorbate peroxidase 2 and ascorbate oxidase 2 and 3 involved in the degradation. In flowers and leaves, the downregulation of the L-galactose pathway transcripts suggested a lower biosynthetic rate, while greater number of ascorbate peroxidase and ascorbate oxidase members upregulated at such organs were consistent with the higher amount of dehydroascorbate found in flowers and moderate in leaves. Regarding ethylene and CO₂, their contents declined during maturation. The upregulation of ACC synthase 2 transcripts and downregulation of the ethylene receptors 1 and 2 in fruits in the intermediate stage suggested a higher sensitivity to ethylene. While the higher abundance of ACS synthase 1 and 2 transcripts, ACC oxidase 2 and several ethylene response factors in ripe fruit, indicated the occurrence of post-transcriptional/translational regulation of the ethylene biosynthesis. Simultaneously, the higher respiratory rate of unripe fruit corroborated with the upregulation of transcripts coding for some steps of the glycolytic pathway, several subunits of the complexes I, II and IV of the CTE and ATP synthases. However, in ripe fruit, the positive regulation of other members of the glycolytic pathway, pyruvate dehydrogenase complex, phosphate pentoses pathway, external NAD (P) H dehydrogenase, alternative oxidase, and the negative regulation of succinate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase of the Krebs cycle were verified. These results suggested enhanced activity of the nonphosphoryllative pathways as a

potentially efficient strategy to flexibilize the energetic and biosynthetic demands after the intermediate stage. The fruit firmness reduced dramatically during ripening and could be associated to the increase in expression of at least 54 transcripts encoding proteins/enzymes responsible for the degradation/biosynthesis of pectin, hemicellulose and cellulose. Overall, this study reflects the identification of several genes with potential applicability in the improvement of acerola quality and provides a vast amount of information for future investigations dedicated to a better understanding of these and other peculiarities of acerola ripening.

Keywords: Ascorbate. ethylene. *Malpighia emarginata*. respiration. ripening.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Esquema de vias metabólicas envolvidas na regulação do ascorbato em plantas..... 36
- Figura 2 – Amostras de folhas, flores e frutos de aceroleira nos estádios verde (12 DAA), intermediário (16 DAA) e maduro (20 DAA) usadas para o sequenciamento de RNA..... 49
- Figura 3 – Mensuração da firmeza (A), etileno (B) e dióxido de carbono (C) da acerola nos estádios verde (12 DAA), intermediário (16 DAA) e maduro (20 DAA). Letras diferentes destacam a sigficância estatística ($P < 0,05$) entre os estádios de desenvolvimento dos frutos..... 60
- Figura 4 – Variação nas concentrações de ácido ascórbico reduzido e oxidado (desidroascorbato) da acerola nos estádios verde (12 DAA), intermediário (16 DAA) e maduro (20 DAA), folhas e flores..... 61
- Figura 5 – Integridade das subunidades 18S e 28S do RNA ribossômico extraído de frutos em três estádios de desenvolvimento verde (12 DAA), intermediário (16 DAA) e maduro (20 DAA), folhas e flores de aceroleira obtidos através do *Bioanalyzer 2100*..... 63
- Figura 6 – Qualidade do sequenciamento das bibliotecas de cDNA após a filtragem das sequências de adaptadores e das bases de baixa qualidade. Os gráficos abaixo mostram a qualidade do sequencimento para a amostra de flor: (A) representa o *phred score* médio por base ao longo da leitura, (B) indica a distribuição do tamanho das leituras..... 67
- Figura 7 – Diagrama de *Venn* mostrando o número de transcritos totais anotados, comuns e distintos para os bancos de dados Nr-NCBI, Swiss-Prot e KEGG..... 70
- Figura 8 – Distribuição das 30 espécies com os melhores resultados estatísticos (BLASTx) para o transcriptoma da aceroleira..... 71
- Figura 9 – Análise de componentes principais (ACP 1 e 2) das bibliotecas de frutos nos estádios verde, intermediário e maduro, e folhas em

	duplicatas, bem como para uma biblioteca de flores.....	72
Figura 10 –	Diagrama de Venn com a distribuição de transcritos diferencialmente expressos totais, comuns e exclusivos entre as comparações: frutos intermediários (16 DAA) versus verdes (12 DAA), maduros (20 DAA) versus verdes (12 DAA) e maduros (20 DAA) versus intermediários (16 DAA).....	73
Figura 11 –	Categorização funcional dos transcritos diferencialmente expressos de acordo com o componente celular (CC), processo biológico (PB) e função molecular (FM) para as comparações: (A) frutos maduros versus verdes, (B) intermediários versus verdes e (C) maduros versus intermediários.....	75
Figura 12 –	Confirmação por RT-qPCR da estabilidade de expressão (valor de M) (A) e da variação par a par (B) de nove genes candidatos.....	99
Figura 13 –	Correlação de Pearson (r) dos valores de log_2FC gerados através da análises de RNA-seq e RT-qPCR para 18 genes.....	100
Figura 14 –	Perfil molecular e metabólico da acerola no estágio verde (A). Perfil molecular e metabólico da acerola nos estádios intermediário e maduro (B).....	122 e 124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Sequência dos iniciadores, temperatura ótima de anelamento (TA), tamanho do <i>amplicon</i> em pares de bases (pb) e anotação de cada gene...	56
Tabela 2	- Concentração e integridade do RNA total, concentração e tamanho dos fragmentos em pares de bases das nove bibliotecas de cDNA construídas.....	63
Tabela 3	- Profundidade e qualidade do sequenciamento (RNA-seq) das bibliotecas de frutos, folhas e flores de aceroleira.....	67
Tabela 4	- Número de transcritos gênicos, isoformas e estatísticas geradas após a montagem dos transcriptomas de frutos nos três estádios de desenvolvimento (separados e juntos), folhas, flores de aceroleira, transcriptoma de referência (todas as amostras) e não redundante de referência.....	69
Tabela 5	- Número de transcritos diferencialmente expressos entre as comparações	74
Tabela 6	- As 50 vias metabólicas mais representadas durante o amadurecimento da acerola, de acordo com a Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG). Nas colunas nomeadas “ <i>up</i> ” (regulados positivamente) ou “ <i>down</i> ” (regulados negativamente) é apresentado o número de EC (do inglês, <i>Enzyme comission number</i>) atribuídos para cada via de acordo com o tipo de regulação.....	77
Tabela 7	- Lista de transcritos diferencialmente expressos codificando para as vias de biossíntese do ascorbato e suas respectivas atribuições ao KEGG. Transcritos considerados como diferencialmente expressos exibiram $\log_2 \text{fold change} \geq 1$ ou ≤ -1 e $\text{FDR} < 0,05$	80
Tabela 8	- Lista de transcritos diferencialmente expressos codificando para as vias de degradação, reciclagem e transporte do ascorbato e suas respectivas atribuições ao KEGG. Transcritos considerados como diferencialmente expressos exibiram $\log_2 \text{fold change} \geq 1$ ou ≤ -1 e $\text{FDR} < 0,05$	84
Tabela 9	- Lista de transcritos diferencialmente expressos codificando para a	

	biossíntese, percepção e transdução do etileno e suas respectivas atribuições ao KEGG. Transcritos considerados como diferencialmente expressos exibiram $\log_2 \text{fold change} \geq 1$ ou ≤ 1 e $\text{FDR} < 0,05$	87
Tabela 10	– Lista de transcritos diferencialmente expressos codificando para vias envolvidas na respiração de da acerola e suas respectivas atribuições ao KEGG. Transcritos considerados como diferencialmente expressos exibiram $\log_2 \text{fold change} \geq 1$ ou ≤ 1 e $\text{FDR} < 0,05$	90
Tabela 11	– Lista de transcritos diferencialmente expressos codificando para o metabolismo de açúcares durante o desenvolvimento dos da acerola e suas respectivas atribuições ao KEGG. Transcritos considerados como diferencialmente expressos exibiram $\log_2 \text{fold change} \geq 1$ ou ≤ 1 e $\text{FDR} < 0,05$	93
Tabela 12	– Lista de transcritos diferencialmente expressos codificando para proteínas/enzimas envolvidas no metabolismo da parede celular de da acerola e suas respectivas atribuições ao KEGG. Transcritos considerados como diferencialmente expressos exibiram $\log_2 \text{fold change} \geq 1$ ou ≤ 1 e $\text{FDR} < 0,05$	95

LISTA DE ABREVIATURAS

AAs	Ácido ascórbico
ACLY	<i>ATP-citrate lyase</i>
ACO	<i>1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase</i>
ACP	Análise de componente principal
ACS	<i>1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase</i>
AGP	<i>Alpha-glucan phosphorylase</i>
AGP-protein	<i>Protein arabinogalactan protein</i>
AmyA	<i>Alpha amylase</i>
AmyB	<i>Beta-amylase</i>
AO	<i>L-ascorbate oxidase</i>
AOX	<i>Alternative oxidase</i>
APX	<i>L-ascorbate peroxidase</i>
ARAT	<i>Arabinosyltransferase</i>
ATP	Adenosina trifosfato
B3GALT	<i>Beta-1,3-galactosyltransferase</i>
BGL	<i>Beta-glucosidase</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BWA	<i>Burrows-Wheeler Aligner</i>
cDDH2	<i>Dihydrolipoyl dehydrogenase</i>
cDNA	DNA complementar
CESY	<i>Cellulose synthase-like protein</i>
CG/EM	Cromatógrafo a Gás acoplado ao Espectrômetro de Massa

CLAE	Cromatógrafo à Líquido de Alta Eficiência
cm	Centímetro
CNR-SPL	<i>Colorless nonripening - squamosa promoter binding–like protein</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
COX	<i>Cytochrome c oxidase</i>
cpm	Contagem por milhão
C _t	<i>Cycle threshold</i>
CTR	<i>Constitutive triple response 1</i>
cwINV	<i>Cell wall invertase</i>
DAA	Dias após a antese
DHA	<i>Dehydroascorbate</i>
DHAR	<i>Dehydroascorbate reductase</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>Deoxynucleoside triphosphates</i>
EBF1-2	<i>EIN3-binding F-box protein 1-like</i>
EGL	<i>Endo-1,4-beta-glucanase</i>
EIN2	<i>Ethylene insensitive protein 2-like</i>
EIN3	<i>Ethylene insensitive protein 3-like</i>
ERF	<i>Ethylene-responsive transcription factor</i>
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERS	<i>Ethylene response sensor</i>
EST	<i>Expressed Sequence Tags</i>
ETR	<i>Ethylene receptor-like</i>
EXP	<i>Expansin</i>

FAD2	Dinucleótido de flavina e adenina
F-ATPase	<i>ATP synthase</i>
FBA3	<i>Fructose-bisphosphate aldolase 3</i>
F-box	<i>F-box family protein</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
g	Gramma
G6PDH	<i>Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase</i>
GAE	<i>UDP-glucuronate-4-epimerase</i>
GalA	D-galacturonato
GalDH	<i>L-galactose dehydrogenase</i>
GalLDH	<i>L-galactono-1,4- lactone dehydrogenase</i>
GalUR	<i>D-galacturonic acid reductase</i>
GAULT	<i>Galacturonosyltransferase</i>
GEG	<i>Glucan endo-1,3-beta-glucosidase</i>
GGP	<i>GDP-L-galactose pyrophosphorilase</i>
GLSY	<i>1,3-beta-glucan synthase component</i>
GME	<i>GDP-mannose-3',5'-epimerase</i>
GMP	<i>GDP-mannose pyrophosphorylase</i>
GulLO	<i>L-gulono-1,4-lactone oxidase</i>
h	Hora
IDH	<i>Isocitrate dehydrogenase</i>
KAAS	<i>KEGG Automatic Annotation Server</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
Kg	Kilograma

KO	<i>KEGG Orthology</i>
m	Metro
M	Mol
MAN	<i>Mannan endo-1,4-beta-mannosidase</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinases</i>
MDHAR	<i>Monodehydroascorbate reductase</i>
Merad50-ATPase	<i>DNA double-strand break repair protein</i>
MF	Massa fresca
mg	Microgramas
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	Minutos
MIOX	<i>Myo-inositol oxygenase</i>
MIPS	<i>L-myo-inositol 1-phosphate synthase</i>
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minutos
mm	Milímetro
mM	Milimol
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MST	<i>Monosaccharide-sensing protein</i>
N	Newton
NAD(P)H	(Fosfato) Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NAT	<i>Nucleobase-ascorbate transporter</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

NDH	<i>NADH dehydrogenase ou NADH-ubiquinone oxidoreductase</i>
NDH-FQR1	<i>NAD(P)H dehydrogenase (quinone) FQR1</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
nm	Nanômetro
NOB1	<i>RNA-binding NOB1-like protein</i>
NOR-NAC	<i>Nonripening-No Apical Meristem-domain transcription factor</i>
NUOB2	<i>Alternative NAD(P)H-ubiquinone oxidoreductase</i>
°C	Graus Celsius
OG	Ontologia gênica
ORF	<i>Open reading frame</i>
P	p-valor
PA-RNA	<i>Phosphorylated adapter RNA export-like protein</i>
Pb	pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDE	<i>phosphodiesterase</i>
PDHC	<i>pyruvate dehydrogenase complex component</i>
PDHE1	<i>Pyruvate dehydrogenase E1 component</i>
PFK	<i>ATP-dependent 6-phosphofructokinase</i>
PG	<i>Polygalacturonase</i>
PGAL	<i>Proline- glutamic acid/leucine-rich protein</i>
PGI	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>
PGM	<i>Phosphoglycerate mutase-like</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PK	<i>Pyruvate kinase</i>

PL	<i>Pectate lyase</i>
PME	<i>Pectinesterase</i>
PMEI	<i>Pectinesterase inhibitor</i>
PMI	<i>Mannose-6-phosphate isomerase</i>
PMM	<i>Phosphomannomutase</i>
R5PI	<i>Ribose-5-phosphate isomerase</i>
RBL	<i>Protein RBL-like</i>
RCC1	<i>Regulator of chromosome condensation</i>
Refseq-RNA	<i>Reference RNA sequence</i>
RIN	<i>RNA Integrity number</i>
RIN-MADS	<i>Ripening inhibitor MADS-box transcription factor</i>
RNA-seq	Sequenciamento de RNA
RT-qPCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da DNA polimerase quantitativa
s	Segundos
SDH	<i>Succinate dehydrogenase</i>
sINV	<i>Soluble invertase</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SPS	<i>Sucrose-phosphate synthase</i>
SS4	<i>Starch synthase 4</i>
SUC	<i>Sucrose carrier</i>
SWEET	<i>Bidirectional sugar transporter</i>
TAGL1	<i>Arlequin/tomato agamous-like 1</i>
TAIR	<i>The Arabidopsis Information Resource</i>

tAPX	<i>Thylakoid L-ascorbate peroxidase</i>
TDE	Transcrito diferencialmente expreso
TGD4	<i>Trigalactosyldiacylglycerol 4</i>
TSA	<i>Transcriptome Shotgun Assembly</i>
U	<i>Enzyme unit</i>
U3	<i>Small nucleolar RNA-associated protein</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
UXS	<i>UDP-glucuronic acid decarboxylase</i>
vINV	<i>Vacuolar invertase</i>
WAXY	<i>Granule-bound starch synthase</i>
XTH/XET	<i>Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase</i>
XXT	<i>Xyloglucan 6-xylosyltransferase</i>
XYD	<i>Beta-D-xylosidase</i>
XYN	<i>Endo-1,4-beta-xylanase</i>
µg/mL	Microgramas por mililitro
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
ρmol	Picomol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	29
2.1	Aspectos gerais da cultura de aceroleira.....	29
2.2	Características gerais e desenvolvimento do fruto.....	30
2.2.1	<i>O papel do etileno e da respiração no amadurecimento</i>	32
2.2.2	<i>Metabolismo do ácido L-ascórbico</i>	35
2.2.3	<i>Metabolismo da parede celular</i>	40
2.3	Genômica funcional: abordagem transcriptômica.....	43
3	HIPÓTESE.....	46
4	OBJETIVOS.....	47
4.1	Objetivo Geral.....	47
4.2	Objetivos Específicos.....	47
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	48
5.1	Material vegetal.....	48
5.2	Determinação da firmeza dos frutos.....	49
5.3	Quantificação do etileno e dióxido de carbono (CO ₂).....	49
5.4	Extração e quantificação do ácido ascórbico.....	50
5.5	Análise transcriptômica (RNA-seq).....	50
5.5.1	<i>Extração e análise do RNA total</i>	50
5.5.2	<i>Construção das bibliotecas de cDNA e sequenciamento</i>	51
5.5.3	<i>Processamento das reads brutas e montagem de novo</i>	52
5.5.4	<i>Anotação dos transcritos</i>	53
5.5.5	<i>Identificação dos transcritos diferencialmente expressos (TDEs)</i>	53
5.5.6	<i>Anotação funcional dos transcritos diferencialmente expressos (TDEs)</i>	54

5.6	Validação dos dados de RNA-seq por RT-qPCR.....	54
5.6.1	<i>Seleção dos genes para a validação e o desenho dos iniciadores.....</i>	54
5.6.2	<i>Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase quantitativo (RT-qPCR).....</i>	58
5.6.3	<i>Análise dos dados de expressão por qPCR.....</i>	58
5.7	Análise estatística.....	59
6	RESULTADOS.....	60
6.1	Alterações na firmeza e nos perfis de etileno e dióxido de carbono (CO₂) dos frutos.....	60
6.2	Dinâmica do conteúdo de ascorbato em frutos, folhas e flores.....	61
6.3	Transcriptomas de frutos, folhas e flores de aceroleira, com ênfase na modulação do amadurecimento.....	62
6.3.1	<i>Avaliação da qualidade do RNA total e das bibliotecas de cDNA construídas.....</i>	62
6.3.2	<i>Processamento das leituras brutas.....</i>	66
6.3.3	<i>Montagem de novo dos transcriptomas.....</i>	68
6.3.4	<i>Anotação dos transcritos.....</i>	69
6.3.5	<i>Inferência dos transcritos diferencialmente expressos – TDEs.....</i>	71
6.3.6	<i>Anotação funcional dos transcritos diferencialmente expressos.....</i>	74
6.3.7	<i>Transcritos diferencialmente expressos envolvidos na regulação do metabolismo do ascorbato.....</i>	79
6.3.8	<i>Transcritos diferencialmente expressos envolvidos na regulação do metabolismo do etileno durante o amadurecimento da acerola.....</i>	86
6.3.9	<i>Transcritos diferencialmente expressos envolvidos na regulação da respiração durante o amadurecimento da acerola.....</i>	89
6.3.10	<i>Transcritos diferencialmente expressos envolvidos na regulação do acúmulo de amido e de açúcares durante o desenvolvimento da acerola.....</i>	92
6.3.11	<i>Transcritos diferencialmente expressos envolvidos na regulação da firmeza da acerola durante o amadurecimento.....</i>	94

6.4	Validação dos dados de RNA-seq por RT-qPCR.....	98
6.4.1	<i>Confirmação da qualidade dos iniciadores e da estabilidade dos genes.....</i>	98
6.4.2	<i>Validação do perfil de expressão via RNA-seq através de RT-qPCR.....</i>	99
7	DISCUSSÃO.....	104
7.1	Transcritos diferencialmente expressos envolvidos na regulação do metabolismo do ascorbato.....	105
7.2	As quantidades de etileno e dióxido de carbono envolvem a regulação de um complexo programa de expressão gênica temporal.....	109
7.3	Genes regulados positivamente envolvidos no transporte e hidrólise da sacarose, e degradação do amido sugerem o acúmulo de açúcar em frutos maduros.....	116
7.4	A perda de firmeza decorrente do amadurecimento da acerola destaca uma complexa rede de genes regulatórios envolvidos na degradação e biossíntese da parede celular.....	117
7.5	Modelo proposto destacando as principais alterações moleculares e metabólicas durante o amadurecimento da acerola.....	120
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	127
	REFERÊNCIAS.....	128
	ANEXO A – DESCRIÇÃO DAS 141 VIAS METABÓLICAS REPRESENTADAS DURANTE O AMADURECIMENTO DA ACEROLA, DE ACORDO O BANCO DE DADOS ENCICLOPÉDIA DE GENES E GENOMAS DE KYOTO (KEGG). NAS COLUNAS NOMEADAS “UP” (REGULADOS POSITIVAMENTE) OU “DOWN” (REGULADOS NEGATIVAMENTE) É APRESENTADO O NÚMERO DE EC (DO INGLÊS, ENZYME COMMISSION NUMBER).....	142
	ANEXO B – PERFIL DE EXPRESSÃO DOS TRANSCRITOS ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DO ASCORBATO. AS CONTAGENS REPRESENTAM O NÚMERO DE FRAGMENTOS POR MILHÃO EM CADA BIBLIOTECA.....	147

1 INTRODUÇÃO

A aceroleira (*Malpighia emarginata* DC – Malpighiaceae) é uma pequena árvore cujos frutos apresentam sabor agradável e acumulam conteúdos elevados de ácido ascórbico (AAs). A planta é cultivada em áreas tropicais e subtropicais em todo o mundo, incluindo as Américas do Sul e Central, Sudestes da Ásia e Índia. Os maiores plantios ocorrem no Brasil (HANAMURA *et al.*, 2008), o qual tem se destacado como o maior produtor mundial, consumidor e exportador de acerola (ASSIS *et al.*, 2008). Devido as condições climáticas favoráveis, esta espécie é cultivada principalmente no Nordeste, com destaque para os Estados da Bahia, Ceará, Paraíba e Pernambuco (FURLANETO; NASSER, 2015).

Comumente, os frutos têm sido comercializados nas formas de polpa, suco, fruto congelado e cápsula de vitamina C (ASSIS *et al.*, 2008). A importância do consumo de frutos ricos em vitamina C reside no fato dos humanos e outros primatas terem perdido a capacidade de sintetizar AAs devido a uma mutação que transformou a L-gulonolactona oxidase em uma enzima não funcional (NISHIKIMI *et al.*, 1988). Neste sentido, a acerola tem se destacado como uma das principais fontes naturais dessa vitamina (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

O conteúdo de ácido ascórbico (AAs) na acerola apresenta uma grande variação (495–4827 mg.100 g⁻¹ MF) (MEZADRI *et al.*, 2006), que reflete a base genética e o estágio de desenvolvimento. Tipicamente, o AAs atinge um pico nos frutos no estágio verde, sofrendo intensa redução no seu conteúdo à medida que o fruto amadurece (BADEJO *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Em contrapartida, outros órgãos da planta, como raízes (20 mg.100g⁻¹ MF), folhas (215 mg.100 g⁻¹ MF) e caule (255 mg.100 g⁻¹ MF) apresentam concentrações de AAs muito inferiores àquelas registradas nos frutos (ELTELIB *et al.*, 2011). Além disso, os modelos mais utilizados para investigação e elucidação do metabolismo deste ácido foram espécies que apresentam níveis muito baixos, tais como o tomate (10–25 mg.100 g⁻¹ MF) (BADEJO *et al.*, 2012; RIGANO *et al.*, 2018) e *Arabidopsis* (30–44 mg.100 g⁻¹ MF) (RADZIO *et al.*, 2003; BADEJO *et al.*, 2009).

Pelo menos quatro vias foram propostas para a biossíntese do AAs em plantas. Vários estudos destacam a via da L-galactose descrita por Wheeler *et al.* (1998) como a principal rota biossintética em diferentes órgãos e espécies (LINSTER; CLARKE, 2008; BULLEY *et al.*, 2009; ALÓS *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2016). Evidências posteriores têm apontado para a contribuição de pelo menos três vias alternativas: A via da L-gulose (WOLUCKA; MONTAGU 2003), do mio-inositol (LORENCE *et al.*, 2004) e do D-galacturonato (AGIUS *et al.*, 2003). Entretanto, suas contribuições para as reservas de AAs em frutos permanece

incerta, uma vez que algumas das enzimas e genes específicos ainda não foram caracterizados (BULLEY; LAING, 2016).

Outros processos destacam-se também como cruciais para a regulação dos níveis de AAs em frutos. A via de reciclagem do AAs é reconhecida por desempenhar um papel central no restabelecimento das reservas e acúmulo desse ácido (BULLEY *et al.*, 2009; ELTILIB *et al.*, 2011). Além disso, os processos de degradação (ALÓS *et al.*, 2013; TRUFFAULT *et al.*, 2017) e de translocação (BADEJO *et al.*, 2012; RUGGIERI *et al.*, 2016) também são determinantes para o ajuste fino dos conteúdos do ácido. A clonagem e a análise da expressão de membros gênicos específicos que codificam para a via de biossíntese (L-galactose) e de reciclagem do AAs em acerola evidenciaram sua importância para o acúmulo do AAs em frutos verdes (BADEJO *et al.*, 2009; ELTELIB *et al.*, 2011). No entanto, o cenário atual sugere que os níveis de AAs em plantas são dinâmicos e controlados por diferentes membros das mesmas e de diferentes famílias multigênicas (RUGGIERI *et al.*, 2016). Apesar de todo o progresso feito com os modelos supracitados, a acerola caracteriza-se como ideal para investigar a regulação transcricional dos processos de biossíntese, reciclagem, degradação e translocação do AAs, no intuito de entender como os frutos verdes acumulam níveis tão elevados de AAs.

A acerola é um fruto de desenvolvimento rápido, que atinge sua maturação completa entre 17 e 25 dias após a antese (DAA) (CARPENTIERI-PÍPOLO *et al.*, 2008; ASSIS *et al.*, 2008). No estágio final (amadurecimento), os frutos sofrem alterações moleculares, bioquímicas e fisiológicas irreversíveis e coordenadas na cor (degradação da clorofila e acúmulo de outros pigmentos), firmeza (desmontagem da parede celular) e sabor (acúmulo de açúcares e compostos voláteis e redução do ácido orgânico) (GIOVANNONI *et al.*, 2017). O etileno é o principal hormônio que coordena a complexa rede de expressão gênica do amadurecimento de frutos climatéricos, como a acerola (KLEE; GIOVANNONI, 2011), mesmo assim, os mecanismos moleculares regulatórios mediados por este hormônio, durante o amadurecimento da acerola, são completamente desconhecidos.

Em função do seu caráter climatérico, a acerola atinge taxas respiratórias extremamente altas, podendo desencadear o amadurecimento em algumas horas, bem como tornar-se muito frágil e rapidamente perecível em poucos dias após a colheita (CARRINGTON; KING, 2002). Em vista disso, sua comercialização requer transporte rápido e o uso de recipientes refrigerados na tentativa de retardar a respiração (ASSIS *et al.*, 2008). Apesar dos esforços, o processo de senescência acelerado dos frutos constitui-se ainda no

principal fator limitante, sendo responsável por perdas econômicas notáveis no manejo pós-colheita. Em vista das suas características peculiares, bem como diante da ausência de estudos direcionados a tais metabolismos, ressalta-se a relevância de conduzir uma investigação sobre a regulação ao nível transcricional do metabolismo do etileno, respiração e da firmeza dos frutos, na intenção de avançar no entendimento do controle do processo de amadurecimento, o qual torna-se indispensável para prolongar a qualidade e o tempo de prateleira dos frutos.

Apesar da crescente importância socioeconômica da acerola, estudos moleculares a respeito do amadurecimento são muito escassos, principalmente devido à total ausência de dados transcriptômicos e os dados genômicos disponíveis serem insignificantes. Até junho de 2018, apenas 57 sequências de nucleotídeos e 44 de proteínas de *M. glabra*, recentemente renomeada de *M. emarginata* foram depositadas no GenBank/NCBI (do inglês, *National Center for Biotechnology Information*). A aplicação de tecnologias de Sequenciamento de Segunda Geração (do inglês, *NGS*) no sequenciamento de RNA (RNA-seq) tem provado ser uma ferramenta poderosa para identificação e sequenciamento de milhares de transcritos únicos da mesma ou de diferentes famílias multigênicas, fornecer os perfis de expressão espaço-temporal em larga escala (MCGETTIGAN, 2013; WU *et al.*, 2014), mesmo para espécies sem genoma sequenciado, a exemplo da aceroleira.

Para fornecer uma primeira visão geral das alterações moleculares que medeiam o processo de amadurecimento de acerola, bem como uma compreensão detalhada sobre a regulação dos metabolismos supracitados, o presente estudo objetivou determinar o perfil transcriptômico de folhas, flores e frutos de aceroleira em três estágios de desenvolvimento – 12 DAA (verde), 16 DAA (intermediário) e 20 DAA (maduro) – no intuito de confrontá-lo com a dinâmica do ascorbato, etileno, respiração, açúcar e firmeza durante o amadurecimento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais da cultura de aceroleira

A aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.) é uma pequena árvore perene de aproximadamente 2 – 3 m de altura, também conhecida por Cereja-das-antilhas, que pertence à família Malpighiaceae – Ordem Malpighiales. A espécie é originária das Antilhas (Sul do México), América Central e norte da América do Sul (MENDONÇA; MEDEIROS, 2011; CARRINGTON; KING, 2002). Em 1946, quando foi descoberto o alto conteúdo de vitamina C nos seus frutos, iniciaram-se os plantios comerciais da cultura em Porto Rico, expandindo-se para os Estados Unidos e Cuba. Somente em 1955, as sementes foram trazidas de Porto Rico para o Brasil e implantadas na Universidade Federal Rural de Pernambuco, onde foram multiplicadas e distribuídas para vários Estados do Nordeste e outras regiões do país (BARBOZA *et al.*, 1996).

No Brasil, o cultivo da aceroleira adquiriu escala comercial somente na década de 80 (SOUZA *et al.*, 2006). Atualmente, o Brasil é o maior produtor, exportador e consumidor mundial da fruta, com área cultivada estimada em cerca de 10.000 hectares, com destaque para os Estados da Bahia, Ceará, Paraíba e Pernambuco, que juntos detém em torno de 60% da produção nacional. Apenas cerca de 7,16% da produção anual do fruto (480,044 mil toneladas) é processada pelas indústrias brasileiras (FURLANETO; NASSER, 2015). No cenário local, o Ceará é o segundo maior produtor nacional, com uma área plantada de 2.047 hectares, que proporcionou 12.772 mil toneladas de frutos e rendimento mensal de 22.044.469,00 de reais, apenas no mês de maio de 2018 (CIDRA.IBGE, 2018). Comercializada nas formas de fruto *in natura* ou congelado, polpa, suco, e cápsula de vitamina C, a demanda pela fruta tem aumentado no mercado interno e externo (Estados Unidos, Ásia e Europa), estimulando pequenos, médios e grandes produtores na propagação da cultura e plantio de novas áreas (RITZINGER; RITZINGER, 2011).

Assim, a cultura da aceroleira no Brasil tornou-se atrativa, principalmente devido às condições climáticas favoráveis e graças ao seu valor nutricional, exercendo também significativo papel socioeconômico por constituir importante fonte de renda para a população (SOUZA *et al.*, 2006). No cenário mundial, a fruta tem se destacado pelo seu sabor agradável e reconhecido valor nutricional, especialmente por ser rica em vitamina C e uma importante fonte de pro-vitamina A, vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina e niacina), minerais (ferro, cálcio e fósforo), polifenóis (antocianinas) e carotenoides (licopeno), constituindo-se assim, numa excelente fonte de antioxidante (FERREIRA *et al.*, 2009; HORTA *et al.*, 2016).

2.2 Características gerais e desenvolvimento do fruto

A *M. emarginata* é uma espécie diploide ($2n = 20$) predominantemente alógama (MONDIN *et al.*, 2010), que apresenta alta variabilidade genética disponível, refletida em grande diversidade fenotípica da planta e do fruto (FURLANETO; NASSER, 2015). A polinização cruzada (alogamia) fornece frutos com mais qualidade, maior taxa de fecundação e sementes mais viáveis, indicando a necessidade do uso de cultivares distintas nos plantios comerciais (SIQUEIRA *et al.*, 2011). Porém, em vista da grande variabilidade, recomenda-se a prática de propagação por estaquia de clones comerciais, no intuito de garantir maior produtividade e os atributos desejáveis da planta e do fruto.

Os frutos de aceroleira são formados por drupas tricarpeladas, com exocarpo (casca) muito fino, mesocarpo (polpa) carnosos e suculento e endocarpo constituído de três caroços triangulares, alongados, de superfície reticulada, contendo ou não sementes. A forma do fruto pode ser redonda, oval ou achatada e o peso varia de 3 a 16 g. A superfície do fruto pode ser lisa ou apresentar, entre os carpelos, sulcos rasos ou profundos. A cor da casca do fruto imaturo normalmente é verde, podendo também ser alvacenta ou verde-arroxeadas. Em frutos maduros, a cor da casca pode variar de vermelho-amarelada, vermelho-alaranjada, vermelha e vermelho-púrpura. Enquanto a cor da polpa, por sua vez, pode ser amarela, alaranjada ou vermelha (RITZINGER; RITZINGER, 2011).

Em aceroleira, o florescimento e desenvolvimento dos frutos são extremamente rápidos e alterados em função da época de colheita e genótipo avaliado. A taxa de frutificação varia, em média, de 10 a 30%. Da antese à formação do fruto verde são requeridos de 3 a 6 dias, enquanto da antese a frutos maduros são necessários de 17 a 31 dias. Contudo, essas variações são decorrentes principalmente das mudanças de temperatura, luminosidade, disponibilidade hídrica e nutricional, integradas a constituição genética (genótipo), que podem acelerar ou retardar a execução da programação genética que regula a mudança de um estágio de desenvolvimento para o outro (CARPENTIERI-PÍPOLO *et al.*, 2008; ADRIANO *et al.*, 2011).

De maneira geral, após a fecundação, inicia-se um período caracterizado por divisão e diferenciação celular contínuas, responsáveis pelo aumento do tamanho, diâmetro e espessura do pericarpo dos frutos. Na etapa de expansão celular, os frutos aumentam de tamanho acumulando água, nutrientes e reservas da planta mãe. A maioria dos frutos em desenvolvimento é verde e a camada celular externa realiza fotossíntese contribuindo para a deposição da matéria seca (KNAPP; LITT, 2013). Em acerola, o processo de divisão celular

aumenta exponencialmente até cerca de 8 dias após a antese, depois disso, inicia-se a fase de expansão celular que se estende até os estádios finais do amadurecimento do fruto (CARRINGTON; KING, 2002).

O amadurecimento representa o estágio terminal do desenvolvimento. Para tanto, os frutos sofrem mudanças complexas mediadas pela ativação de um novo programa genético altamente coordenado e irreversível, englobando diferentes alterações moleculares, bioquímicas nos metabolismos primário e secundário, e fisiológicas específicas na cor, na firmeza e no sabor (PRAASNNA *et al.*, 2007; GIOVANNONI *et al.*, 2017). A programação genética que conduz a divisão, diferenciação, expansão celular e amadurecimento dos frutos é controlada por um conjunto de genes, expressos em estádios específicos ou diferencialmente regulados ao longo do seu desenvolvimento (BAPAT *et al.*, 2010; KNAPP; LITT, 2013).

Todas estas mudanças evoluíram para tornar os frutos comestíveis e mais atraentes aos organismos dispersores das sementes. O amadurecimento também aumenta as propriedades organolépticas, tornando os frutos uma fonte rica em energia, vitaminas e sais minerais indispensáveis à dieta humana. Contudo, a qualidade dos frutos diminui à medida que o amadurecimento atinge estádios avançados, principalmente devido à perda excessiva de firmeza, a qual aumenta a suscetibilidade a patógenos e o desenvolvimento de sabor e cor desagradáveis, levando a notáveis perdas econômicas durante seu manejo pós-colheita (BAPAT *et al.*, 2010).

O sabor e o aroma dos frutos são fortemente influenciados pela proporção de ácidos orgânicos, de açúcares e de compostos voláteis característicos de cada espécie. Ao longo do amadurecimento, geralmente os conteúdos de açúcares solúveis e dos compostos voláteis são aumentados, enquanto as quantidades de ácidos são reduzidas, dando aos frutos um sabor agradável (GIOVANNONI, 2001). Em laranja e melão, por exemplo, a sacarose é o açúcar predominante, seguido da glicose e frutose em menores quantidades, enquanto que o ácido predominante é o citrato (YU *et al.*, 2012; BIAIS *et al.*, 2009). Em uva, os açúcares acumulados são a glicose e a frutose, e os ácidos mais abundantes são o tartarato e o malato (DELUC *et al.*, 2007). Na acerola, os ácidos predominantes são o ascorbato (acumulado no fruto verde) e o malato (acumulado no fruto maduro), e os açúcares majoritários em frutos maduros são a frutose e a glicose (HANAMURA *et al.*, 2008).

2.2.1 O papel do etileno e da respiração no amadurecimento

O etileno é um hormônio central para a iniciação e o controle das mudanças fisiológicas decorrentes do amadurecimento de frutos climatéricos. De acordo com as características do processo do amadurecimento, em relação à respiração e a biossíntese de etileno, os frutos são classificados em dois grupos: climatéricos e não-climatéricos (TUCKER, 1993). Os frutos climatéricos (acerola, banana, maçã, manga, mamão, pêra e tomate) são capazes de amadurecer quando retirados da planta. Além disso, apresentam biossíntese de etileno e taxa respiratória elevadas, destacando-se um pico de produção de etileno e respiratório característico da fase climatérica, que ativa e acelera o programa de amadurecimento. Frutos climatéricos com as maiores taxas respiratórias, tendem a amadurecer mais rapidamente e, portanto, são mais perecíveis. Enquanto os frutos não climatéricos (laranja, limão, morango e uva) apresentam níveis basais ou reduzidos de respiração e de etileno à medida que o amadurecimento progride, de modo que não amadurecem fora da planta, mesmo quando tratado com etileno exógeno (KARLOVA *et al.*, 2014).

O cenário atual para o amadurecimento do tomate, modelo de estudo para frutos climatéricos, revela uma complexa modulação molecular e espaço-temporal que conduz a produção aumentada do etileno e inclui: remodelagem da cromatina mediado por mudanças epigenéticas, regulação hormonal e transcricional, e modulação do tipo *feedback* entre tais mecanismos. Especula-se que estas alterações supracitadas só são ativadas quando a semente alcança seu completo desenvolvimento, dando-se assim, o início do processo de amadurecimento. A semente madura induz um sinal (aumento da produção do ácido abicísico), que ativa os genes dos fatores de transcrição RIN-MADS, CNR-SPL, TAGL1 e NOR-NAC responsáveis pela ativação de outros genes que codificam isoformas de 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintase (ACS) autocatalíticas da biossíntese do etileno. Paralelamente, o genoma reduz cerca de 20–30% das suas metilações durante o amadurecimento (AMPOPHO *et al.*, 2013; GIOVANNONI *et al.*, 2017), viabilizando a ativação de genes de amadurecimento.

A biossíntese do etileno requer duas enzimas chave: a ACS, que converte S-adenosilmetionina em 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), e a 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase (ACO), que converte ACC em etileno (GIOVANNONI, 2004). Ambas, ACS e ACO, constituem etapas limitantes da produção de etileno, passíveis de regulação (pós-) transcricional e/ou traducional, que por sua vez, definem dois sistemas distintos:

Sistemas I e II caracterizados pelos níveis de produção de etileno (DE POEL; DER STRAETEN, 2014). O sistema I atua em condições de crescimento vegetativo, em frutos não-climatéricos e climatéricos imaturos, sendo caracterizado por níveis basais de etileno, capaz de inibir isoformas específicas da ACS, dessa forma, modulando sua própria síntese. O sistema II é acionado durante o amadurecimento de frutos climatéricos ou senescência, o qual requer a indução de outras isoformas de ACS não inibidas pelo etileno (autocatalíticas), elevando sua concentração celular (GRIERSON, 2013). Em tomate, a transição do sistema I para o II é acompanhado por um aumento da expressão de *SIACS1A* e indução do *SIACS4*, enquanto a manutenção do sistema II foi associada à indução adicional de *SIACS2* (BARRY *et al.*, 2000).

Na ausência do etileno a via de sinalização é reprimida pelo receptor. Entretanto, na presença do hormônio, seu receptor é fosforilado e marcado para degradação, disparando assim, uma sinalização celular em cascata. Os receptores do etileno estão fortemente associados a proteínas do tipo serina-treonina quinases, chamadas de resposta tripla constitutiva (CTR). Quando os receptores de etileno são degradados, as proteínas CTRs são liberadas para ativar, através de uma cascata de proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPK), a proteína citosólica insensível ao etileno 2 (EIN2), que por sua vez, desloca-se até o núcleo ativando os fatores de transcrição insensível ao etileno 3 (EIN3). EIN3 é regulada negativamente pelas proteínas F-box (EBF1/2), que marca EIN3 para degradação (GAPPER *et al.*, 2014). Entretanto, quando ativado, os fatores EIN3 ativam a expressão dos fatores de resposta ao etileno (ERFs), responsáveis por promover a ativação de centenas de genes responsivos ao etileno, dentre eles aqueles envolvidos no amadurecimento. Os ERFs constituem uma ampla família multigênica. Em tomate foram identificados 76 membros, apresentando comportamento de expressão temporal membro específico (LIU *et al.*, 2016). De maneira interessante, os fatores ERFs podem atuar tanto na ativação de diferentes genes e processos de amadurecimento, bem como na regular negativamente da produção de etileno (KARLOVA *et al.*, 2011).

A intensidade do pico de etileno e respiratório em frutos climatéricos varia de acordo com o tipo de fruto (espécie frutífera), tipo de amadurecimento (fruto na planta mãe ou armazenado) e ainda com o tipo de tratamento (ativador, inibidor de amadurecimento, temperatura, etc.). Vários estudos têm revelado que frutos climatéricos amadurecidos fora da planta apresentam picos de etileno e respiratório altos, devido a vários fatores dentre eles: estresse, perda de água, aumento da resistência do exocarpo a difusão gasosa, requerimento

energético (ATP). Enquanto, frutos amadurecidos na planta exibem pico da produção de etileno tórdio e baixo, que pode resultar até na ausência de pico respiratório, como um reflexo do controle genético e evolutivo desenvolvido pela planta para prolongar o tempo de amadurecimento e garantir a dispersão das sementes (SHELLIE; SALTVEIT, 1993; BOWER *et al.*, 2002; NORDEY *et al.*, 2016; COLOMBIÉ *et al.*, 2017). Entretanto, a regulação das taxas de etileno e respiratória de frutos climatéricos, pós-colheita, tem sido um tema central de estudo, na tentativa de prolongar seu tempo de prateleira.

O amadurecimento requer a síntese de novas proteínas e RNAs mensageiros (mRNAs), bem como de compostos do metabolismo secundário (novos pigmentos e compostos aromáticos). Esses processos anabólicos exigem energia e suprimento de esqueleto de carbono, fornecidos ao fruto através da respiração (TUCKER, 1993). Embora, a explosão respiratória seja dispensável para o amadurecimento (SHELLIE; SALTVEIT, 1993; BOWER *et al.*, 2002; XU *et al.*, 2012), o aumento do fluxo respiratório é uma característica marcante do amadurecimento de frutos climatéricos, influenciando rapidamente na sua viabilidade (GRIERSON, 2013).

As principais fontes de substratos que suprem a respiração de frutos são açúcares (glicose e frutose) provenientes da síntese e/ou transporte da sacarose, ou mobilizados através da degradação do amido. Além disso, os ácidos orgânicos (malato e citrato) constituem outra importante fonte (TUCKER, 1993; OSORIO; FERNIE, 2013). A sacarose desempenha um papel central no crescimento, desenvolvimento da planta e do fruto, servindo também como potente regulador direto ou indireto da expressão gênica (WINTER; HUBER, 2000; RUAN, 2014). Sua síntese é realizada através da reação irreversível das enzimas sacarose fosfato sintase e sacarose fosfato fosfatase, enquanto sua degradação ocorre por meio da sacarose sintase ou investases (RUAN, 2014). A mobilização do amido armazenado em frutos ocorre através da ação de alfa-amilases que liberam glicose e maltose, beta-amilases (maltose) e a amido fosforilase (glicose-1-fosfato). A maltose, por sua vez, é convertida em glicose livre por glicosidases (TUCKER, 1993). Durante o amadurecimento, tais substratos suprem as vias glicolíticas e das pentoses fosfato, tanto citosólica quanto plastidial, bem como o ciclo do ácido cítrico, culminando na produção de ATP, NAD(P)H e blocos de carbono necessários para suprir a demanda metabólica e energética deste processo. A maior parte do ATP produzido é gerado pela via de fosforilação oxidativa, a qual está acoplada ao gradiente eletroquímico de prótons gerado através do fluxo de elétrons doados pelo NADH e FADH₂ à cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (TUCKER, 1993; ZEEMAN, 2015).

Além disso, o amadurecimento geralmente é acompanhado pela regulação positiva de vias desacopladoras do gradiente de prótons, representada pela proteína desacopladora mitocondrial (UCP) e/ou de vias alternativas a fosforilação oxidativa, chamadas de vias dissipadoras de elétrons ou não fosforilativa. A via resistente ao cianeto ou via da oxidase alternativa (AOX), apresenta um papel central no ajuste do fluxo respiratório e do processo de amadurecimento, pois além de regular negativamente a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), o desacoplamento mitocondrial pode sustentar um fluxo contínuo de carbono pelo metabolismo respiratório, mesmo sob intensa demanda energética (HOLTZAPFFEL *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2015). Mesmo sabendo que tais vias desempenham um papel central na regulação da respiração, existem poucos estudos explorando seu papel funcional durante o amadurecimento de frutos. Curiosamente, em tomate com níveis reduzidos de *SLAOX1a*, mostrou redução na produção de carotenóides, etileno, respiração (ausência de pico climatérico) e a regulação negativa de vários genes de amadurecimento, o que culminou no retardo do amadurecimento (XU *et al.*, 2012).

2.2.2 Metabolismo do ácido L-ascórbico

O ácido L-ascórbico – AAs (vitamina C) é um metabólito essencial para plantas e animais, requerido em diversos processos celulares. Os humanos e outros primatas são incapazes de biossintetizá-lo, devido a uma mutação no gene que codifica a última enzima da via, L-gulonolactona oxidase, que a tornou não funcional (NISHIKIMI *et al.*, 1988). Dessa maneira, o AAs precisa ser obtido de alguma fonte alimentar, primariamente encontrada em frutos e vegetais (LORENCE *et al.*, 2004). Em plantas, o L-ascorbato é quantitativamente o antioxidante mais abundante e presente em todos os compartimentos celulares, especialmente nas mitocôndrias, cloroplastos e vacúolos, podendo atingir uma concentração de 25 mM no estroma cloroplastidial. O AAs funciona como um poderoso antioxidante, cofator enzimático e precursor para a síntese do oxalato e tartarato celular. Além disso, participa de vários processos celulares incluindo fotossíntese, divisão e expansão celular e tolerância aos diversos estresses ambientais (SMIRNOFF, 2000; SMIRNOFF; WHEELER, 2000).

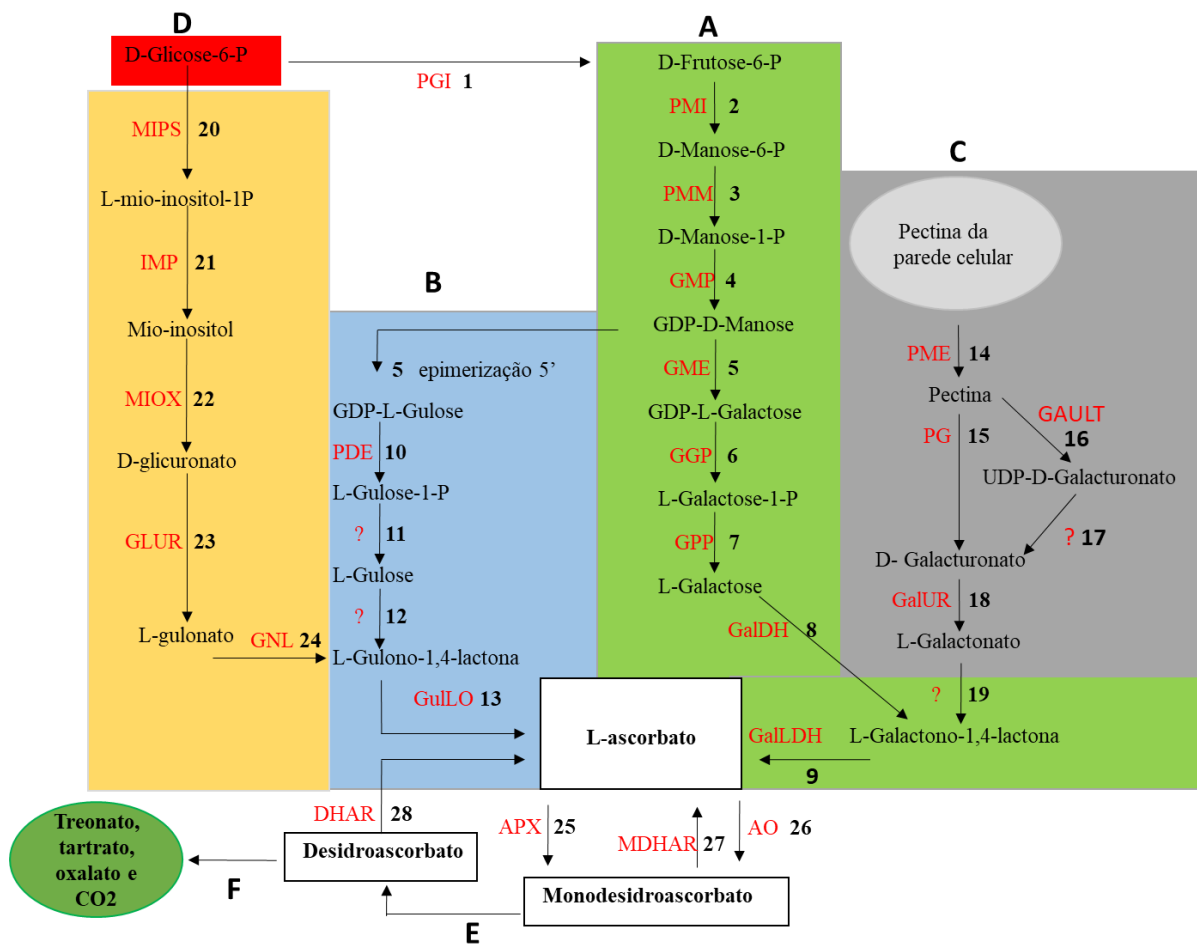
A identificação e a caracterização parcial das vias de biossíntese do AAs preencheram a maior lacuna do metabolismo de carboidratos em plantas, uma vez que cerca de 10% do conteúdo de carboidratos de folhas está na forma deste ácido (WHEELER *et al.*, 1998). Existem quatro prováveis vias de biossíntese do AAs em plantas. Abordagens bioquímicas e

moleculares têm identificado e caracterizado a via da L-galactose ou Smirnoff-Wheeler (Figura 1A) (WHEELER *et al.*, 1998; LINSTER; CLARKE, 2008). Contudo, a descrição da contribuição de pelo menos três vias alternativas: L-gulose (Figura 1B) (WOLUCKA; MONTAGU, 2003), D-galacturonato (Figura 1C) (AGIUS *et al.*, 2003) e mio-inositol (Figura 1D) (LORENCE *et al.*, 2004) revelam a complexidade da sua biossíntese.

Diversos estudos destacam a via da L-galactose como a de maior contribuição para a biossíntese de AAs em diferentes órgãos e espécies vegetais (BULLEY *et al.*, 2009; ALÓS *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2016). Os primeiros cinco passos dessa via são dedicados a síntese de hexoses ativadas pela ligação fosfodiéster da hexose a nucleotídeos (Figura 1A). As reações seguintes correspondem a formação de L-galactose-1-fosfato, L-galactose, L-galactono-1,4-lactona e L-ascorbato (LINSTER; CLARKE, 2008). Investigações sobre a participação de genes dessa via no acúmulo de AAs destacam possíveis alvos de regulação. Em acerola, durante o desenvolvimento e início do amadurecimento dos frutos, os genes que codificam para GDP-manose pirofosforilase (GMP), GDP-mannose-3',5'-epimerase (GME), GDP-L-galactose transferase (GGP) e L-galactose desidrogenase (GalDH) foram os mais expressos e correlacionados com o acúmulo deste ácido (BADEJO *et al.*, 2009).

Figura 1 – Esquema de vias metabólicas envolvidas na regulação do ascorbato em plantas.

Via da L-galactose (A) 1, glicose-6-fosfato isomerase (PGI); 2, fosfomanose isomerase (PMI); 3, fosfomanose mutase (PMM); 4, GDP-manose pirofosforilase (GMP); 5, GDP manose-3',5'-epimerase (GME); 6, GDP-L-galactose transferase (GGP); 7, L-galactose-1-fosfato fosfatase (GPP); 8, L-galactose desidrogenase (GalDH); 9, L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH); **via da L-gulose (B)** 10, fosfodiesterase (PDE); 13, L-gulono-1,4-lactona oxidase (GulLO); **via do D-galacturonato (C)** 14, pectinesterase (PME); 15, poligalacturonase (PG); 16, poligalacturonato 4- α -galacturonosiltransferase (GAULT); 18, D-galacturonato reductase (GalUR); **via do mio-inositol (D)** 20, L-mio-inositol-1-fosfato sintase (MIPS); 21, mio-inositol monofosfatase (IMP); 22, mio-inositol oxigenase (MIOX); 23, glicuronato redutase (GLUR); 24, gulonolactonase (GNL); **vias de reciclagem e degradação (E-F)** 25, ascorbato peroxidase (APX); 26, ascorbato oxidase (AO); 27, monodesidroascorbato redutase (MDHAR); 28, desidroascorbato redutase (DHAR).



Fonte: elaborada pelo autor.

Em kiwi (*Actinidia eriantha*), o aumento da concentração de AAs ocorreu próximo ao pico de expressão dos genes *AeGGP* e *AeGME*. Enquanto, a co-expressão dos genes *AeGGP* e *AeGME* em *Arabidopsis thaliana* aumentou 7 vezes o conteúdo de AAs, destacando-os como importantes reguladores das quantidades desse ácido (BULLEY *et al.*, 2009). Recentemente, Zhang *et al.* (2016) correlacionaram a expressão aumentada dos genes *ZjGGP*, *ZjGME1*, *ZjGMP1* e *ZjGalDH* com os altos conteúdos de AAs verificado nos estádios de expansão II e branco de frutos de *Ziziphus jujuba*.

Uma ramificação da via da L-galactose resulta da natureza multicatalítica da GDP-mannose-3',5'-epimerase, a qual libera dois epímeros: GDP-L-galactose e a GDP-L-gulose (via da L-gulose, Figura 1B). Um estudo com suspensão de células de *A. thaliana* supridas com os intermediários L-gulose ou L-gulono-1,4-lactona resultaram no aumento de 2 vezes nos conteúdos de AAs celular, evidenciando sua provável contribuição (WOLUCKA; MONTAGU, 2003). Em contrapartida, a superexpressão de genes *AtGulLO3* e *6* de *A. thaliana* não aumentou os níveis de AAs, o que foi associado à baixa afinidade da enzima

pelo seu substrato (ABOOCKER *et al.*, 2017). Contudo, prováveis genes e enzimas envolvidas nas reações subsequentes a da GME ainda não foram identificados em plantas, havendo, portanto, a necessidade de maiores estudos moleculares e bioquímicos (BULLEY; LAING, 2016; RUGGIERI *et al.*, 2016).

Outra via sugerida, a do D-galacturonato, utiliza-se de polissacarídeos da parede celular. Durante o amadurecimento de frutos e no processo de apoptose, a parede celular é extensivamente desmontada e degradada liberando o D-galacturonato, o qual após três reações pode ser convertido em AAs (Figura 1C) (AGIUS *et al.*, 2003). Em morango e tomate, o conteúdo de AAs aumenta à medida que os frutos amadurecem. Curiosamente, em morango, o gene da D-galacturonato redutase teve sua expressão aumentada em mais de 150 vezes (CRUS-RUS *et al.*, 2011). Em tomate, o suprimento exógeno com D-galacturonato aumentou as reservas de AAs em frutos maduros, reforçando a participação adicional dessa via durante o amadurecimento (BADEJO *et al.*, 2012).

Através da via alternativa do mio-inositol, a glicose é convertida em mio-inositol-1-fosfato, o qual após ser desfosforilado a mio-inositol, pode ser convertido em AAs, após uma sequência de reações (Figura 1D). Cinco possíveis genes que codificam para a mio-inositol oxigenase (*MIOX*), enzima que catalisa a reação de conversão do mio-inositol em D-glicuronato, foram identificados no genoma da *A. thaliana*. A expressão do gene *MIOX4* em linhagens de *A. thaliana* (L1-L3) revelou um aumento de 2 a 3 vezes no conteúdo de AAs, comparado ao controle (LORENCE *et al.*, 2004). Em frutos de *Z. jujuba*, a via do mio-inositol (*MIOX4*) e da L-galactose (*ZjGMP2* e *ZjGME2*) parecem ser cruciais para a manutenção das reservas de AAs durante o amadurecimento (ZHANG *et al.*, 2016). Contudo, em frutos de *A. eriantha*, a expressão aumentada de *AeMIOX4* não foi correlacionada com o aumento de AAs verificado (BULLEY *et al.*, 2009).

Embora, as plantas apresentem diferentes vias para a biossíntese de AAs, ressalta-se que a contribuição de cada uma varia entre espécies, órgãos e estágio de desenvolvimento. Uma análise do transcriptoma de camu-camu (*Myrciaria dúbia*) revelou a presença de transcritos codificando para todas as vias (CASTRO *et al.*, 2015). Em morango (*Fragaria ananassa*), a expressão relativa de genes específicos indicou a provável predominância das vias da L-galactose em frutos imaturos, D-galacturonato e mio-inositol em frutos maduros (CRUS-RUS *et al.*, 2011). Em jujuba e *Citrus sp.* foram sugeridas as vias da L-galactose como principal, auxiliada pela via do mio-inositol (ALÓS *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2016). Contudo, a análise dos transcriptomas de frutos de *Myrica rubra* e *Ananas comosus* (abacaxi)

destacou apenas a provável predominância da via da L-galactose (FENG *et al.*, 2012; ONG *et al.*, 2012).

Em plantas, os conteúdos de AAs são dinâmicos e ajustados de acordo com o compartimento celular, órgão, estágio de desenvolvimento e condição de estresse. Tal regulação é controlada por diferentes genes, geralmente membros de famílias multigênicas. Recentemente, 235 prováveis *loci* foram mapeados e relacionados ao metabolismo do ácido ascórbico em tomate (RUGGIERI *et al.*, 2016). Neste contexto, o nível de AAs celular é o resultado da regulação integrada dos processos de biossíntese, reciclagem, degradação e transporte (CRUS-RUS *et al.*, 2011; BULLEY *et al.*, 2009).

O processo de reciclagem desempenha um papel crucial para o re-estabelecimento das reservas de AAs celular. A ascorbato peroxidase (APX) usa duas moléculas de AAs para converter o peróxido de hidrogênio em água, gerando duas moléculas de monodesidroascorbato (MDHA). O MDHA pode ser regenerado a AAs pela ação da monodesidroascorbato redutase (MDHAR) ou ser espontaneamente convertido a desidroascorbato para posterior conversão a forma reduzida pela desidroascorbato redutase (DHAR) (Figura 1E; CRUZ-RUS *et al.*, 2011). Em frutos de *A. eriantha*, a expressão dos genes *MDHAR* e *DHAR1* aumentou ao longo do amadurecimento (BULLEY *et al.*, 2009). Interessantemente, em acerola, o gene *DHAR* foi mais expresso em frutos semimaduros, enquanto a expressão do *MDHAR* foi detectada apenas em frutos muito maduros (ELTELIB *et al.*, 2011), evidenciando a contribuição destes genes na regulação da homeostase celular do AAs.

Entretanto, o desidroascorbato formado pelas enzimas APX e ascorbato oxidase (AO), quando não regenerado a sua forma reduzida, este, é irreversivelmente degradado a produtos finais, como L-treonato, L-tartarato, L-glicerato, L-oxalato e CO₂ (Figura 1F) (LOEWUS, 1999). Em frutos de *A. eriantha* e *Z. jujuba*, membros de *AO* tiveram seu pico de expressão no início do desenvolvimento e foram praticamente não detectados em frutos maduros, correlacionando com os baixos níveis de AAs, evidenciando assim, maior taxa de degradação deste ácido (BULLEY *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2016). Ainda em *Z. jujuba*, a expressão dos genes *APX2* e *APX3* foi baixa no estágio de expansão II e branco dos frutos, consistente com altos níveis de AAs, enquanto a expressão aumentada de *APX2* e *APX4* durante o amadurecimento foi consistente com a diminuição do AAs, destacando o papel dos genes *APX* e *AO* no processo de depleção (ZHANG *et al.*, 2016).

O transporte do AAs ainda é pouco estudado em plantas. Embora sua biossíntese ocorra no citosol/mitocôndria, o mesmo é encontrado em todos os compartimentos celulares, em concentrações na faixa milimolar. O fluxo de AAs entre órgãos ocorre através do floema, enquanto o fluxo intracelular e para o apoplasto é provavelmente mediado por um grupo de transportadores transmembrana especializados, chamados transportadores nucleobase-ascorbato (NAT). Só no genoma da *A. thaliana*, foram identificados e anotados 12 genes codificando prováveis transportadores, contudo nenhum produto deles foi bioquimicamente confirmado como transportador de AAs (MAURINO *et al.*, 2006). Posteriormente, Horemans *et al.* (2008) demonstraram em *Arabidopsis* a presença de dois tipos diferentes de transportadores de alta afinidade por DHA, sendo um deles similar ao transportador de glicose (GLUT) mitocondrial e o outro da membrana plasmática, porém distinto de GLUT. Em tomate, foi comprovada a translocação de AAs das folhas para frutos imaturos (via floema), observando-se significativa redução no transporte desse metabólito à medida que os frutos amadureceram (BADEJO *et al.*, 2012).

2.2.3 Metabolismo da parede celular

A maioria dos frutos são constituídos de células parenquimáticas, apresentando parede celular primária (não lignificada). Tipicamente, a parede celular de frutos é formada de celulose (15–40% MF), hemicelulose (20–30% MF), pectina (30–50% MF) e proteínas arabinogalactanas (PRAASNNA *et al.*, 2007; RUIZ-MAY; ROSE, 2013). A celulose é constituída por homopolissacarídeos de unidades de glicose unidas por ligações β -(1→4), que se associam durante a síntese para formar microfibrilas. As hemiceluloses representam um grupo estruturalmente diverso de hetopolissacarídeos, incluindo xiloglicanos, xilanos, mananas e glicomanas, que se intrelaçam e formam ligações cruzadas com as microfibrilas (RUIZ-MAY; ROSE, 2013).

A pectina constitui uma matriz (gel) altamente hidratada que envolve a estrutura celulose/hemicelulose, bem como preenche a lamela média. Existem pelo menos duas classes de pectinas: homogalacturonana formada por um homopolissacarídeo de unidades do ácido D-galacturônico (GalA) unidas por ligações α -(1→4) ou ramnogalacturonana tipo I, um heteropolissacarídeo constituído por um esqueleto de unidades alternadas de ácido D-galacturônico e ramnose. A ramnose pode apresentar grupos substituídos com cadeias lineares ou ramificadas de arabinose (arabinanas), galactose (galactanas), ou de ambas (arabinogalactanas) (PRAASNNA *et al.*, 2007), enquanto as unidades de ácido D-

galacturônico são altamente acetilados e metilados. As proteínas arabinogalactanas apresentam majoritariamente arabinogalactanas e um pequeno núcleo formado de proteína (RUIZ-MAY; ROSE, 2013). Recentemente, a determinação da estrutura da pectina de acerola revelou ser constituída por um polímero de homogalacturonana linear altamente metoxilado (86% dos resíduos) e ramnogalacturonana do tipo I apresentando estruturas de arabinana, arabinose unidas por ligações α -(1 \rightarrow 5) e ramificadas, e arabinogalactana em menor quantidade (KLOSTERHOFF *et al.*, 2018).

O amadurecimento de frutos carnudos e climatéricos reflete em alterações dramáticas na textura, sendo um dos eventos mais marcantes durante este processo, de forma que, a taxa de amaciamento dos frutos determina não apenas a vida de prateleira pós-colheita, mas também outros aspectos economicamente importantes, como a frequência de colheita, os procedimentos de manejo e a distância que os frutos podem ser transportados (PANIAGUA *et al.*, 2014). Desse modo, a manutenção e/ou o controle da firmeza dos frutos constituem um fator determinante para a sua qualidade, por isso tem sido um tópico central de estudos no campo da biologia de frutos.

De acordo com o grau de perda de firmeza durante o amadurecimento, os frutos carnudos são classificados em duas categorias: aqueles que reduzem drasticamente a firmeza ao amadurecer e adquirem uma textura mole e frágil, que geralmente resulta em vida pós-colheita curta (acerola, damasco, morango, pêssigo e tomate); e aqueles que sofrem perdas moderadas na firmeza à medida que amadurecem, de modo a manter maior firmeza, a qual reflete positivamente em períodos de armazenamento mais longos (maçã, melancia, melão e pêra) (PRAASNNA *et al.*, 2007; PANIAGUA *et al.*, 2014).

Durante o amadurecimento, a parede celular de células parenquimáticas tem a estrutura da celulose, hemicelulose e principalmente da pectina amplamente alteradas. Além disso, a adesão celular é significativamente reduzida, devido a solubilização da pectina presente na lamela média, resultando no afrouxamento da interação célula/célula. Outras modificações incluem alterações na pressão de turgor e na cutícula dos frutos. As modificações da parede celular e da lamela média resultam da ação de diversas proteínas/enzimas com atividade hidrolítica da hemicelulose, celulose e da pectina (RUIZ-MAY; ROSE, 2013). Embora desprovida de função catalítica, as expansinas (EXP) promovem o afrouxamento da parede celular, possivelmente através da quebra das ligações de hidrogênio entre a celulose e hemicelulose, expondo assim a pectina para à degradação enzimática (WANG *et al.*, 2018). Recentemente, Minoia *et al.* (2016) demonstraram que

mutantes de tomateiro sem função da proteína SIEXP1 aumentaram a firmeza e prolongaram o tempo de amadurecimento dos frutos.

Uma vez que os polímeros de pectinas estão acessíveis, estes são desmetilados e desacetilados possibilitando a ação das hidrolases (RUIZ-MAY; ROSE, 2013). A pectina metilesterase (PME) são enzimas que removem grupos metóxila da pectina. Cerca de 90% dos resíduos de GalA são metoxilados em frutos verdes de tomate. Porém observou-se redução para cerca de 35% em fruto maduro (KOCH; NEVINS, 1989), revelando que o aumento de atividade da PME é considerada um importante pré-requisito para a atividade da poligalacturonase (PG) e da pectato liase (PL) (KOCH; NEVINS, 1989; PRAASNNA *et al.*, 2007). Ambas PG e PL apresentam isoformas de atividade endo ou exo hidrolase, que realizam a quebra das ligações α -(1→4) de homogalacturonana, liberando unidades do ácido D-galacturônico. A expressão do gene da poligalacturonase *SIPG2a* pode contribuir com quase 1% dos transcritos totais de mRNA de tomate maduro (DELLAPENNA *et al.*, 1986), fazendo dessa família multigênica o principal alvo de estudo. Mesmo assim, a supressão de *PG* em tomate para 1% da sua atividade total não causou redução significativa na perda de firmeza (BRUMMELL; LABAVITCH, 1997), indicando ser insuficiente para retardar/controlar o processo. Em contrapartida, o silenciamento dos genes *FaPL* e *FaPG* de morango (JIMÉNEZ-BERMÚDEZ *et al.*, 2002; QUESADA *et al.*, 2009) revelou ser crucial para o retardo da perda de firmeza do fruto. Posteriormente, o silenciamento de um gene codificando uma *SIPL* (ULUISIK *et al.*, 2016) revelou ser o de maior contribuição para o processo de amaciamento, descrito até o momento em tomate.

Xiloglicanos constituem a hemicelulose mais predominante e sua depolimerização é também uma característica marcante do amadurecimento de frutos. As enzimas xiloglicanos endotransglucosilase/hidrolases (XTH/XET) atuam como uma transglicosilase de natureza bifuncional: (1) a atividade de XET é caracterizada pela clivagem endolítica da cadeia do xiloglucano e pela transferência da recém-criada extremidade redutora da cadeia do doador para um xiloglicano aceptor, de extremidade não redutora, possibilitando o afrouxamento temporário da parede celular; (2) a atividade de XTH caracteriza-se pela hidrólise de polímeros xiloglucanos (ZHANG *et al.*, 2017; ATKINSON *et al.*, 2009). As XTH/XETs são codificadas por uma família multigênica representada por 25 membros no tomate e 33 em *Arabidopsis*, exibindo isoformas com atividade predominante de hidrolase ou transglicosilase *in vitro* (MUÑOZ-BERTOMEU *et al.*, 2013; ATKINSON *et al.*, 2009).

Em maçã, o aumento da expressão temporal de genes *XTH/XET* específicos, nos estádios inicial (não ativado pelo etileno) e tardio do amadurecimento (ativado pelo etileno), bem como a superexpressão de *MdXTH2* e *MdXTH10* em tomate, mostraram ser fundamentais para a ativação de outros genes envolvidos na degradação da parede celular (MUÑOZ-BERTOMEU *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2017). Atkinson *et al.* (2009) confirmaram, via proteína recombinante, que os transcritos *XTH/XET* mais abundantes em frutos maduros de maçã e kiwi, possuíam atividade de endotransglucosilase de xiloglucanos, sugerindo que a desmontagem desse polímero através dessas enzimas promove o afrouxamento da parede celular para posterior modificação por outras enzimas.

Existem poucos estudos a respeito da depolimerização de celulose durante o amadurecimento de frutos. A celulase é um sistema multienzimático composto por várias enzimas, (endo-glicanases, exo-glicanases e glicosidases). A endoglicanase hidrolisa a ligação β -1,4 entre resíduos de glicose adjacentes e em posições aleatórias. Exo-glicanase atua nas extremidades não redutoras da cadeia, produzindo glicose ou celobiose (dímeros de glicose ligada a β -(1 \rightarrow 4)), enquanto a β -glicosidase converte a celobiose em moléculas de glicose (PRAASNNA *et al.*, 2007). A atividade aumentada, normal ou ausente da celulase durante o amadurecimento de frutos tem sido sumarizada (PRAASNNA *et al.*, 2007; RUIZ-MAY; ROSE, 2013).

2.3 Genômica funcional: abordagem transcriptômica

A tecnologia de sequenciamento de DNA da primeira e principalmente da segunda geração (NGS, do inglês *Next Generation Sequencing*) revolucionou a pesquisa biológica em todos os campos. Desde a publicação da sequência do genoma de *A. thaliana* em 2000, uma profunda compreensão biológica de plantas modelo e cultiváveis tem sido gerada através do sequenciamento de genomas inteiros, resequenciamento com genoma alvo, análises de transcriptomas e epigenomas (MOROZOVA; MARRA, 2008; GAPPER *et al.*, 2014).

As principais plataformas da tecnologia (NGS) disponíveis incluem: Solexa (Illumina), 454 FLX (Roche), SOLiDTM System (Applied Biosystems) e Helicos (HeliscopeTM) (MARDIS, 2008). O desenvolvimento dessas tecnologias já propiciou o sequenciamento de diversos genomas de frutíferas que estão dispostos no Centro Nacional de Informação Biotecnológica [(NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)] e/ou *Phytozome* (<https://phytozome.jgi.doe.gov>): *Actinidia chinensis* (kiwi), *Anacardium occidentale* (cajú), *Ananas comosus* (abacaxi), *Artocarpus camansi* (fruta pão), *Capsicum annuum* (pimenta)

Carica papaya (mamão), *Citrus sinensis* (laranja), *Citrus clementina* (tangerina), *Citrullus lanatus* (melância), *Cucumis melo* (melão), *Cucumis sativus* (pepino), *Fragaria vesca* (morango), *Malus domestica* (maçã), *Morus notabilis* (ameixa chinesa), *Musa acuminata* (banana), *Passiflora edulis* (maracujá), *Prunus persica* (pêssego), *Prunus mume* (damasco japonês), *Pyrus bretschneideri* (pêra), *Solanum lycopersicum* (tomate), *Vitis vinifera* (uva) e *Ziziphus jujuba* (jujuba), possibilitando grandes avanços na campo da biologia de frutos.

Apesar do avanço alcançado, a compreensão dos mecanismos regulatórios envolvidos nos processos genéticos, moleculares e bioquímicos que medeiam o desenvolvimento e amadurecimento de frutos, especialmente nos metabolismos de etileno, respiração, firmeza, açúcares e ácidos orgânicos é restrito a espécies modelos e ou de grande importância econômica, a exemplo do tomate. Mesmo assim, tal entendimento está ainda longe de ser completamente elucidado (GAPPER *et al.*, 2014). Entretanto, sabe-se que os avanços neste campo estão diretamente atrelados as particularidades contidas nos genomas e transcriptomas de outras espécies frutíferas e genótipos, destacando-se assim a necessidade de novos estudos. Além disso, um maior entendimento depende do desenvolvimento de novas ferramentas de bioinformática capazes de processar quantidades de dados cada vez maiores e de extrair desses dados as informações biológicas mais relevantes.

A genômica funcional engloba as análises de genômica, transcriptômica, metabolômica, proteômica, ionômica e epigenômica. Antes do surgimento das análises transcriptômicas, o estudo da expressão gênica era restrito a um ou alguns poucos genes. No entanto, sabe-se que a nível celular os genes não estão isolados, eles interagem entre si participando de uma complexa rede de expressão e regulação. A análise transcriptômica permite identificar e analisar o perfil de expressão de todos os genes de uma célula ou população de células, em certo estágio de desenvolvimento ou condição de estresse, fornecendo uma visão espacial e temporal da regulação, ao nível transcricional, de todos os metabolismos, simultaneamente (MCGETTIGAN, 2013). Diante da grande quantidade das informações disponíveis, o pesquisador seleciona um ou alguns metabolismos de interesse de estudo para conduzir uma investigação através de uma perspectiva mais ampla e integrada ao todo.

A primeira abordagem transcriptômica foi fornecida pela técnica de microarranjos em *A. thaliana* (SCHENA *et al.*, 1995). Contudo, devido a esta tecnologia ser baseada na hibridização, a análise transcriptômica apresentava as seguintes limitações: necessidade de grande quantidade de RNA total e apenas os genes conhecidos eram identificados. Além

disso, essa abordagem, na maioria dos casos, não permitia diferenciar a expressão de membros da mesma família multigênica (VERK *et al.*, 2013).

Essas dificuldades começaram a ser ultrapassadas em 2008, quando foi publicado o primeiro estudo aplicando a tecnologia NGS no sequenciamento do transcriptoma de levedura (NAGALAKSHMI *et al.*, 2008), técnica essa denominada RNA-seq (sequenciamento de RNA). A técnica de RNA-seq reflete uma série de vantagens, tais como: oferece um perfil de expressão espaço-temporal em larga escala; fornece a sequência dos transcritos totais (anotados ou não); identifica diferentes transcritos da mesma família; e revela variações de *splicing* e polimorfismos em um único nucleotídeo (SNPs, de *Single Nucleotide Polymorphisms*). Além disso, é uma técnica de execução rápida e de custo cada vez mais acessível (MCGETTIGAN, 2013; MUTZ *et al.*, 2013).

Após o sequenciamento do RNA de interesse, dezenas de milhões de fragmentos gerados (*reads*) são alinhados a um genoma de referência para gerar as sequências dos transcritos e/ou informações sobre o perfil de expressão. As ferramentas comumente usadas para alinhamento são os programas TopHat, Bowtie, BWA e STAR. Entretanto, para espécies que não possuem genoma de referência, a exemplo da aceroleira, é feita a montagem *de novo* dos *reads* totais em *contigs*, gerando um transcriptoma de referência, o qual além de fornecer as sequências dos transcritos, permite inferir o perfil de expressão. As principais ferramentas de montagem incluem os programas Trinity, Oases, Trans-ABYSS e SOAPdenovo (MCGETTIGAN, 2013; MUTZ *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, a técnica de RNA-seq utilizando-se de plataformas de sequenciamento da Illumina tem sido predominantemente utilizada para o estudo de transcriptomas e genomas. De modo que, um número cada vez maior de espécies frutíferas de importância e potencial econômico, à exemplo de *Vitis vinifera* cv. Shiraz (uva) (SWEETMAN *et al.*, 2012; GOUTHU *et al.*, 2014); *Citrus sinensis* (laranja) (YU *et al.*, 2012); *Myrica rubra* (FENG *et al.*, 2012); *Mangifera indica* (manga) (WU *et al.*, 2014; DESHPANDE *et al.*, 2017), *Capsicum annuum* (pimenta) (MARTÍNEZ-LÓPEZ *et al.*, 2014) e *Ananas comosus* (abacaxi) (ONG *et al.*, 2012), etc., tiveram seus transcriptomas sequenciados e analisados revelando suas particularidades, possibilitando avanços, novos direcionamentos e perspectivas na compreensão dos mecanismos regulatórios do processo de amadurecimento de frutos, e proporcionando informações para um grupo cada vez mais representativo de genótipos e espécies frutíferas.

3 HIPÓTESE

A associação de perfis transcriptômicos da acerola à dinâmica metabólica do ascorbato, etileno, CO₂ e firmeza auxilia na identificação de genes candidatos a regulação de tais metabolismos durante o amadurecimento da acerola.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Analisar o perfil transcriptômico de frutos (verde, intermediário e maduro) de aceroleira confrontando-o às alterações metabólicas das quantidades do ascorbato, etileno, CO₂ e firmeza durante o amadurecimento.

4.2 Objetivos Específicos

- Mensurar os perfis de ascorbato, etileno, CO₂ e firmeza durante o amadurecimento da acerola;
- Identificar os transcritos totais e diferencialmente expressos (TDEs) envolvidos no processo de amadurecimento dos frutos, bem como em folhas e flores através do sequenciamento do RNA mensageiro total (RNA-seq);
- Fornecer a anotação funcional de transcritos totais e TDEs, bem como identificar as vias metabólicas atribuídas aos TDEs durante o amadurecimento da acerola;
- Relacionar os perfis dos transcritos diferencialmente com a dinâmica metabólica do ascorbato, etileno, CO₂ e firmeza durante o amadurecimento;
- Validar os resultados de expressão obtidos na análise transcriptômica através da técnica de PCR quantitativo (qPCR).

5 MATERIAL E MÉTODOS

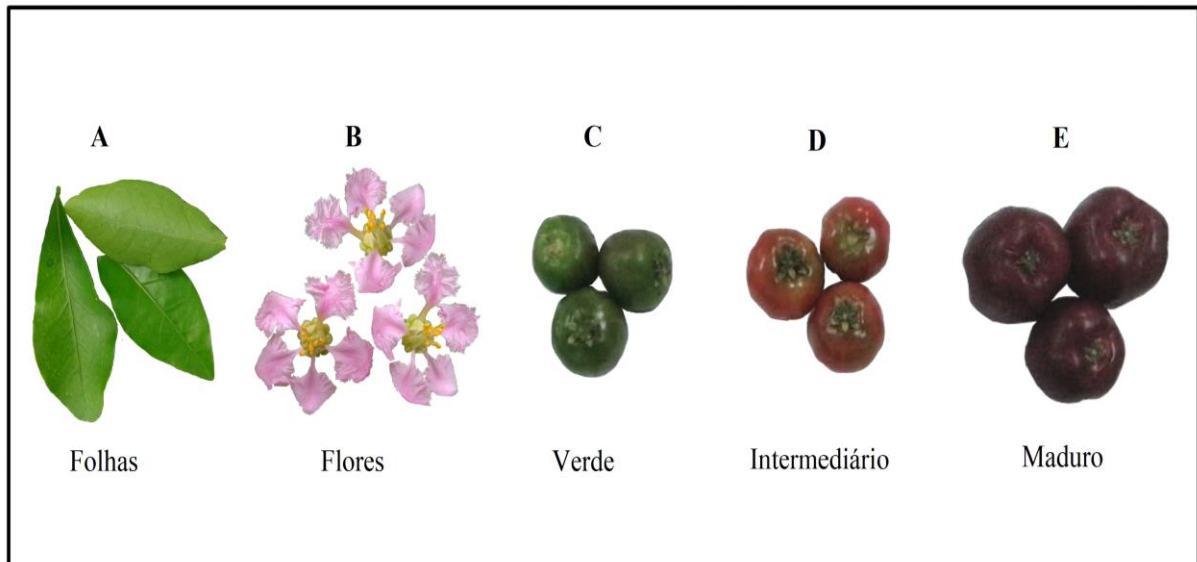
5.1 Material vegetal

A cultivar comercial BRS 235 (Apodi) mantida na fazenda experimental, localizada em Pacajus, e pertencente a Embrapa Agroindústria Tropical, Ceará, Brasil foi selecionada para estudo. Clones dessa cultivar foram propagados por enxertia e estabelecidos no campo em uma única linha, no ano de 2012. O solo da área plantada é do tipo arenoso. A classificação do clima é Aw segundo a Köppen e Geiger.

Inicialmente, conduziu-se um experimento piloto da marcação de flores e acompanhamento do desenvolvimento dos frutos no intuito de definir e padronizar estádios de desenvolvimento do fruto de interesse deste estudo (Dados não mostrados). No período da realização do experimento as plantas encontravam-se na ausência de irrigação e adubação, apresentando a mesma idade e sob as mesmas condições de cultivo. O experimento para coleta consistiu da marcação de 3.000 flores em seis indivíduos, cerca de 250 flores por indivíduo. Todas as amostras foram colhidas em maio de 2016, entre os horários de 08:30 às 9:30 h da manhã. Durante o período de experimentação, a precipitação média foi de 43 mm, a temperatura média variou de 22,77 °C a 32,46 °C, enquanto a umidade relativa média do ar foi de 80,29%. Fonte: Funceme e EMBRAPA.

Amostras de frutos em três estádios de desenvolvimento distintos: em torno de 12 (verde), 16 (intermediário) e 20 (maduro) dias após a antese (DAA) foram colhidos de seis indivíduos diferentes (Figura 2). Para cada estágio de interesse, um conjunto de 10 frutos, em triplicatas biológicas, foram colhidos e padronizados no momento da colheita pelo tamanho e pela cor da película. Em seguida, os frutos foram transportados para o Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática da Universidade Federal do Ceará, onde foram lavados com água destilada e as polpas foram separadas das sementes, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até o momento das análises de transcritos e metabólitos. Além disso, amostras de folhas jovens completamente expandidas e flores em triplicatas biológicas foram colhidas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas sob as mesmas condições anteriormente descritas para os frutos (Figura 2).

Figura 2 – Amostras de folhas, flores e frutos de aceroleira nos estádios verde (12 DAA), intermediário (16 DAA) e maduro (20 DAA) usadas para o sequenciamento de RNA.



Fonte: elaborada pelo autor.

5.2 Determinação da firmeza dos frutos

A firmeza dos frutos foi mensurada pelo teste de firmeza de Newton (N) com o auxílio de um penetrômetro manual (FT02) utilizado para perfurar a polpa do fruto. A análise foi realizada com uma amostra de 20 frutos para cada estágio de desenvolvimento e as medidas feitas em duas regiões diferentes de cada fruto.

5.3 Quantificação do etileno e dióxido de carbono (CO₂)

Os perfis de etileno e CO₂ nos três estádios de desenvolvimento dos frutos foram determinados usando um Cromatógrafo a Gás acoplado ao Espectrômetro de Massa (CG/EM-QP2010, Shimadzu, Tóquio, Japão), seguindo as mesmas condições de análise estabelecidas por Freitas *et al.* (2018). Em cada estágio, triplicatas de 10 frutos intactos foram armazenados em vasilhas plásticas, seladas e contendo um septo, sob a temperatura de 20 °C. Paralelamente, triplicatas de recipientes selados e armazenados sob as mesmas condições, porém na ausência de frutos, foram utilizados como controle negativo. Após 1 h, 200 µL de gás foram coletados usando uma seringa e injetados através de uma coluna RTX-5MS 30 m x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 µm de espessura de filme (Restec, Bellefonte, EUA) em modo Split 1:500. O gás hélio foi utilizado como a fase móvel à um fluxo constante de 0,86 mL/min durante 3 min. As seguintes temperaturas: estufa (60 °C), injetor (150 °C), interface e fonte de

íons (200 °C) foram selecionadas e mantidas constantes. Para determinar as concentrações de cada gás foram estabelecidas curvas padrão usando concentrações de etileno entre 50 e 300 μmol e CO_2 entre 200 e 1.700 μmol .

5.4 Extração e quantificação do ácido ascórbico

O ácido L-ascórbico (AAs) foi extraído de polpa de frutos (verdes, intermediários e maduros), folhas e flores e determinado conforme descrito por Plaza *et al.* (2011), com algumas modificações. Resumidamente, 0,3 g de polpa e 0,6 g de amostras congeladas de folhas jovens completamente expandidas e flores foram maceradas, homogeneizadas com 20 mL de solução extratora aquosa preparada com ácido metafosfórico a 0,3% e ácido acético a 0,8% e, em seguida, completadas para 50 mL com água ultrapura. Para quantificar o ácido ascórbico reduzido, a mistura resultante foi filtrada através de um filtro de membrana de 0,45 μm e transferida para frascos de 0,2 μL . Para determinar o ácido ascórbico total (AAs reduzido + desidroascorbato – DHA) de cada amostra, 200 μL da solução filtrada foram armazenados com 100 μL de ditiotreitol (1 M) por 1 h. Todos os procedimentos de preparação e análise das amostras foram realizados no escuro.

Em seguida, alíquotas de 10 μL de ambas os conjuntos de amostras (ácido ascórbico reduzido e total) foram injetados no Cromatógrafo à Líquido de Alta Eficiência (CLAE) usando uma coluna *Shim-pack CLC-ODS C18, reverse phase* [(4,6 mm i.d. x 15 cm, 5 μm) (Shimadzu, Tokyo, Japan)] com temperatura ajustada para 30 °C. A fase móvel consistiu da eluição isocrática de uma solução de ácido sulfúrico à 0,01% (pH = 2,5) a um fluxo constante de 1 mL/min. As corridas foram monitoradas no espectro de absorção da luz ultravioleta visível a 245 nm. Todas as amostras foram extraídas e analisadas em triplicatas biológicas. As concentrações de AAs reduzido e total foram determinadas através da calibração de uma curva padrão usando concentrações entre 10 e 250 $\mu\text{g/mL}$. As concentrações finais de AAs foram expressas em mg por 100 g de massa fresca ($\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ MF). Os conteúdos de desidroascorbato foram calculados a partir da diferença entre o AAs total e o AAs reduzido.

5.5 Análise transcriptômica (RNA-seq)

5.5.1 Extração e análise do RNA total

A extração de RNA total da polpa de frutos, folhas e flores de aceroleira foi feita utilizando o "kit" "*RNeasy Plant Mini Kit*" (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante. Para remover possível contaminação por DNA genômico,

adicionou-se à coluna DNase fornecida pelo Kit *RNAase Free DNase Set* (Qiagen, Hilden, Alemanha), como um passo adicional de digestão, durante a etapa de purificação.

Em seguida, a concentração do RNA total foi estimada por espectrofotometria usando Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA) no comprimento de onda de 260 nm. A pureza do RNA extraído foi aferida a partir da razão 260/280 nm de absorbância, utilizada para identificar contaminações por proteínas (valores ideais entre 1,8 a 2), e através da razão 260/230 nm, utilizada para verificar contaminações por polissacarídeos (valor ideal > 2). A integridade das bandas foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,5% e revelado com uma solução de brometo de etídeo em transiluminador na região ultravioleta. O RNA total extraído foi armazenado em *freezer* -80 °C. Posteriormente, a quantidade e a qualidade do RNA para sequenciamento foi também confirmada através do *Bioanalyzer* 2100 (Agilent, Santa Clara, CA, EUA), que avalia o número de integridade do RNA (RIN). Os valores de RIN variam de 1 a 10 e foram calculados a partir da razão 28S:18S das subunidades do RNA ribossômico. Valores de RIN superiores a 7 são sugeridos, pois indicam alta integridade do RNA total.

5.5.2 Construção das bibliotecas de cDNA e sequenciamento

Nove bibliotecas de cDNA, representativas de polpas de frutos aos 12 (verde), 16 (intermediário), 20 (maduro) DAA e folhas jovens em duplicatas biológicas, bem como uma única biblioteca de flores foram preparadas e sequenciadas pela equipe da empresa MacroGen (Humanizing Genomics, Seoul, Coreia do Sul) usando o *Illumina TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2*, de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente, o RNA mensageiro (mRNA) foi selecionado pela cauda poli (A) a partir de 1 µg de RNA total, utilizando-se esferas magnetizadas recobertas por Oligos Poli(T). Em seguida, o mRNA obtido foi fragmentado na presença de tampão de fragmentação 5X (contendo cátions divalentes), sendo a mistura submetida à 94 °C por 5 min.

Logo após, os fragmentos de mRNA foram utilizados como moldes para a síntese da fita complementar de cDNA usando iniciadores randômicos, actinomicina D e o kit da *ImProm-IITM* Transcriptase Reversa (Promega, EUA). A segunda fita de cDNA foi sintetizada utilizando as enzimas DNA polimerase I e RNase H. Em seguida, as enzimas T4 DNA polimerase e Klenow DNA polimerase foram utilizadas para obtenção de extremidades abruptas nesse cDNA. Uma adenina (A) foi adicionada à extremidade 3' dessas moléculas utilizando a enzima Klenow exonuclease. Posteriormente, foram ligados adaptadores

presentes no kit *Illumina TruSeq RNA Sample Preparation v2* para amplificação e sequenciamento do cDNA. Fragmentos de 280 a 300 pb correspondentes ao cDNA ligado aos adaptadores foram separados dos adaptadores não ligados por eletroforese em gel de agarose 2%.

Finalmente, as bibliotecas foram enriquecidas através de 15 ciclos de PCR de ponte em fase sólida utilizando-se iniciadores complementares às sequências dos adaptadores. A concentração e a qualidade das bibliotecas de cDNA foram verificadas utilizando o *Bioanalyzer 2100* equipado com um *chip* específico para DNA. Por fim, as bibliotecas enriquecidas foram reunidas em concentração equimolar para sequenciamento de fragmentos de 100 pb no modo “ambas as extremidades” (do inglês, *paired-end*) utilizando o kit *Truseq SBS v4* e a plataforma de sequenciamento *Illumina* modelo HiSeq 2500 (*Illumina*, San Diego, CA, EUA). O presente projeto de sequenciamento foi depositado no banco de dados SRA (do inglês, *Sequence Reads Archive*) do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>), sob o número de acesso PRJNA473364.

5.5.3 Processamento das reads brutas e montagem de novo

As sequências de 100 pb provenientes do sequenciamento são chamadas de leituras ou *reads*. Para remover as sequências de adaptadores ligados as leituras sequenciadas, bem como as bases de baixa qualidade ($Q < 25$ e leituras de comprimento < 90 pb) usou-se o programa *Trimmomatic v.0.32* (BOLGER *et al.*, 2014). A qualidade das leituras resultantes foi confirmada através da análise feita com a ferramenta *FastQC* (ANDREWS, 2010).

Em virtude da ausência de um genoma de referência para a aceroleira (*M. emarginata*) conduziu-se a montagem *de novo* das leituras em *contigs* usando parâmetros padrão do programa *Trinity v.2.4.0* (GRABHERR *et al.*, 2011). Foi feita a montagem do transcriptoma de frutos em cada estágio de desenvolvimento, separados e juntos, bem como de folhas jovens e flores separados. Para gerar um transcriptoma com número de identificação comum e aumentar a probabilidade de obter a sequência completa dos transcritos referentes a cada gene expresso foi feita a montagem do transcriptoma utilizando todas as nove bibliotecas, o qual foi denominado de transcriptoma de referência.

Em seguida, o transcriptoma de referência foi submetido à ferramenta *CD-HIT-est* (LI; GODZIK, 2006) para remover as sequências de transcritos redundantes apresentando identidade $> 90\%$. Posteriormente, as leituras selecionadas previamente com a qualidade requerida foram mapeadas para o transcriptoma de referência não redundante para estimar a

abundância de transcritos e isoformas usando os parâmetros padrão dos programas Bowtie (LANGMEAD *et al.*, 2009) e RSEM versão 1.2.0 (LI; DEWEY, 2011).

O Bowtie é um alinhador de sequências pequenas (< 200 pb) utilizado neste estudo para mapear as leituras ao transcriptoma de referência na ausência de *mismatches* e *gaps* entre as leituras e sua referência. Em seguida, o RSEM utilizou-se do resultado do alinhamento gerado pelo Bowtie para estimar a abundância dos transcritos (número de leituras que mapeou para cada transcrito, em particular).

5.5.4 Anotação dos transcritos

O transcriptoma de referência foi anotado usando os bancos de dados públicos de proteínas: *non-redundant-NCBI* (PRUITT *et al.*, 2005), Swiss-Prot (BAIROCH; BOECKMANN, 1993) e *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* – KEGG (KANEHISA; GOTO, 2000; MORIYA *et al.*, 2007) através da ferramenta BLASTx e usando um *E-value* $\leq 10^{-5}$ (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Transcritos comuns e exclusivamente anotados com cada banco de dados foi sumarizado por meio de um diagrama de *Venn* gerado através da ferramenta *online* VENNY 2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>). Após anotação, as isoformas redundantes representativas do mesmo gene foram removidas manualmente para gerar um *dataset* com a anotação de apenas transcritos únicos. Transcritos anotados com o banco *Nr-NCBI* e denominados de hipotéticos, não caracterizados ou não nomeados foram reanotados com base nos proteomas deduzidos a partir dos genomas de *Hevea brasiliensis*, *Jatropha curcas*, *Ricinus comunis*, *Manihot esculenta*, *Populus euphratica* disponíveis no *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), bem como da *Arabidopsis thaliana* disponível no TAIR 10 (<https://www.arabidopsis.org>).

5.5.5 Identificação dos transcritos diferencialmente expressos (TDEs)

Inicialmente, a contagem do número de fragmentos por transcrito foi normalizada de acordo com o tamanho da biblioteca utilizando o método de normalização contagem por milhão (cpm) presente na *cpm function* do pacote *EdgeR* (ROBINSON *et al.*, 2010). Apenas transcritos com $\text{cpm} \geq 2$ em pelo menos duas amostras foram selecionados para análise de expressão.

Para verificar a identidade e adequação de cada biblioteca para análise de expressão diferencial, previamente foi conduzida uma análise de componentes principais (ACP) baseado no arquivo de contagem gerado após a normalização e a filtragem ($\text{cpm} \geq 2$). A ACP e a

inferência dos transcritos diferencialmente expressos (TDEs) foram obtidas com o pacote *DESeq2* (LOVE *et al.*, 2014). Foram filtrados e considerados como TDEs, apenas transcritos com taxa de falsa descoberta ($FDR < 0,05$) e apresentando $\log_2 \text{fold-change}$ (≤ -1 ou ≥ 1). Foram estabelecidas as seguintes comparações: frutos intermediários (16 DAA) vs. verdes (12 DAA), frutos maduros (20 DAA) vs. verdes (12 DAA), frutos maduros vs. intermediários (16 DAA), frutos verdes vs. folhas e frutos verdes vs. flores. O Pacote *Venn Diagram* (CHEN; BOUTROS, 2011) foi usado para sumarizar os TDEs comuns e exclusivos entre as comparações estabelecidas durante o amadurecimento dos frutos.

5.5.6 Anotação funcional dos transcritos diferencialmente expressos (TDEs)

O arquivo de anotação dos transcritos únicos gerado para o transcriptoma de referência foi utilizado como base para anotação dos TDEs. Para os TDEs ainda não identificados foram feitas buscas no NCBI através dos seguintes bancos de transcritos: *Expressed Sequence Tags* (ESTs), *Transcriptome Shotgun Assembly* (TSA) e *Reference RNA sequence* (Refseq-RNA). Além disso, os TDEs inferidos foram categorizados de acordo com a seguinte Ontologia Gênica (OG): componente celular (CC), processo biológico (BP) e função molecular (FM) com o auxílio do *website* agriGO v2.0, selecionando a opção *Singular Enrichment Analysis* (SEA) (TIAN *et al.*, 2017).

O banco de dados KEGG também foi usado para atribuir os TDEs às suas respectivas vias metabólicas usando o anotador automático do servidor KAAS (*KEGG Automatic Annotation Server*) e o método *bi-directional best hit* (<http://www.genome.jp/tools/kAAs/>). O KAAS forneceu a anotação através do identificador automático, o *KEGG Orthology* (KO), além da identificação e das respectivas localizações dos produtos codificados pelos TDEs nas vias metabólicas redirecionadas durante o amadurecimento dos frutos (MORIYA *et al.*, 2007).

5.6 Validação dos dados de RNA-seq por RT-qPCR

5.6.1 Seleção dos genes para a validação e o desenho dos iniciadores

Para validar os resultados de expressão gerados pela análise de RNA-seq, nove TDEs alvo envolvidos em diferentes alterações do metabolismo da acerola tais como: sinalização do etileno, metabolismo do ascorbato e do amido, desmontagem da parede celular e biossíntese de flavonol/antocianina foram submetidos à análise de expressão relativa por RT-qPCR. Além disso, com base no *dataset* contendo as contagens normalizadas para os transcritos ($\text{cpm} \geq 2$),

9 genes de alta estabilidade entre todas as amostras sequenciadas (RNA-seq) foram selecionados e avaliados por RT-qPCR (Tabela 1), no intuito de atender a dois propósitos: selecionar genes de controle endógeno adequados para normalização dos genes de interesse, bem como auxiliar na confirmação dos dados de expressão obtidos por RNA-seq.

Em seguida, as sequências de cDNAs foram identificadas no transcriptoma e anotadas (UTRs 5', 3', ORF e junções éxon/éxon). Para os transcritos codificados por uma família multigênica, os demais membros gênicos foram identificados e anotados para garantir a especificidade dos iniciadores desenhados. O desenho dos iniciadores específicos foi feito, sempre que possível na junção éxon/éxon, usando o programa *Perl primer* v1.1.21 (MARSHALL, 2004) e o *website Oligo analyzer* v.3.1 (www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/). A tabela 1 mostra a anotação, as sequências e as características de amplificação dos iniciadores para os genes selecionados neste estudo.

Tabela 1 – Sequência dos iniciadores, temperatura ótima de anelamento (TA), tamanho do *amplicon* em pares de bases (pb) e anotação de cada gene.

ID do transcrito	Gene	Identificação do gene	Sequência do iniciador (5' - 3')	TA (°C)	Amplicon (bp)
TR_9479_c0_g1	<i>MeRBL*</i>	protein RBL-like (AT3G21060)	Fwd: TTCTTGCTGCTGGGTGTTCTG Rev: TGCGATGACCATACTTTGACCA	69,1	135
TR_11085_c0_g1	<i>MeRCC1*</i>	Regulator of chromosome condensation (AT5G48330)	Fwd: GCTAAGGTGTCGTTTGGATG Rev: CAGTTGATTGTGATTTGCTCC	52,5	147
TR_17861_c1_g4	<i>MeF-box*</i>	F-box family protein (AT5G49610)	Fwd: GATTTCCTCAAAGAACCCA Rev: GAGCAACACAACAATCCA	57,5	167
TR_12263_c0_g1	<i>MeNOB1*</i>	RNA-binding NOB1-like protein (XP_021652778.1)	Fwd: CAAACAAGCAGGGAGATGAC Rev: GACGACCACAAGCAATCAG	61,1	183
TR_14052_c0_g2	<i>MeTGD4*</i>	Trigalactosyldiacylglycerol 4 (XP_021640243.1)	Fwd: GTTCCTCAATCTTCGTCGTCC Rev: TGTCCCAACAATGCCACG	66,5	97
TR_16662_c0_g1	<i>MeU3*</i>	U3 small nucleolar RNA-associated protein 7(XP_021674342.1)	Fwd: GCCCAGAAAAAGTATCCG Rev: GATTGTTTACCGATGCCA	59,8	128
TR_7955_c0_g1	<i>MePA-RNA*</i>	phosphorylated adapter RNA export-like protein (AT3G20430)	Fwd: GGGTTTCTGCTGTAAGTG Rev: GAATTGCTTCTCAAACCTCCT	59,8	184
TR_9521_c0_g1	<i>MePGAL*</i>	proline- glutamic acid/leucine-rich protein (XP_012074676.1)	Fwd: TCAAACAAGGCAAGAAAGAGAG Rev: AACACTGATCGGGACTGG	58,7	102
TR_12242_c0_g1	<i>Merad50-ATPase*</i>	DNA double-strand break repair protein(AT5G4052)	Fwd: TTCCAAAGAGTGCTAAAGAG Rev: CCAGAAAGAGATTGATGTCC	59,8	151
TR_16652_c1_g2	<i>MeGME2</i>	GDP-mannose 3,5-epimerase 2 (ABB53472.1)	Fwd: TGAAATTGAAGGATGGACTG Rev: TAACTGAACTGGTGCTTGA	57,5	132
TR_15784_c1_g1	<i>MeGMP1</i>	mannose-1-phosphate guanylyltransferase 1 (ABB53473.1)	Fwd: TCACAAGAGACTGAACCC Rev: CTCAACTCTCCCAGTAGAC	63,6	242
TR_9063_c0_g1	<i>MeAPX2</i>	ascorbate peroxidase 2, cytosolic (XP_021638321.1)	Fwd: CGAGTTGGGTCTTTGTAGTG Rev: CTTCTCAGCGATTAGTCCTC	57	170
TR_15403_c0_g6	<i>MeCHS1</i>	chalcone synthase 1 (XP_021648729.1)	Fwd: TGTTGAGGAAGTTAGAAGC Rev: GATTTATCACACATTCTCTGG	57,5	183

TR_15336_c0_g6	<i>MeDHFR4</i>	Dihydroflavonol-4-reductase (XP_021667152.1)	Fwd: GAAGTGTTAGAAGGGTAGTG Rev: GATACAAAGTACATCCATCCAG	67	144
TR_15155_c0_g1	<i>MeSS4</i>	starch synthase 4 (XP_021683258.1)	Fwd: AACATGGAGCATTATGGAG Rev: ATCAACAGCCTTATCAACAG	61,8	92
TR_12269_c0_g1	<i>MePG</i>	polygalacturonase-like (XP_021673211.1)	Fwd: TGTTTATCACTCTTTCTGGGTC Rev: CCTTCTCAAATGCCTCAGTATC	61,1	157
TR_11732_c0_g1	<i>MeERF113</i>	ethylene-responsive transcription factor ERF113-like (XP_021678689.1)	Fwd: GAACCTCTTCTCCTGCTG Rev: CATTATCTTGATCTTGCTGCG	57	126
TR_16279_c1_g2	<i>MeEXPA1</i>	expansin A1 (ARA90630.1)	Fwd: CTCGTTTAAGGTCACAAC Rev: TCCGACCATTATATTTGTCC	63,6	182

*Genes de referência

Fonte: elaborada pelo autor.

5.6.2 Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase quantitativo (RT-qPCR)

A extração do RNA total da polpa de frutos, folhas e flores de aceroleira para os ensaios de RT-qPCR foi realizado como descrito no item 5.5.1. A transcrição reversa do mRNA em DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando o *kit Improm II* (Promega, Madison, EUA) de acordo com as recomendações descritas pelo fabricante. A reação consistiu de aproximadamente 0,5 µg de RNA total, 3,0 µL de oligodT₂₄, 2,4 µL de MgCl₂ (25 mM), 1,0 µL de dNTPs (10 mM), 4,0 µL de tampão de reação 5X, 1U da enzima transcriptase reversa. O volume da reação foi ajustado para 20 µL com água ultrapura livre de RNases. A reação de síntese da fita de DNA complementar ocorreu a 42 °C por 1 hora, seguida de um período a 75 °C por 15 min para desnaturação da enzima.

Para as reações de qPCR foram utilizados 4 µL de cDNA a 25 ng/µL; 1,0 µL de cada *primer* a 300 nM (*forward* e *reverse*); 10 µL de GoTaq qPCR *Master Mix* (Promega, Madison, EUA) e 4,0 µL de água ultrapura para um volume final de 20 µL. Todas as reações foram realizadas em triplicatas biológicas e técnicas. Paralelamente, três poços sem cDNA foram incluídos a reação e usados como controle negativo. As reações foram realizadas em um termociclador *RealPlex 4S* (Eppendorf, Alemanha) através da detecção dos níveis de fluorescência do *SYBR Green*. O programa da reação de PCR consistiu de desnaturação inicial do cDNA a 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos térmicos a 95 °C por 15 s; temperatura ótima de anelamento de cada par de iniciadores por 15 s (Tabela 1) e extensão do fragmento a 60 °C por 20 s. Ao final da amplificação dos ciclos de PCR, foi incluída uma etapa adicional de análise da curva de *melting*, para verificar a especificidade de cada iniciador pelo cDNA de interesse.

5.6.3 Análise dos dados de expressão por qPCR

As análises dos dados de fluorescência obtidos foram processadas pelo *Software Realplex*. Os níveis de expressão gênica foram determinados através do número de ciclos de amplificação necessários para a fluorescência emitida pelo *SYBR Green* ultrapassar a linha de base limiar durante a fase exponencial da reação (qPCR), denominado de C_t (*Cycle threshold*). Os C_{ts} utilizados nas análises de expressão foram obtidos através da média aritmética entre as triplicatas técnicas para cada condição e gene.

Posteriormente, os valores brutos de C_t foram importados para o programa qbase^{PLUS} (versão 2.4) e convertidos em dados de expressão relativa utilizando o método do fator de normalização (HELLEMANS *et al.*, 2007). A ferramenta GeNorm disponível no qBase^{PLUS} (VANDESOMPELE *et al.*, 2002) foi usada para confirmar a estabilidade dos genes

candidatos selecionados. Os valores de expressão relativa foram convertidos para *log₂ fold change* (\log_2FC) utilizando a seguinte fórmula: $\text{LOG}(\text{valor de expressão relativa da amostra A;2}) - \text{LOG}(\text{valor de expressão relativa da amostra B;2})$. Em seguida, os resultados em *log₂ fold change* obtidos com as técnicas de RNA-seq e RT-qPCR foram comparados pela correlação de Pearson (r) por meio do *website Free Statistics and Forecasting Software* (https://www.wessa.net/rwasp_correlation.wasp#output).

5.7 Análise estatística

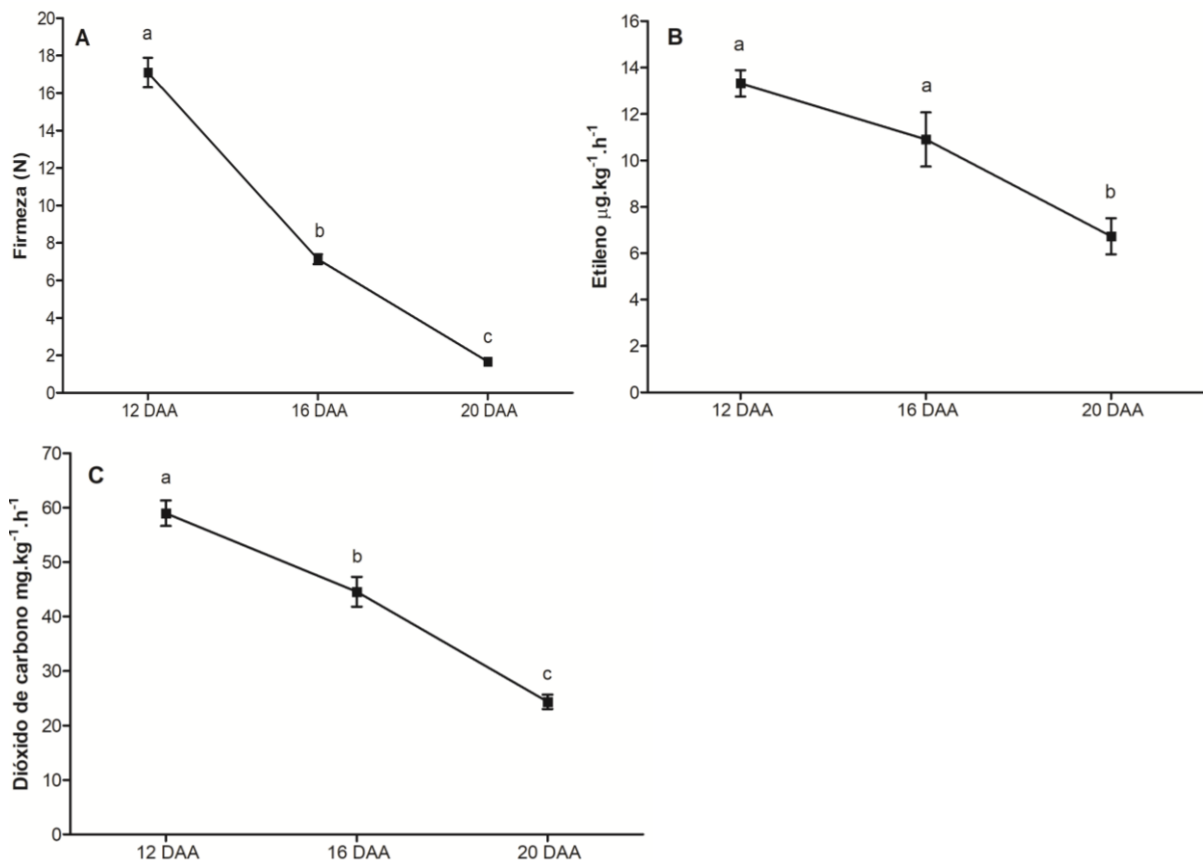
Os valores das mensurações dos metabólitos e da firmeza dos frutos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância 0,05, usando o programa Sisvar v5.6 (FERREIRA, 2014). Os resultados foram expressos com base nos valores da média \pm erro padrão. Diferenças significativas foram representadas por letras diferentes.

6 RESULTADOS

6.1 Alterações na firmeza e nos perfis de etileno e dióxido carbono (CO₂) dos frutos

A firmeza dos frutos reduziu à medida que o amadurecimento avançou. Frutos verdes apresentaram-se firmes (17 N), entretanto reduziu para 7,1 N no estágio intermediário, até atingir um estado muito frágil (1,6 N), quando completamente maduro (Figura 3A).

Figura 3 – Mensuração da firmeza (A), etileno (B) e dióxido de carbono (C) da acerola nos estádios verde (12 DAA), intermediário (16 DAA) e maduro (20 DAA). Letras diferentes destacam a significância estatística ($P < 0,05$) entre os estádios de desenvolvimento dos frutos.



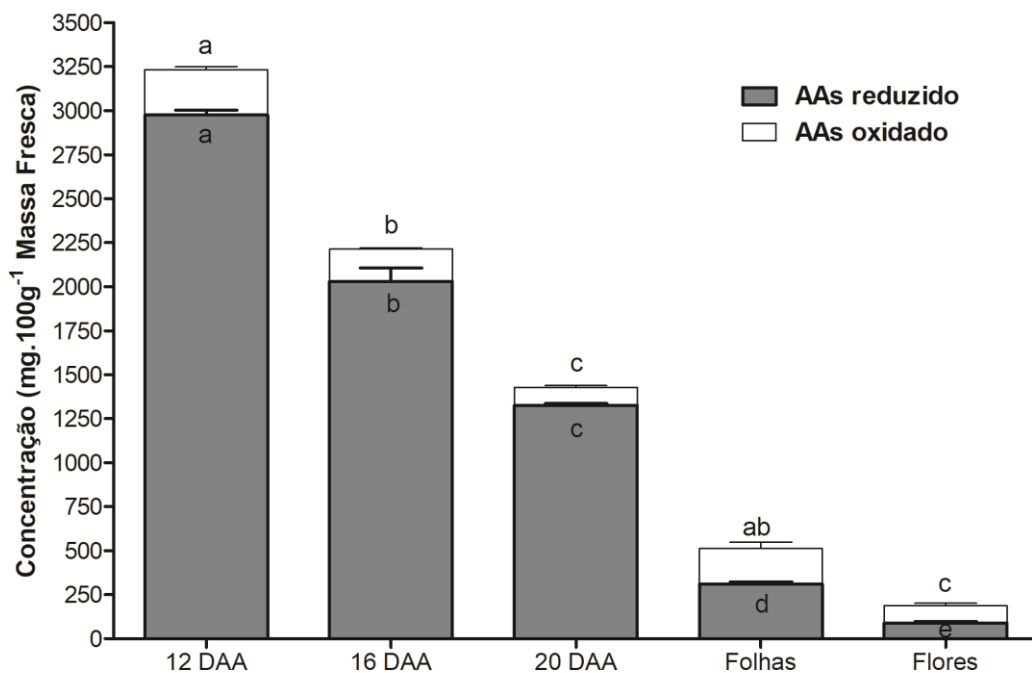
Fonte: elaborada pelo autor.

Tanto o etileno quanto o CO₂ revelaram perfis coincidentes, uma vez que maiores quantidades ($13,3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ e $58,9 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente) foram detectadas em frutos verdes (12 DAA) (Figura 3B-C). Os níveis de etileno e CO₂ reduziram à medida que o amadurecimento do fruto progrediu. Do estágio verde (12 DAA) para o maduro (20 DAA) os níveis de etileno e CO₂ diminuíram cerca de 1,98 e 2,42 vezes, respectivamente. Mesmo assim, vale ressaltar que a diminuição da produção de etileno do estágio verde para o intermediário foi não significativa (Figura 3B).

6.2 Dinâmica do conteúdo de ascorbato em frutos, folhas e flores

A variação nas concentrações de ácido ascórbico (AAs) reduzido, total e oxidado (AAs total – AAs reduzido) foi mensurada em frutos, folhas e flores (Figura 4). O maior conteúdo de AAs reduzido ($2.975 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$) foi verificado em frutos verdes (12 DAA). Durante o amadurecimento, a concentração de AAs diminuiu continuamente até atingir ($1.324,7 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$) em frutos maduros (20 DAA) (Figura 4). Frutos no estágio verde (12 DAA) ao mudar para o intermediário (16 DAA), até atingir o estágio completamente maduro (20 DAA) diminuíram cerca de 31,8 e 55,5%, respectivamente o conteúdo de AAs reduzido. Tais resultados revelaram uma perda de 2,24 vezes nas quantidades de AAs em apenas uma semana. Nas folhas, foi registrada menor quantidade de AAs reduzido ($310,3 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$), entretanto, conteúdo ainda menor foi verificado em flores ($88,3 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$) (Figura 4). Vale ressaltar que o conteúdo de ascorbato em frutos verdes foi 9,59 e 33,8 vezes maior do que aqueles quantificados em folhas e flores, respectivamente.

Figura 4 – Variação nas concentrações de ácido ascórbico reduzido e oxidado (desidroascorbato) da acerola nos estádios verde (12 DAA), intermediário (16 DAA) e maduro (20 DAA), folhas e flores. Letras diferentes destacam a significância estatística ($P < 0,05$) entre os estádios de desenvolvimento dos frutos, folhas e flores para as formas reduzidas e oxidadas.



Fonte: elaborada pelo autor.

Em frutos, a forma oxidada do AAs (desidroascorbato; DHA), variou de 257,4 mg.100 g⁻¹ MF no estágio verde para 103,4 mg.100 g⁻¹ MF no estágio maduro (Figura 4). Mesmo assim, a relação AAs reduzido/AAs total manteve-se elevada e estável (~0,92) nos três estádios analisados. Folhas apresentaram 201,8 mg.100 g⁻¹ MF de DHA, por isso a relação AAs reduzido/AAs total foi moderada e igual a 0,6 (Figura 4). Em flores, a quantidade da forma oxidada (99,8 mg.100 g⁻¹ MF) do AAs foi superior à do ácido reduzido, revelando o baixo estado redox (0,4) desse órgão.

6.3 Transcriptomas de frutos, folhas e flores de aceroleira, com ênfase na modulação do amadurecimento

6.3.1 Avaliação da qualidade do RNA total e das bibliotecas de cDNA construídas

Um total de nove amostras de RNA total foram extraídas de folhas, flores e frutos. De maneira geral, as amostras de RNA total obtidas exibiram quantidade, qualidade e integridade satisfatórias para construção das bibliotecas e sequenciamento. As concentrações de RNA total obtidas por espectrofotometria variaram de 60 a 320 ng/μL (Dados não mostrados). Enquanto, as relações 260/280 e 260/230 exibiram valores próximos aos ideais, indicando pureza satisfatória (item 5.5.1). Além disso, a visualização das bandas de RNA ribossômico em gel de agarose 1,5% demonstraram que as ambas as subunidades 18S e 28S estavam íntegras, revelando a qualidade do RNA total (Dados não mostrados).

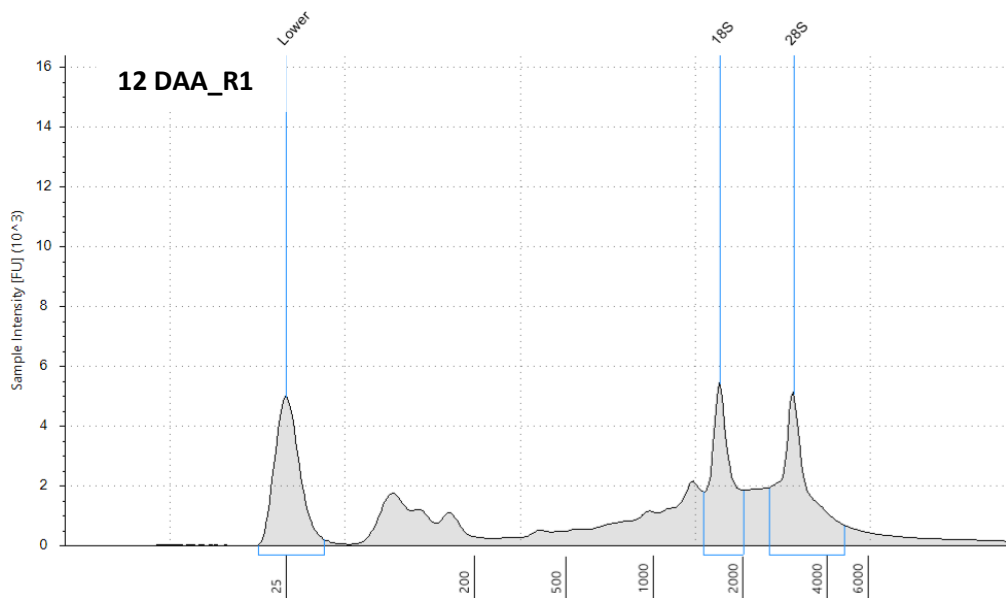
Posteriormente, a quantidade e a integridade do RNA total foram confirmadas pela empresa Macrogen (Humanizing Genomics, Seoul, Coreia do Sul), utilizando o *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies), que afere tais parâmetros com maior exatidão. A concentração do RNA total variou entre 43,14 a 184 ng/μL (Tabela 2). O RIN, por sua vez, foi superior a 7,0 (Tabela 2; Figura 5), exceto para as amostras provenientes de folhas jovens (RIN – 6,2 e 6,7). De acordo com o padrão de qualidade estabelecido pela Macrogen, RIN > 7,0 é satisfatório para a etapa de preparação da biblioteca, pois indica baixa taxa de degradação do RNA (Figura 5). Embora as amostras de folhas não tenham apresentado o menor RIN requerido, ressalta-se que todas as amostras de RNA resultaram em bibliotecas de excelente qualidade. As concentrações das bibliotecas apresentaram valores de concentrações entre 49,68 e 59,83 ng/μL e tamanho médio dos fragmentos enriquecidos na faixa de 283–294 pares de bases, de forma a atender aos requerimentos necessários para a etapa de sequenciamento (Tabela 2).

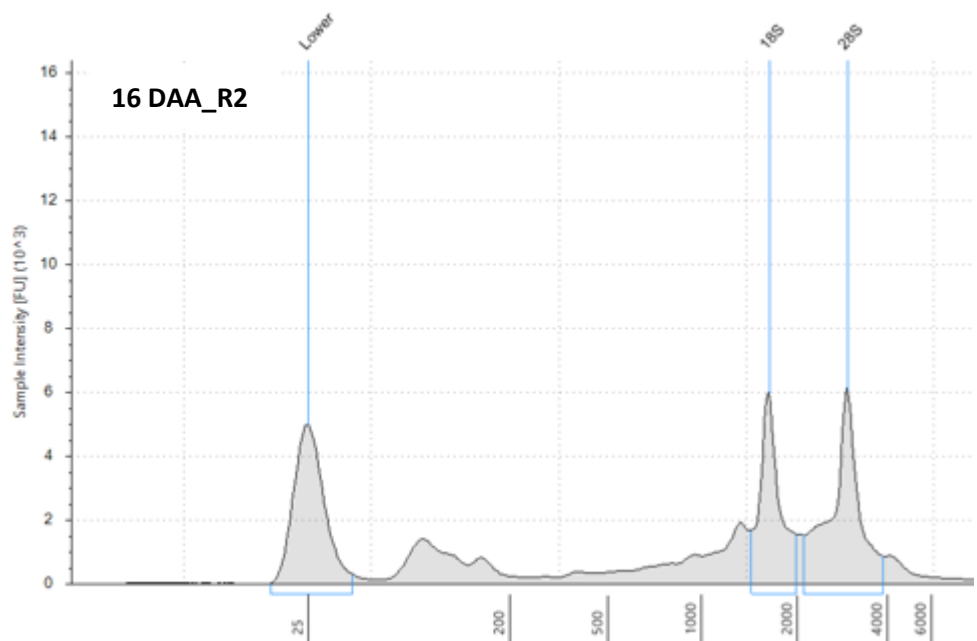
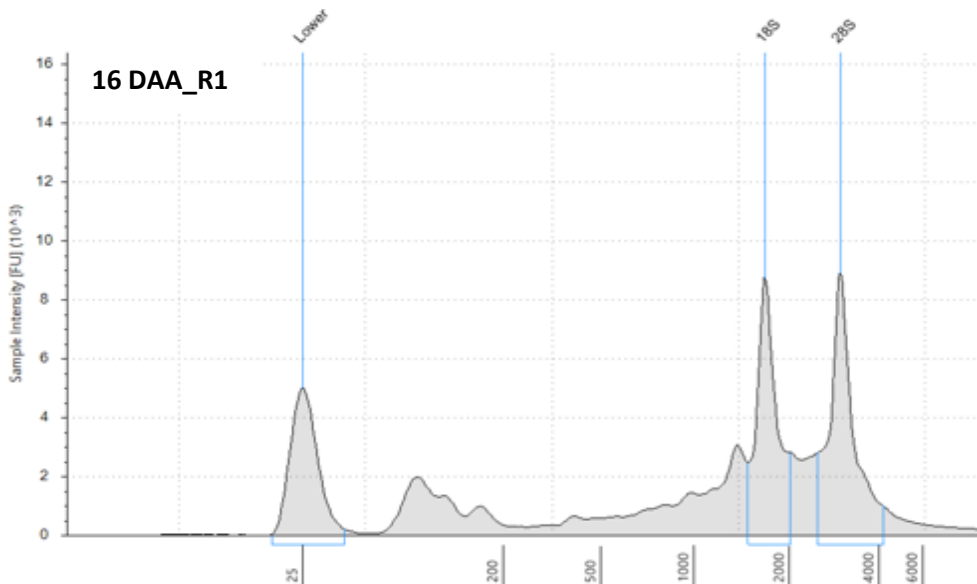
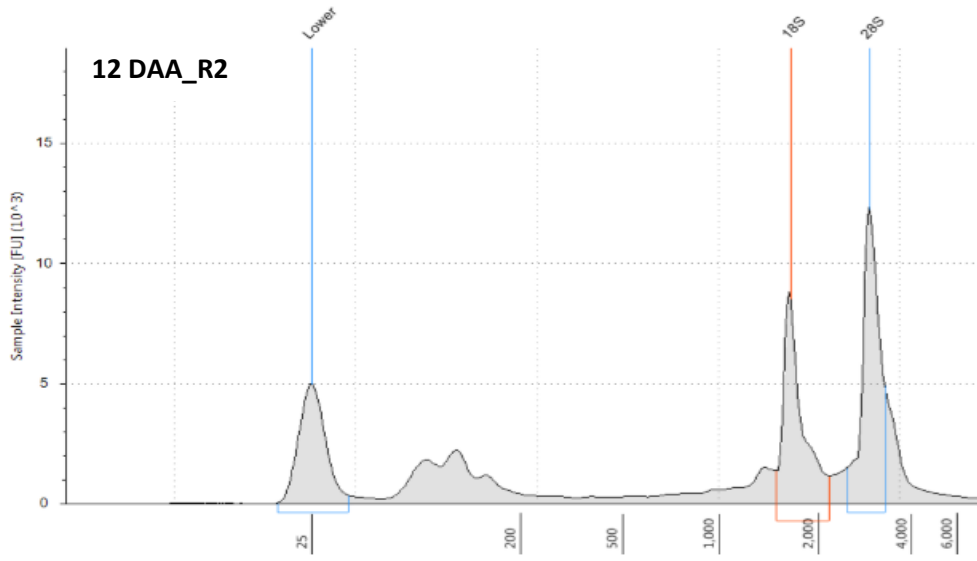
Tabela 2 – Concentração e integridade do RNA total, concentração e tamanho dos fragmentos (pares de bases) das nove bibliotecas de cDNA construídas.

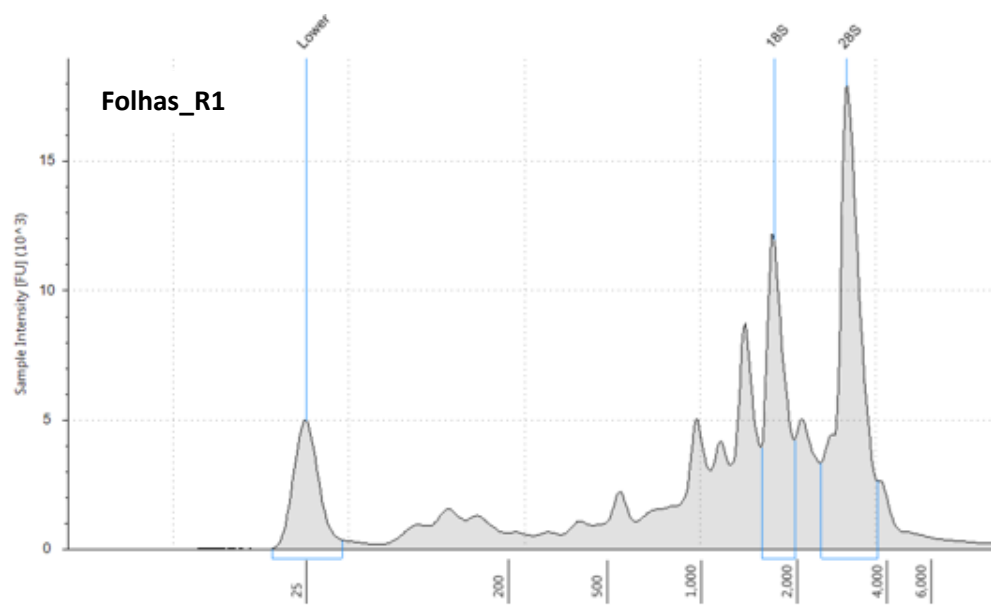
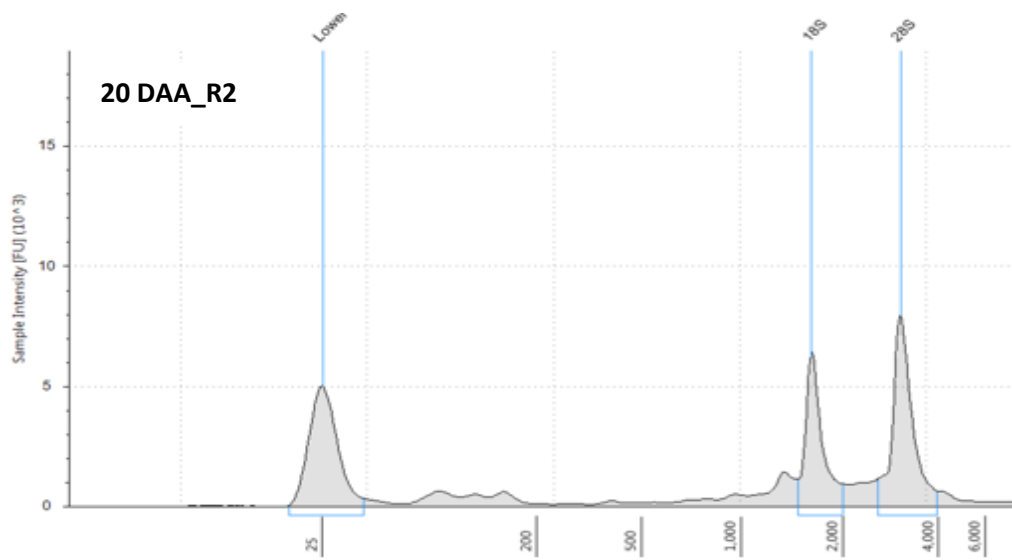
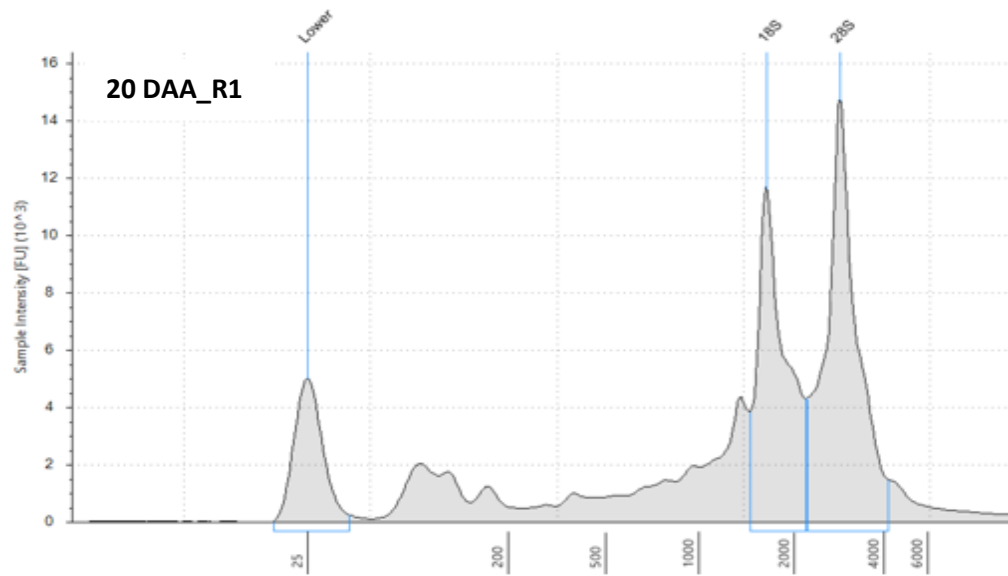
Amostras	Concentração RNA total (ng/μL)	RIN	Biblioteca de cDNA (ng/μL)	Tamanho (pb)
12 DAA_R1	54,84	7,2	52,76	290
12 DAA_R2	54,04	7,6	49,95	291
16 DAA_R1	75,19	8,0	59,01	286
16 DAA_R2	43,14	8,0	56,40	290
20 DAA_R1	108,82	7,9	58,41	290
20 DAA_R2	44,37	9,6	55,47	294
Folhas_R1	183,73	6,2	59,83	293
Folhas_R2	54,49	6,7	59,53	283
Flores	79,69	9,6	49,68	289

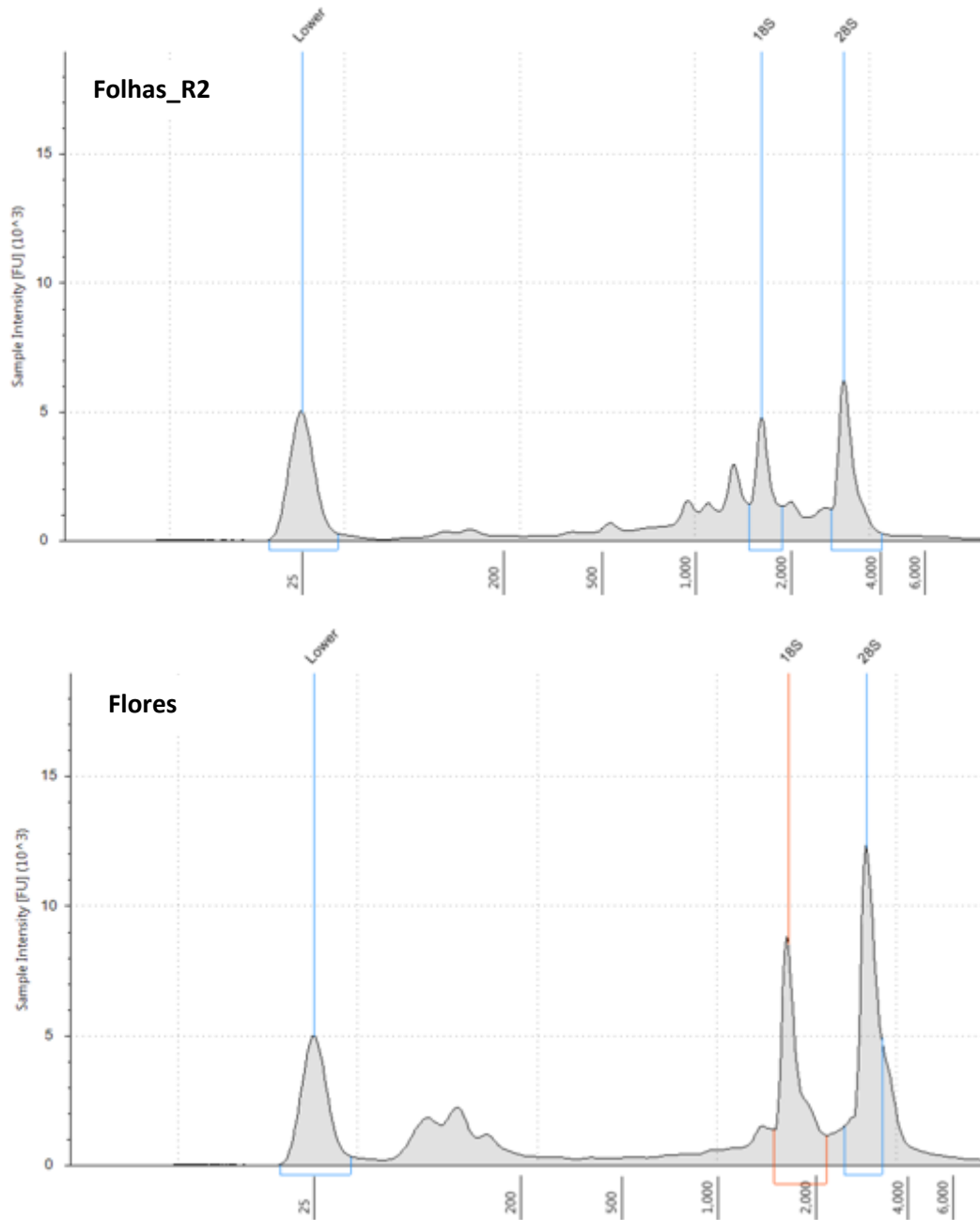
Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 5 – Integridade das subunidades 18S e 28S do RNA ribossômico extraído de frutos em três estádios de desenvolvimento verde (12 DAA), intermediário (16 DAA) e maduro (20 DAA), folhas e flores de aceroleira obtidos através do *Bioanalyzer 2100*.









Fonte: elaborada pelo autor.

6.3.2 Processamento das leituras brutas

O sequenciamento das nove bibliotecas de cDNA de aceroleira gerou um total de 613.177.650 leituras brutas de 101 pb (Tabela 3), que variou de 61.731.230 (16 DAA_R1) a 74.947.522 (flores) leituras entre as bibliotecas. Após a remoção de adaptadores e sequências de baixa qualidade, 547.089.334 leituras, cerca de 89,22%, foram selecionadas com a qualidade requerida. Nesta etapa, o número de leituras variou de 55.192.498 a 66.713.282 entre as bibliotecas (Tabela 3).

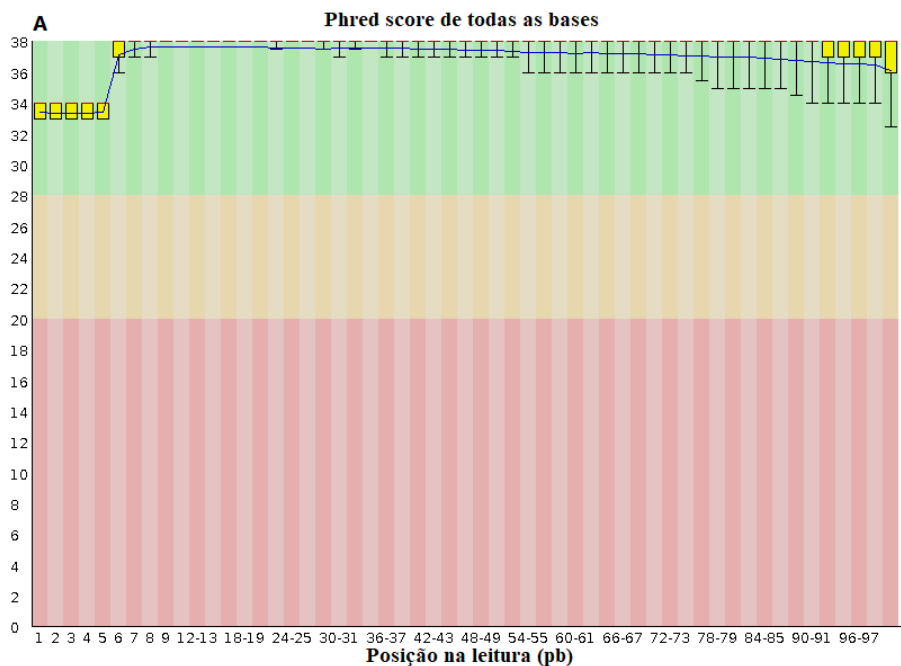
Tabela 3 – Profundidade e qualidade do sequenciamento (RNA-seq) das bibliotecas de frutos, folhas e flores de aceroleira.

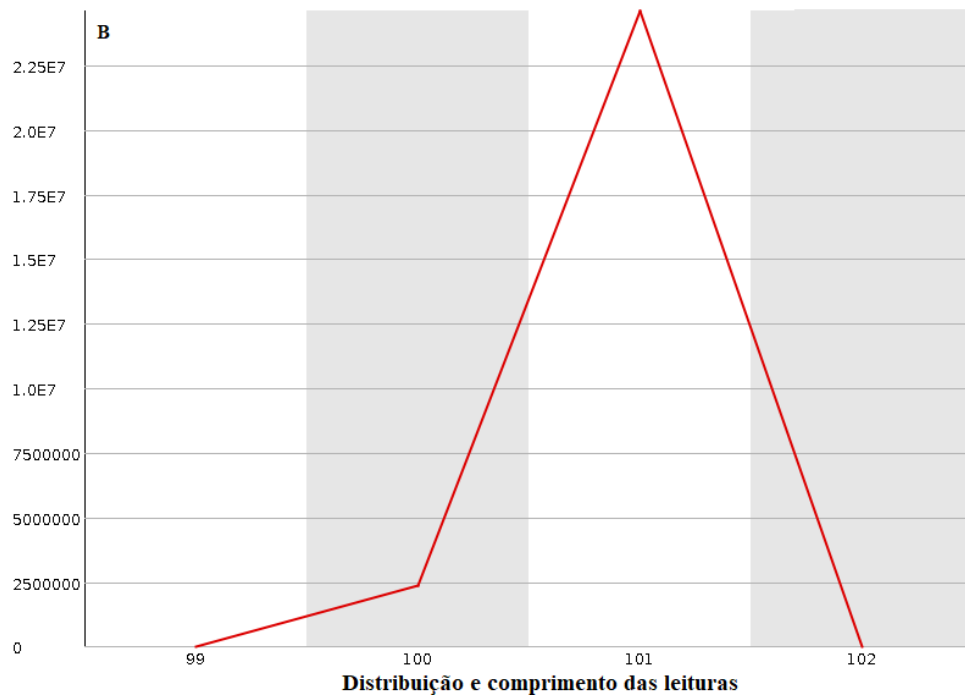
Bibliotecas	Reads brutos	Total de bases pb	Reads de qualidade	Q > 25 (%)
12 DAA_R1	69.963.810	7.066.344.810	62.111.314	88,77
12 DAA_R2	62.932.324	6.356.164.724	56.090.170	89,12
16 DAA_R1	61.731.230	6.234.854.230	55.192.498	89,40
16 DAA_R2	67.988.996	6.866.888.596	60.682.742	89,25
20 DAA_R1	70.051.296	7.075.180.896	62.041.262	88,56
20 DAA_R2	74.310.360	7.505.346.360	66.495.892	89,48
Folhas_R1	67.472.034	6.814.675.434	60.611.728	89,83
Folhas_R2	63.780.078	6.441.787.878	57.150.446	89,60
Flores	74.947.522	7.569.699.722	66.713.282	89,01
Total	613.177.650	61.930.942.650	547.089.334	89,22

Fonte: elaborada pelo autor.

De maneira similar, a análise da qualidade das leituras revelou que os fragmentos resultantes, de todas as bibliotecas (547.089.334 leituras), apresentaram *phred score* $Q > 30$ e tamanho de fragmentos maior que 99 pb, majoritariamente 101 pb (Figura 6A-B). O *phred score* $Q = 30$ indica a possibilidade de apenas uma única base errônea em 1.000 pb. Assim, o presente resultado destaca a alta qualidade e a profundidade do sequenciamento, indicando a provável identificação de transcritos pouco expressos e raros nos transcriptomas analisados.

Figura 6 – Qualidade do sequenciamento das bibliotecas de cDNA após a filtragem das sequências de adaptadores e das bases de baixa qualidade. Os gráficos abaixo mostram a qualidade do sequenciamento para a amostra de flor: (A) representa o *phred score* médio por base ao longo da leitura, (B) indica a distribuição do tamanho das leituras.





Fonte: elaborada pelo autor.

6.3.3 Montagem de novo dos transcriptomas

A montagem dos transcriptomas de frutos nos estádios verde, intermediário e maduro gerou um total de 33.388, 27.880 e 40.709 *contigs* (transcritos gênicos), e 50.855, 51.352 e 67.989 isoformas (possíveis *splicings* alternativos), respectivamente (Tabela 4). A montagem dos transcriptomas de frutos nos três estádios de desenvolvimento, folhas e flores separados gerou 48.203, 56.983 e 55.888 *contigs* ao nível de transcritos gênicos e 86.705, 125.845 e 77.462 isoformas (> 200 pb), respectivamente. O comprimento médio dos *contigs* e o N50 variaram de 605 e 1.728 pb em flores a 1.093 e 2.271 pb em folhas, respectivamente, evidenciando a qualidade de cada transcriptoma em particular (Tabela 4). Vale ressaltar que o N50 é um parâmetro estatístico indicativo do tamanho mínimo do *contig* que somado aos *contigs* de tamanho superior, representam a metade do número de bases nucleotídicas do transcriptoma montado.

Tabela 4 – Número de transcritos gênicos, isoformas e estatísticas geradas após a montagem dos transcriptomas de frutos nos três estádios de desenvolvimento (separados e juntos), folhas, flores de aceroleira, transcriptoma de referência (todas as amostras) e não redundante de referência.

Transcriptomas	12 DAA	16 DAA	20 DAA	12 a 20 DAA	Folhas	Flores	Referência	Não redundante
Transcritos	33.388	27.880	40.709	48.203	56.983	55.888	40.998	40.830
Isoformas	50.855	51.352	67.989	86.705	125.845	77.462	135.976	74.348
N50	1.840	2.001	2.041	2.071	2.271	1.728	2.423	2.202
Comprimento médio (pb)	897	852	898	897	1.093	605	1.438	1.112

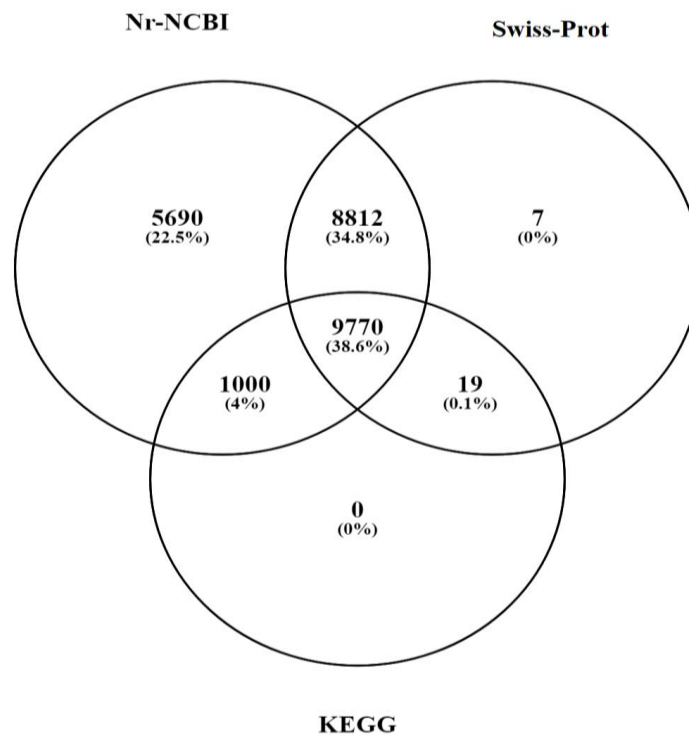
Fonte: elaborada pelo autor.

A montagem do transcriptoma completo incluindo todas as amostras (transcriptoma de referência) forneceu um total de 40.998 *contigs* gênicos e 135.976 isoformas de comprimento ≥ 300 pb (Tabela 4). Posteriormente, a remoção de *contigs* redundantes (identidade $> 90\%$) resultou em 40.830 *contigs* ao nível de transcritos gênicos e 74.348 isoformas, revelando um comprimento médio do tamanho dos fragmentos de 1.155 pb e N50 de 2.202 pb (Tabela 4), indicativo da boa qualidade do transcriptoma de referência montado.

6.3.4 Anotação dos transcritos

Um total de 25.298 transcritos únicos (aproximadamente 62%) foram anotados com os bancos de dados públicos de proteínas: *non-redundant* (Nr-NCBI), Swiss-Prot e KEGG através do BLASTx e considerando um *E-value* de corte $\leq 10^{-5}$ (Figura 7). Vale ressaltar que, destes, praticamente todos os transcritos (25.272) foram anotados com o Nr-NCBI. Além disso, 18.608 e 10.789 transcritos puderam ser também anotados pelos bancos Swiss-Prot e KEGG, corroborando com os resultados gerados com o Nr-NCBI. Aproximadamente 38,6% (9.770) dos transcritos foram anotados pelos três bancos de dados. Outros 34,8% (8.812) e 4% (1.000) dos transcritos foram simultaneamente anotados pelos bancos Nr-NCBI/Swiss-Prot e Nr-NCBI/KEGG, respectivamente (Figura 7).

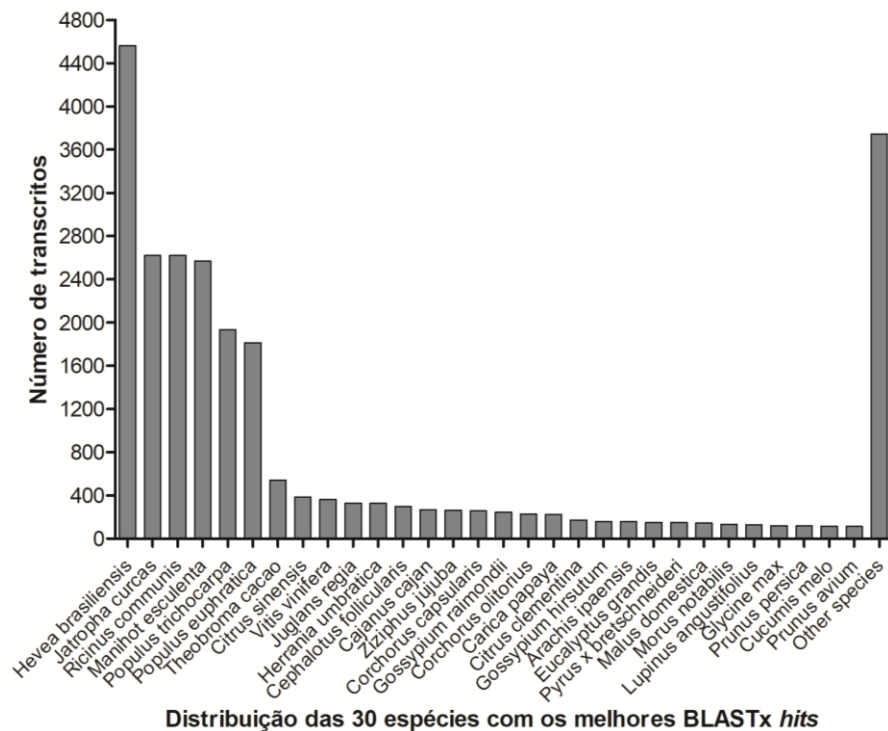
Figura 7 – Diagrama de *Venn* mostrando o número de transcritos totais anotados, comuns e distintos para os bancos de dados Nr-NCBI, Swiss-Prot e KEGG.



Fonte: elaborada pelo autor.

De acordo com a anotação fornecida pelo Nr-NCBI, um maior número de transcritos com os melhores E-valores foram atribuídos às espécies *H. brasiliensis* (4.564), *J. curcas* (2.622), *R. comunis* (2.620), *M. esculenta* (2.570), *P. trichocarpa* (1.934) e *P. Euphratica* (1.814) da mesma ordem taxonômica (Malpighiales) da aceroleira (Figura 8). Juntas, essas espécies possibilitaram a anotação de 53,6% dos transcritos únicos anotados.

Figura 8 – Distribuição das 30 espécies com os melhores resultados estatísticos (BLASTx) para o transcriptoma da aceroleira.



Fonte: elaborada pelo autor.

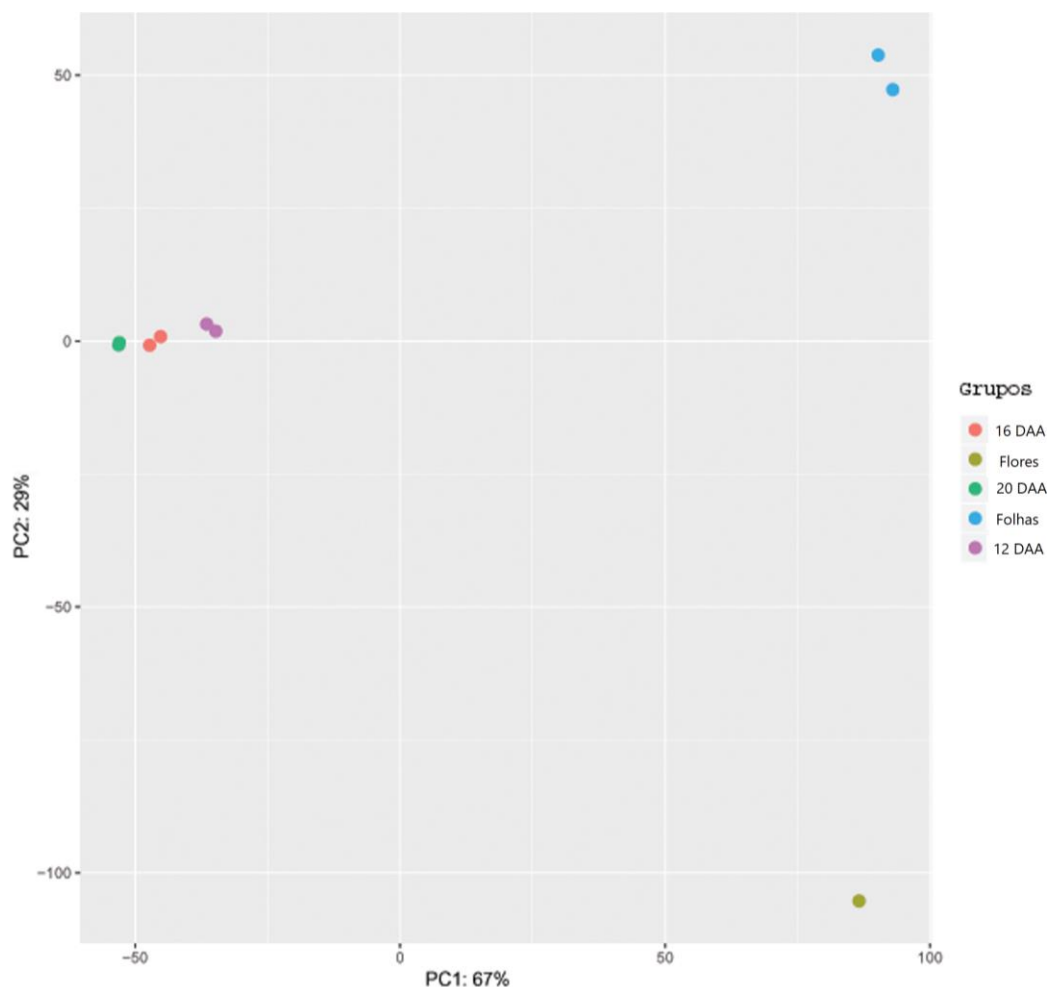
Os resultados da anotação com o banco Nr-NCBI reportaram um grande número de transcritos denominados de hipotéticos, não caracterizados ou não nomeados. Posteriormente, a maioria deles foi re-anotado com base nos proteomas das cinco primeiras espécies da ordem Malpighiales anteriormente mencionadas e *A. thaliana* (TAIR 10). É importante destacar que a *A. thaliana* possui o genoma de referência mais completo e bem anotado entre as espécies vegetais, por isso tem sido uma importante referência utilizada na anotação de novos genomas e transcriptomas. Particularmente, a base de dados TAIR permitiu a anotação de 25.096 transcritos únicos de aceroleira, sendo fundamental na etapa de re-anotação (Dados não mostrados).

6.3.5 Inferência dos transcritos diferencialmente expressos - TDEs

Para aumentar o poder estatístico de inferência de TDEs (diminuir a incidência de falsos positivo), selecionou-se aqueles transcritos com contagem por milhão (cpm ≥ 2) em pelo menos 2 amostras, de modo que apenas 17.545 transcritos únicos foram submetidos à análise de expressão (Dados não mostrados). Em seguida, o *dataset* com 17.545 transcritos foi utilizado para a análise multivariada de componentes principais. Os dois primeiros

componentes principais (ACP1 e 2) explicaram 96% da variação entre amostras e mostrou a formação de três grandes grupos (Figura 9). A ACP1 (67% da variação) discriminou as amostras de frutos, localizadas no eixo negativo, daquelas de folhas e flores localizadas no eixo positivo. A ACP2 (29% da variação), discriminou a amostra de flores (eixo negativo) daquelas de folhas localizadas no eixo positivo deste componente (Figura 9). O grande grupo representado por frutos, formou três subgrupos, nos quais as amostras de frutos no estágio verde foram dipostas mais distantes (divergentes) daquelas de fruto maduro, de modo que as amostras de frutos no estágio intermediário (16 DAA) foi agrupada entre tais extremos, como esperado. A ACP evidenciou que amostras distintas como frutos, folhas e flores apresentam perfil transcricional também distintos. Além disso, revelou que as duplicatas biológicas apresentam proximidade nos seus valores de contagens, corroborando para maior confiabilidade da análise de expressão.

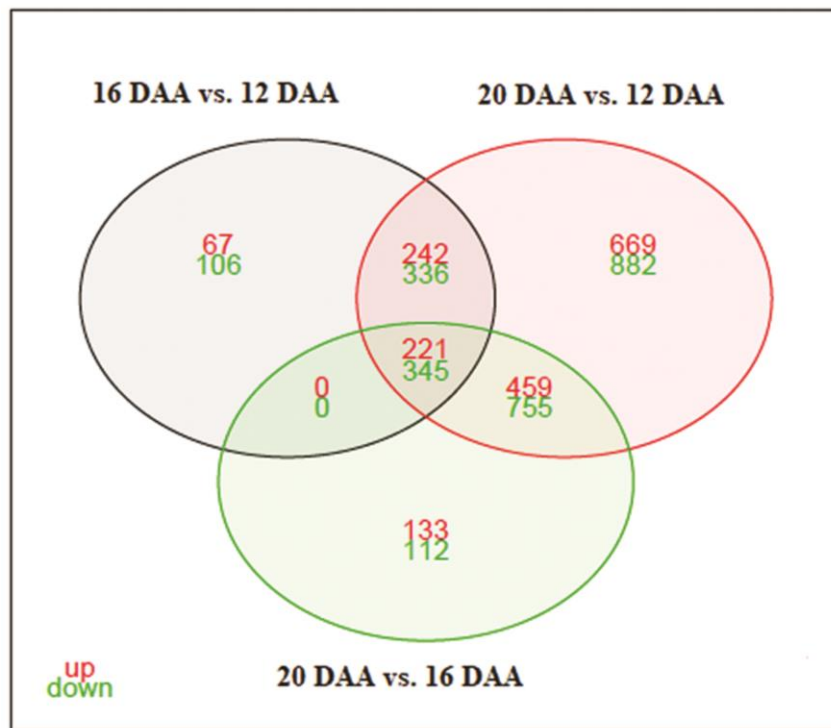
Figura 9 – Análise de componentes principais (ACP1 e 2) das bibliotecas de frutos nos estádios verde, intermediário e maduro, e folhas em duplicatas, bem como para uma biblioteca de flores.



Fonte: elaborada pelo autor.

Um total de 4.326 transcritos foram diferencialmente expressos (TDEs) durante o amadurecimento dos frutos (Figura 10). É importante destacar que, os TDEs com valores de *log₂ fold change* positivos são ditos regulados positivamente ou com expressão aumentada, porém aqueles com valores negativos são ditos regulados negativamente ou com expressão diminuída na comparação estabelecida. A transição de frutos no estágio verde para o intermediário exibiu 530 transcritos regulados positivamente e 787 regulados negativamente (Tabela 5), ou seja, 787 transcritos foram mais abundantes em frutos verdes. Do estágio verde (12 DAA) para maduro (20 DAA), 1.591 transcritos tiveram a expressão aumentada, à medida que 2.318 diminuíram o nível de expressão (Tabela 5). Enquanto, frutos do estágio intermediário para o maduro demonstraram 813 e 1.212 transcritos com a expressão aumentada e diminuída, respectivamente.

Figura 10 – Diagrama de *Venn* com a distribuição de transcritos diferencialmente expressos totais, comuns e exclusivos entre as comparações: frutos intermediários (16 DAA) versus verdes (12 DAA), maduros (20 DAA) versus verdes (12 DAA) e maduros (20 DAA) versus intermediários (16 DAA).



Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 5 – Número de transcritos diferencialmente expressos entre as comparações.

Comparações	Regulados positivamente	Anotados (%)	Regulados negativamente	Anotados (%)
Frutos intermediários vs. verdes	530	505 (95,28)	787	761 (96,69)
Frutos maduros vs. verdes	1.591	1.541 (94,15)	2.318	2.192 (94,95)
Frutos maduros vs. intermediários	813	762 (93,72)	1.212	1.168 (96,36)
Frutos verdes vs. flores	2.811	2.647 (94,16)	3.998	3.751(93,82)
Frutos verdes vs. folhas	4.183	3.950 (94, 42)	5.423	4.943 (91,14)

Fonte: elaborada pelo autor.

Apenas 221 e 345 transcritos regulados positivamente e negativamente foram comuns às três comparações (Figura 10). De maneira interessante, um total de 67, 669 e 133 transcritos regulados positivamente e 106, 882 e 112 regulados negativamente foram exclusivos das comparações de frutos intermediários (16 DAA) vs. verdes (12 DAA), frutos maduros (20 DAA) vs. verdes (12 DAA) e maduros vs. intermediários, respectivamente (Figura 10). Além disso, para identificar TDEs relacionados ao metabolismo do ácido ascórbico e para fornecer uma maior compreensão sobre a regulação desse ácido em outros órgãos, foram estabelecidas comparações entre frutos verdes vs. flores e frutos verdes vs. folhas. Um total de 2.811 e 4.183 transcritos foram regulados positivamente, ao passo que 3.998 e 5.423 foram regulados negativamente em frutos verdes, respectivamente (Tabela 5).

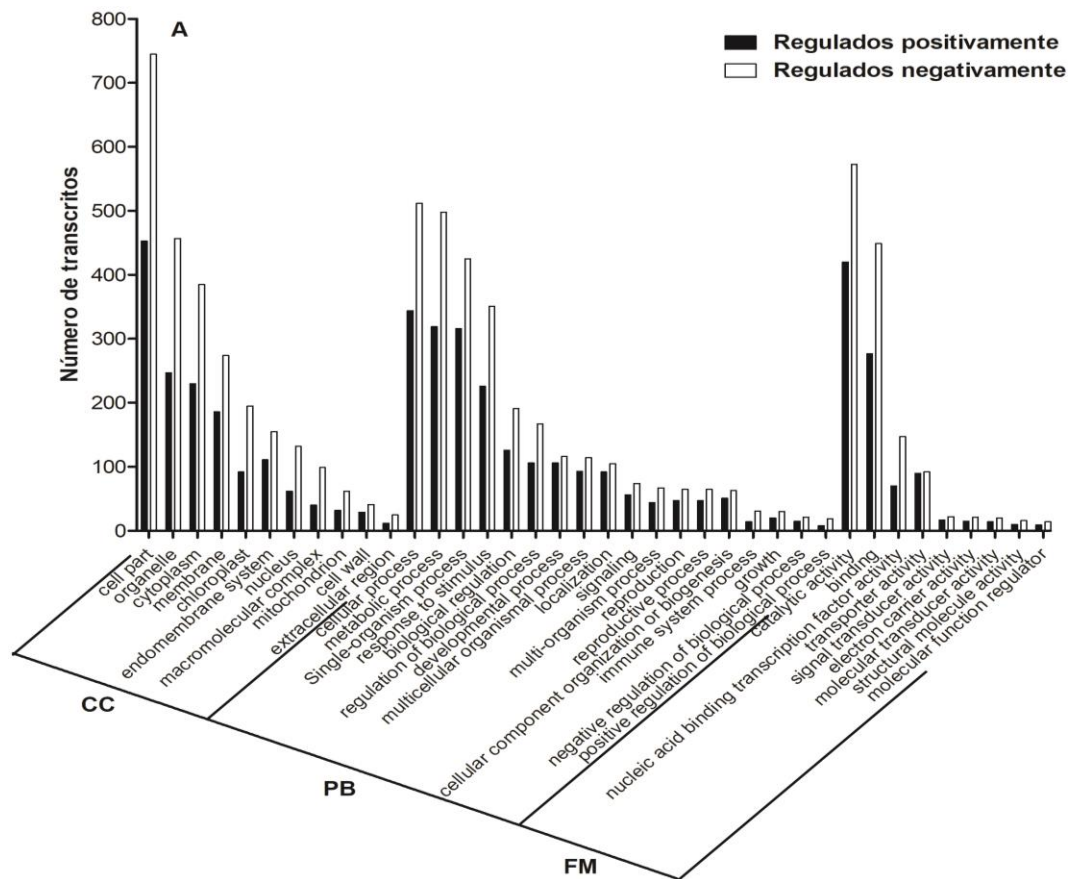
6.3.6 Anotação funcional dos transcritos diferencialmente expressos

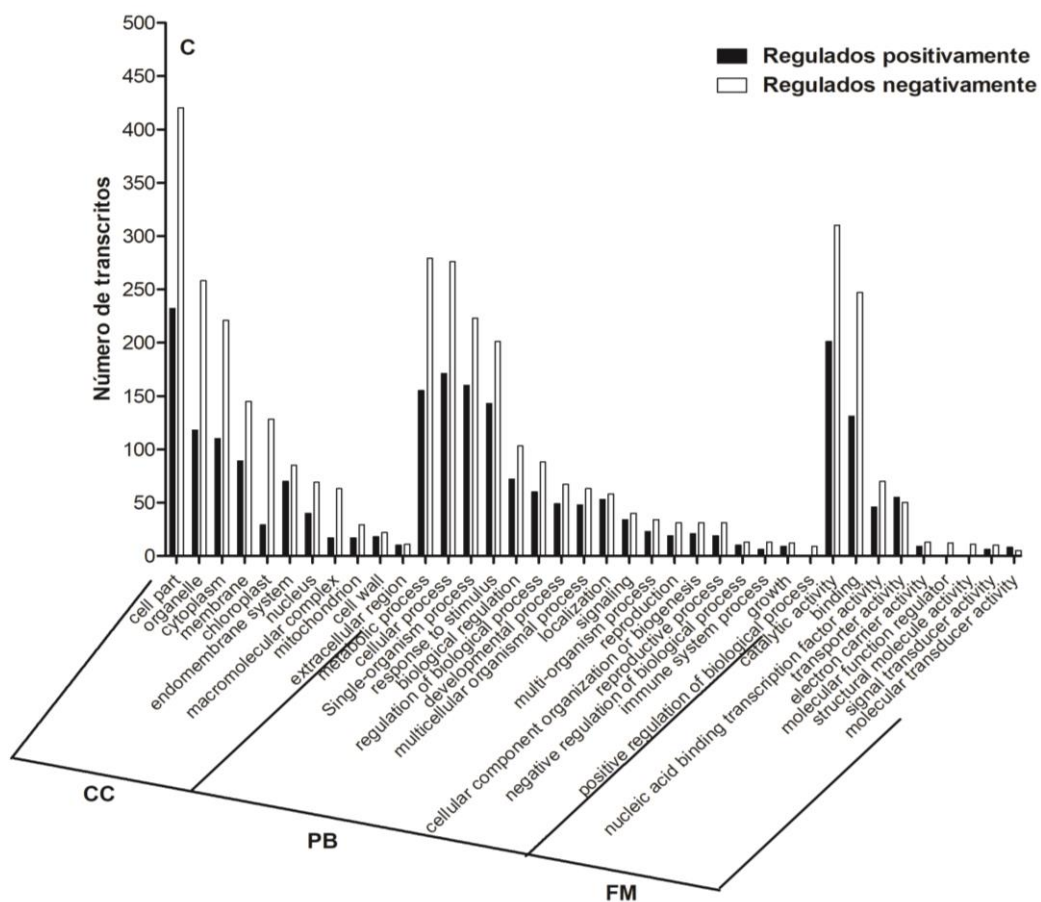
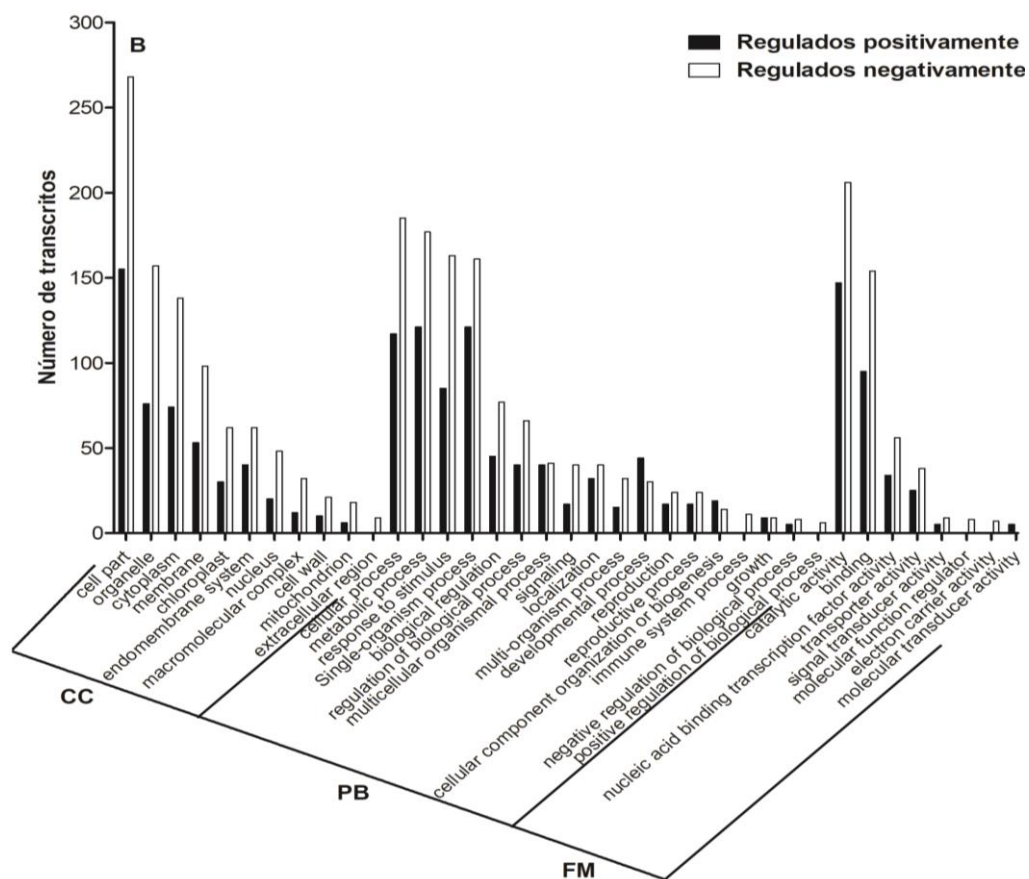
A maioria dos TDEs inferidos foram anotados com base nos resultados gerados pelo Nr-NCBI, bem como através de buscas em bancos de transcritos. De maneira geral, todas as comparações apresentaram uma taxa de identificação e/ou anotação variando de 91 a quase 97% para transcritos modulados positivamente e negativamente (Tabela 5). O presente resultado sugere a qualidade da montagem e anotação do transcriptoma, além disso confirma que os TDEs são transcritos de mRNA.

Para caracterizar as principais alterações funcionais ocorridas durante o amadurecimento dos frutos, os TDEs foram categorizados de acordo com a ontologia gênica. A comparação geral do amadurecimento (frutos maduros vs. verdes) exibiu 1.046 transcritos regulados positivamente e 1.560 negativamente com atribuição funcional para pelo menos uma das três categorias (componente celular, processo biológico e função molecular). Para o componente celular, a maioria dos transcritos regulados positivamente e negativamente foram relacionados a parte da célula (453 e 745 transcritos), organela (247 e 457), citoplasma (230 e 385) e membrana (186 e 274), respectivamente (Figura 11A). A respeito do processo biológico, o processo celular (344 e 512 transcritos), processo metabólico (319 e 498), processo único no organismo (316 e 425) e resposta à estímulos (226 e 351) foram os termos

mais representados, em relação aos transcritos com expressão aumentada e diminuída, respectivamente. A função molecular, foi super-representada pelos termos atividade catalítica (420 e 573 transcritos), ligação (277 e 499), atividade do fator de transcrição de ligação a ácidos nucleicos (70 e 147) e atividade de transportador (90 e 92) (Figura 11A). Em cada categoria, todos os termos atribuídos foram mais representados por transcritos com expressão diminuída, em vista da maior quantidade de genes identificados. É importante destacar que as outras comparações, frutos verdes vs. intermediários e frutos maduros vs. intermediários, seguiram a mesma tendência já destacada na comparação geral (Figura 11B-C).

Figura 11 – Categorização funcional dos transcritos diferencialmente expressos de acordo com o componente celular (CC), processo biológico (PB) e função molecular (FM) para as comparações: (A) frutos maduros versus verdes, (B) intermediários versus verdes e (C) maduros versus intermediários.





Fonte: elaborada pelo autor.

Além disso, TDEs identificados em cada uma das três comparações mapearam para cerca de 140 vias metabólicas das 526 disponíveis no KEGG (Tabela S1). A Tabela 6 apresenta as 50 vias com maior número de EC atribuídos, destacando as principais alterações do metabolismo da acerola durante o amadurecimento. Vale ressaltar que, o direcionamento dos TDEs para essas vias forneceu informações relevantes e de maior confiabilidade para a identificação dos genes e das respectivas vias de interesse neste estudo.

Tabela 6 – As 50 vias metabólicas mais representadas durante o amadurecimento da acerola, de acordo com a Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG). Nas colunas nomeadas “*up*” (regulados positivamente) ou “*down*” (regulados negativamente) é apresentado o número de EC (do inglês, *Enzyme commission number*) atribuídos para cada via de acordo com o tipo de regulação.

Vias do KEGG	Id-KEGG	Intermed. vs. verde		maduro vs. verde		maduro vs. intermed.	
		<i>up</i>	<i>down</i>	<i>up</i>	<i>down</i>	<i>up</i>	<i>down</i>
Photosynthesis	ko00195	0	12	2	19	0	16
Oxidative phosphorylation	ko00190	0	2	4	18	2	8
Plant hormone signal transduction	ko04075	5	14	13	16	14	13
Starch and sucrose metabolism	ko00500	4	8	8	13	7	9
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	ko00630	5	8	7	12	2	7
Purine metabolism	ko00230	3	1	5	12	1	9
Phenylpropanoid biosynthesis	ko00940	4	9	8	12	9	6
Plant-pathogen interaction	ko04626	0	7	5	12	5	5
Photosynthesis - antenna proteins	ko00196	0	7	0	11	0	8
DNA replication	ko03030	0	0	1	11	0	10
MAPK signaling pathway – plant	ko04016	2	10	11	11	10	7
Glycolysis/Gluconeogenesis	ko00010	3	5	12	10	3	7
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	ko00520	2	4	10	9	5	4
Glycerophospholipid metabolism	ko00564	0	2	2	9	2	3
Glycine, serine and threonine metabolism	ko00260	2	6	5	9	3	6
Cysteine and methionine metabolism	ko00270	4	2	8	9	3	6
Protein processing in endoplasmic reticulum	ko04141	2	8	4	9	7	3
Ascorbate and aldarate metabolism	ko00053	0	5	3	8	1	5
Cyanoamino acid metabolism	ko00460	0	5	2	8	3	5
Glutathione metabolism	ko00480	2	1	4	8	3	4
Fructose and mannose metabolism	ko00051	2	3	5	7	2	3
Pyruvate metabolism	ko00620	2	3	10	7	2	5
Glycerolipid metabolism	ko00561	3	1	7	7	3	4
Pyrimidine metabolism	ko00240	1	0	4	7	1	7
Porphyrin and chlorophyll metabolism	ko00860	1	3	4	7	1	5
Pentose phosphate pathway	ko00030	3	2	7	6	3	2
Galactose metabolism	ko00052	1	2	6	6	2	6
Steroid biosynthesis	ko00100	2	3	3	6	2	3
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	ko01040	1	2	3	6	1	4
Arginine and proline metabolism	ko00330	3	3	7	6	1	3
Cutin, suberine and wax biosynthesis	ko00073	2	1	2	5	0	4

Tryptophan metabolism	ko00380	2	3	5	5	1	5
Brassinosteroid biosynthesis	ko00905	0	2	1	5	1	3
Ribosome	ko03010	2	1	2	5	0	4
Fatty acid elongation	ko00062	1	3	2	4	1	3
Fatty acid degradation	ko00071	2	2	4	4	0	4
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	ko00250	4	2	7	4	2	2
Tyrosine metabolism	ko00350	3	2	6	4	3	5
Phenylalanine metabolism	ko00360	5	2	7	4	4	3
Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	ko00130	3	1	4	4	2	3
Flavonoid biosynthesis	ko00941	7	4	8	4	7	1
Citrate cycle (TCA cycle)	ko00020	1	1	6	3	1	2
Valine, leucine and isoleucine degradation	ko00280	4	1	11	3	2	2
Terpenoid backbone biosynthesis	ko00900	3	2	8	3	3	3
Inositol phosphate metabolism	ko00562	2	2	4	2	0	2
Fatty acid biosynthesis	ko00061	2	0	5	2	1	2
Carotenoid biosynthesis	ko00906	3	0	5	2	2	2
Anthocyanin biosynthesis	ko00942	1	2	1	2	1	1
Nicotinate and nicotinamide metabolism	ko00760	1	0	2	1	2	0

Fonte: elaborada pelo autor.

As vias da fotossíntese (ko00195) e de proteínas da antena/fotossíntese (ko00196) foram desligadas durante o amadurecimento, visto que o número de EC atribuídos diminuiu drasticamente até frutos maduros (Tabela 6). Por outro lado, as vias de biossíntese de flavonóides (ko00941), biossíntese de antocianinas (ko00942) e biossíntese de carotenóides (ko00906) apresentaram-se mais ativas à medida que a cor alterou de verde (12 DAA) para vermelha (20 DAA). As vias da glicólise/gliconeogênese (ko00010), pentoses fosfato (ko00030), ciclo do ácido cítrico (ko00020) e metabolismo de piruvato (ko00620) pareceram estar mais ativas em frutos maduros, enquanto a fosforilação oxidativa (ko00190) sugeriu maior atividade em frutos verdes (Tabela 6).

As vias representativas do metabolismo do ascorbato/aldarato (ko00053), do metabolismo da frutose/manose (ko00005) e do metabolismo de amido/sacarose (ko00500) mostraram maior números de EC atribuídos para frutos no estágio verde (Tabela 6). No entanto, em relação a via de transdução de sinal hormonal em plantas (ko04075) e a via de sinalização MAPK (ko04016) mostraram números de EC similares para os transcritos modulados positivamente e negativamente (comparação frutos maduros vs. verdes), revelando a complexidade da regulação hormonal envolvida na maturação da acerola. A via de replicação do DNA (ko03030) esteve mais ativa em frutos nos estádios verde e intermediário, sugerindo regulação negativa do processo de divisão celular durante o amadurecimento (Tabela 6).

6.3.7 Transcritos diferencialmente expressos envolvidos na regulação do metabolismo do ascorbato

Uma investigação detalhada dos transcriptomas de frutos, folhas e flores de aceroleira revelou vários transcritos envolvidos na regulação da biossíntese, reciclagem, degradação e translocação do AAs, quase todos membros de famílias multigênicas (Tabela S2). Um grande número de transcritos foram identificados como TDEs em pelo menos uma das comparações estabelecidas, revelando aparentemente, regulação específica para frutos durante o desenvolvimento, folhas e flores. Neste estudo, foram detectados transcritos que codificam enzimas para as quatro vias de biossíntese do ascorbato: L-galactose, L-gulose, mio-inositol e D-galacturonato (Tabela 7).

Notavelmente, foram detectados altos níveis de expressão de genes codificando para todas as etapas enzimáticas da via da L-galactose (Tabela S2). Transcritos que codificam para a glicose-6-fosfato isomerase (PGI1; TR_17846_c1_g2), manose-6-fosfato isomerase (PMI1; TR_17817_c0_g1), fosfomanomutase (PMM; TR_16761_c0_g4), manose-1-fosfato guanililtransferase (GMP1, 2 e 3; TR_15784_c1_g1, TR_15784_c0_g1 e TR_12911_c0_g1), ambos da GDP-D-manose^{3',5'}-epimerase (GME1 e 2; TR_16652_c1_g2 e TR_18249_c3_g5) e da GDP-L-galactose transferase (GGP1 e 2; TR_18229_c2_g2 e TR_18229_c2_g3) apresentaram expressão aumentada em frutos verdes (\log_2FC de 1,1 a 2,7), (Tabela 7) em relação aos maduros. A respeito da comparação frutos verdes vs. flores, vários transcritos *PGI2* (TR_17846_c1_g2), *GMP1* e 2 (TR_15784_c1_g1 e TR_15784_c0_g1), *GGP1* e 2 (TR_18229_c2_g2 e TR_18229_c2_g3) e L-galactose desidrogenase (*GalDH1* e 2; TR_15297_c0_g1 e TR_25084_c0_g1) (Tabela 7) registraram regulação positiva (\log_2FC de 1,1 a 3,5) em frutos verdes. Adicionalmente, na comparação frutos verdes vs. folhas, os transcritos *PMM* (TR_16761_c0_g4) *GMP1* e 2 (TR_15784_c1_g1 e TR_15784_c0_g1), *GME1* e 2 (TR_16652_c1_g2 e TR_18249_c3_g5), *GalDH2* (TR_25084_c0_g1), e L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (*GalLDH*; TR_17761_c2_g1) tiveram a expressão aumentada também em frutos verdes (\log_2FC de 1,0 a 3,5) (Tabela 7). A maior abundância desses transcritos em frutos verdes corrobora com o alto conteúdo de AAs observado neste estágio em relação a frutos maduros, folhas e flores, respectivamente.

Tabela 7 – Lista de transcritos diferencialmente expressos codificando para as vias de biossíntese do ascorbato e suas respectivas atribuições ao KEGG. Transcritos considerados como diferencialmente expressos exibiram $\log_2 \text{fold change} \geq 1$ ou ≤ -1 e $\text{FDR} < 0,05$. Foram estabelecidas as seguintes comparações: frutos intermediários (16 DAA) versus verdes (12 DAA), frutos maduros (20 DAA) vs. verdes (12 DAA), frutos maduros (20 DAA) vs. intermediários (16 DAA), frutos verdes vs. flores e frutos verdes vs. folhas. Considerando como exemplo a comparação 20 DAA vs. 12 DAA, transcritos regulados positivamente em 20 DAA foram representados por valores de $\log_2 \text{fold change}$ positivos e destacados de vermelho, enquanto aqueles regulados negativamente foram representados com valores negativos e destacados de verde, de maneira inversa, significa que foram regulados positivamente no outro estágio (12 DAA). Os símbolos * e ** significam $\text{FDR} < 0,05$ e $0,01$, respectivamente. Glicose-6-fosfato isomerase (PGI), fosfomanose isomerase (PMI), fosfomanose mutase (PMM), GDP-manose pirofosforilase (GMP), GDP manose-3',5'-epimerase (GME), GDP-L-galactose transferase (GGP), L-galactose desidrogenase (GalDH), L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH), L-gulono-1,4-lactona oxidase (GulLO), L-mio-inositol-1-fosfato sintase (MIPS), mio-inositol oxigenase (MIOX), UDP-glicuronato-4-epimerases (GAE), poligalacturonato 4- α -galacturonosiltransferase (GAULT), pectinesterase (PME), inibidor da pectinesterase (PMEI), poligalacturonase (PG), D-galacturonato reductase (GalUR).

Vias de biossíntese do ascorbato	ID dos transcritos	Enzimas	Ortologia do KEGG e números EC	Valores de $\log_2 \text{fold change}$				
				16 vs. 12 DAA	20 vs. 12 DAA	20 vs. 16 DAA	12 DAA vs. flores	12 DAA vs. folhas
L-galactose	TR_17846_c1_g2	PGI1	K01810 [5.3.1.9]	-0,50	-1,11**	-0,61	-0,38	-0,60
	TR_17846_c1_g1	PGI2	K01810 [5.3.1.9]	0,04	0,29	0,24	1,59**	0,48
	TR_17817_c0_g1	PMI1	K01809 [5.3.1.8]	-1,23**	-1,96**	-0,72	0,08	-0,37
	TR_16761_c0_g4	PMM	K17497 [5.4.2.8]	-0,86	-1,58**	-0,70	-0,46	1,76**
	TR_15784_c1_g1	GMP1	K00966 [2.7.7.13]	-0,32	-1,49**	-1,18**	3,55**	3,59**
	TR_15784_c0_g1	GMP2	K00966 [2.7.7.13]	0,63	-0,86	-1,50**	3,18**	3,55**
	TR_12911_c0_g1	GMP3	K00966 [2.7.7.13]	-0,75	-1,10**	-0,34	0,28	0,55
	TR_16652_c1_g2	GME2	K10046 [5.1.3.18]	-1,15**	-1,78**	-0,62	0,26	1,49**
	TR_18249_c3_g5	GME1	K10046 [5.1.3.18]	-2,08**	-2,73**	-0,61	1,13	2,70**
	TR_18229_c2_g2	GGP1	K14190 [2.7.7.69]	-1,13**	-1,33**	-0,59	1,66**	-0,16
	TR_18229_c2_g3	GGP2	K14190 [2.7.7.69]	-0,63	-1,23**	-0,19	1,34**	-0,08
	TR_15297_c0_g1	GalDH1	K17744 [1.1.1.316]	-0,13	-0,80	-0,67	1,37**	-0,35
	TR_25084_c0_g1	GalDH2	K17744 [1.1.1.316]	-0,09	-0,79	-0,71	1,45**	2,56**
	TR_17761_c2_g1	GalLDH	K00225 [1.3.2.3]	-0,04	-0,19	-0,14	0,51	1,03**

L-gulose	TR_10804_c0_g1	GuILO3	K00103 [1.1.3.8]	0,52	0,89	0,37	-3,56**	-0,32
	TR_13774_c0_g1	GuLO6	K00103 [1.1.3.8]	-1,52	-2,30	-0,77	-4,73**	-0,46
Mio-inositol	TR_17505_c0_g2	MIPS	K01858 [5.5.1.4]	0,33	0,96	0,66	-3,65**	-3,25**
	TR_11140_c0_g1	MIOX1	K00469 [1.13.99.1]	-3,17**	-0,51	2,66**	1,81*	2,30**
	TR_11140_c0_g2	MIOX1a	K00469 [1.13.99.1]	0,28	-0,39	-0,68	-2,41**	0,54
	TR_15591_c0_g1	MIOX4	K00469 [1.13.99.1]	-3,87**	-5,63**	-1,75*	-1,71**	-2,15**
D-galacturonato	TR_16925_c1_g3	GAE3	K08679 [5.1.3.6]	2,65*	5,00**	2,35**	-4,25**	-3,60**
	TR_13095_c1_g2	GAE1a	K08679 [5.1.3.6]	-0,05	1,47*	1,52*	-6,94**	-3,57**
	TR_13095_c1_g1	GAE1	K08679 [5.1.3.6]	-0,06	1,07	1,14	-5,23**	-3,44**
	TR_16461_c0_g1	GAULT4	K13648 [2.4.1.43]	0,71	1,43**	0,71	0,61	1,11**
	TR_15138_c0_g3	PME1	K01051 [3.1.1.11]	-1,19	-2,04**	-0,84	3,05**	2,62**
	TR_15678_c3_g2	PME2	K01051 [3.1.1.11]	-2,09	-2,42**	-0,34	-1,41	-1,06
	TR_18103_c1_g5	PME5	K01051 [3.1.1.11]	3,83**	5,94**	2,10	-0,16	1,46
	TR_18103_c1_g7	PME6	K01051 [3.1.1.11]	1,91*	3,65**	1,73*	-3,86**	-1,62*
	TR_15034_c2_g1	PME7	K01051 [3.1.1.11]	1,17	1,63*	0,46	0,44	6,23**
	TR_17260_c0_g1	PMEI8B	K01051 [3.1.1.11]	0,41	-2,26**	-2,98**	0,03	-0,67
	TR_17260_c0_g2	PMEI34	K01051 [3.1.1.11]	-1,91*	-2,81**	-0,90	-2,66**	2,14**
	TR_12269_c0_g1	PG1	K01184 [3.2.1.15]	7,48**	8,58**	1,10**	-5,04**	4,00**
	TR_14016_c2_g1	PG2	K01213 [3.2.1.67]	0,70	2,07**	1,36**	-0,27	0,41
	TR_17731_c2_g5	GalUR3	K22374 [1.1.1.285]	-1,23	-3,82**	-2,59*	-1,65*	-0,44

Fonte: elaborada pelo autor.

A respeito da via alternativa da L-gulose, foram identificados apenas transcritos que codificam para duas (fosfodiesterase – PDE e L-gulonolactona oxidase – GulLO) das quatro etapas. Ambos, os transcritos *GulLO3* e *6* (TR_10804_c0_g1 e TR_13774_c0_g1) foram pouco expressos em frutos e folhas (Tabela S2). Apesar do transcrito *GulLO6* ter sido regulado positivamente em frutos verdes ($\log_2FC = 2,30$), não apresentou significância estatística em relação aos maduros (Tabela 7). Em contraste, ambos *GulLO3* e *6* foram moderadamente expressos em flores exibindo $\log_2FC = 3,56$ e $4,73$, respectivamente, superiores em relação a frutos verdes. No geral, os transcritos *GulLOs* não apresentaram relação com o conteúdo de AAs verificado em frutos verdes.

Em relação a via do mio-inositol foi detectado um transcrito que codifica para mio-inositol-3-fosfato sintase (MIPS; TR_17505_c0_g2) e três para mio-inositol oxigenases (MIOX) (Tabela 7). Enquanto o transcrito *MIOX4* (TR_15591_c0_g1) diminuiu sua abundância durante o amadurecimento ($\log_2FC = 5,63$), *MIOX1* (TR_11140_c0_g1) reduziu o nível de expressão no estágio intermediário ($\log_2FC = 3,17$), em seguida aumentou em frutos maduros (2,66). Mesmo assim, *MIPS*, *MIOX4*, em flores e folhas, e *MIOX1a* (R_11140_c0_g2), em flores, tiveram a expressão aumentada nesses órgãos quando comparado a frutos verdes. Em contrapartida, *MIOX1* foi mais expresso em frutos verdes em relação a flores e folhas (Tabela 7).

A via do D-galacturonato é suprida pelo substrato (D-galacturonato), gerado da degradação da pectina durante o amadurecimento dos frutos. Dois transcritos codificando UDP-glicuronato-4-epimerases (*GAE1a* e *3*; TR_13095_c1_g2 e TR_16925_c1_g3), galacturonosiltransferase (*GAULT4*; TR_16461_c0_g1), três pectinesterases (*PME5*, *6* e *7*; TR_18103_c1_g5, TR_18103_c1_g7 e TR_15034_c2_g1) e dois para poligalacturonases (*PG1* e *2*; TR_12269_c0_g1 e TR_14016_c2_g1) aumentaram fortemente a sua abundância ao longo do amadurecimento dos frutos (Tabela 7). A pectinesterase é codificada por uma grande família multigênica que exibe uma regulação complexa (Tabela S2). Dois transcritos pouco a moderadamente expressos *PME1* e *2* (TR_15138_c0_g3 e TR_15678_c3_g2), e dois codificando prováveis inibidores da pectinesterase (*PMEI8B* e *PMEI34*; TR_17260_c0_g1 e TR_17260_c0_g2) registraram redução na expressão durante o amadurecimento (Tabela 7). A D-galacturonato redutase (*GalUR*) é uma enzima chave, por isso tem sido alvo de vários estudos. Oito transcritos da *GalUR* foram expressos em frutos, entre eles *GalUR3* (TR_17731_c2_g5), que apesar de muito pouco expresso, foi mais abundante em frutos verdes (Tabela 7; Tabela S2).

As enzimas ascorbato peroxidase (APX) e ascorbato oxidase (AO) estão envolvidas nos processos de oxidação/degradação do AAs. Neste estudo, os transcritos *APX2* (TR_9063_c0_g1) e *AO2* e *3* (TR_14310_c0_g1 e TR_9470_c0_g1) tiveram a expressão aumentada em frutos maduros (Tabela 8). Enquanto, os transcritos moderadamente expressos *APX1* e *6* (TR_17883_c4_g3 e TR_15465_c0_g1) diminuíram a expressão durante o amadurecimento dos frutos. Notavelmente, transcritos *APX5* (TR_7299_c0_g1) e *AO2-10*, (TR_14310_c0_g1, TR_9470_c0_g1, TR_9470_c0_g2, TR_11794_c0_g1, TR_14310_c0_g3, TR_13937_c0_g1, TR_13937_c0_g5, TR_13937_c0_g2 e TR_13937_c0_g3) foram fortemente regulados positivamente em flores (Tabela 8). Curiosamente, vários transcritos, incluindo *APX5* e *6* (TR_7299_c0_g1 e TR_15465_c0_g1), *tAPX* (TR_15644_c1_g1), *AO3*, *5*, *6* e *7* (TR_9470_c0_g1, TR_11794_c0_g1, TR_14310_c0_g3, TR_13937_c0_g1) foram mais abundantes em folhas comparado a fruto verde (Tabela 8).

O re-estabelecimento das reservas de AAs reduzido a partir da sua forma oxidada é realizada pela monodesidroascorbato redutase (MDHAR) e/ou desidroascorbato redutase (DHAR). Transcritos codificando para a *MDHAR2* (TR_16821_c0_g2) e *DHAR1* (TR_13219_c0_g3) foram regulados positivamente em frutos verdes, enquanto *MDHAR4* (TR_16821_c0_g4) aumentou levemente os níveis de expressão ($\log_2FC = 0,96$) em frutos maduros (Tabela 8). Flores parecem possuir uma capacidade de reciclagem menos eficiente, uma vez que apenas os transcritos da *MDHAR1* (TR_15865_c3_g3) foi regulado positivamente, em contraste com frutos verdes que revelaram maior abundância dos transcritos *MDHAR2* e *4a* (TR_16821_c0_g2 e TR_16821_c0_g4), bem como *DHAR3* (TR_17254_c0_g1). Em folhas, os transcritos *MDHAR2* e *DHAR3* destacaram-se como importantes candidatos regulatórios das reservas do AAs (Tabela 8).

A translocação do ascorbato através da membrana da celular e organelas é provavelmente mediada por uma família de transportadores nucleobase-ascorbato (NAT). Nos frutos, *NAT3*, *4*, *6* e *6-like* (TR_15671_c0_g3, TR_17143_c0_g3, TR_16344_c0_g3 e TR_16344_c0_g2) foram regulados positivamente em frutos verdes. Apenas *NAT1* (TR_14495_c0_g1) aumentou sua expressão à medida que o fruto amadureceu (Tabela 8). Em relação a folhas, *NAT7* e *12* (TR_10998_c0_g1 e TR_12849_c0_g1) foram mais expressos em folhas quando comparados à frutos verdes. Além disso, *NAT2* e *7* (TR_8307_c0_g1 e TR_10998_c0_g1) foram predominantemente regulados positivamente em flores (Tabela 8).

Tabela 8 – Lista de transcritos diferencialmente expressos codificando para as vias de degradação, reciclagem e transporte do ascorbato e suas respectivas atribuições ao KEGG. Transcritos considerados como diferencialmente expressos exibiram $\log_2 \text{fold change} \geq 1$ ou ≤ -1 e $\text{FDR} < 0,05$. Foram estabelecidas as seguintes comparações: frutos intermediários (16 DAA) versus verdes (12 DAA), frutos maduros (20 DAA) vs. verdes (12 DAA), frutos maduros (20 DAA) vs. intermediários (16 DAA), frutos verdes vs. flores e frutos verdes vs. folhas. Considerando como exemplo a comparação 20 DAA vs. 12 DAA, transcritos regulados positivamente em 20 DAA foram representados por valores de $\log_2 \text{fold change}$ positivos e destacados de vermelho, enquanto aqueles regulados negativamente foram representados com valores negativos e destacados de verde, de maneira inversa, significa que foram regulados positivamente no outro estágio (12 DAA). Os símbolos * e ** significam $\text{FDR} < 0,05$ e $0,01$, respectivamente. Ascorbato peroxidase (APX), monodesidroascorbato redutase (MDHAR), desidroascorbato redutase (DHAR), ascorbato oxidase (AO), transportador nucleobase-ascorbato (NAT).

Outras vias do ascorbato	ID dos transcritos	Enzimas	Ortologia do KEGG e números EC	Valores de $\log_2 \text{fold change}$				
				16 vs. 12 DAA	20 vs. 12 DAA	20 vs. 16 DAA	12 DAA vs. flores	12 DAA vs. folhas
Reciclagem e degradação	TR_9063_c0_g1	APX2	K00434 [1.11.1.11]	-0,03	1,72**	1,76**	4,84**	5,38**
	TR_7299_c0_g1	APX5	K00434 [1.11.1.11]	-0,99	-1,93	-0,95	-6,85**	-5,51**
	TR_15465_c0_g1	APX6	-	-0,37	-2,11**	-1,73**	3,44**	-0,43
	TR_17883_c4_g3	APX1	K00434 [1.11.1.11]	-0,45	-2,12**	-1,66**	3,22**	-0,11
	TR_15644_c1_g1	tAPX	K00434 [1.11.1.11]	-0,09	-0,12	-0,02	0,34	-1,42**
	TR_15742_c1_g1	APX6-like	K00434 [1.11.1.11]	0,00	-0,25	-0,26	0,42	-1,70**
	TR_16821_c0_g2	MDHAR2	K08232 [1.6.5.4]	-1,32**	-2,04**	-0,72	1,54**	-2,42**
	TR_15865_c3_g3	MDHAR1	-	-0,35	-0,22	0,12	-1,76**	-0,61
	TR_16854_c0_g1	MDHAR4a	K08232 [1.6.5.4]	0,09	-0,06	-0,16	1,09**	-0,38
	TR_16821_c0_g4	MDHAR4	K08232 [1.6.5.4]	0,75**	0,96**	0,21	0,27	-0,73
	TR_13219_c0_g3	DHAR1	K21888 [1.8.5.1]	-0,40	-2,24**	-1,83**	0,01	-0,45
	TR_17254_c0_g1	DHAR3	K21888 [1.8.5.1]	0,13	0,28	0,15	1,04**	-0,98**
	TR_10939_c0_g1	AO1	K00423 [1.10.3.3]	1,59	1,73	0,14	0,58	2,47*
	TR_14310_c0_g1	AO2	-	1,63	4,36**	2,75	4,60**	-0,65
	TR_9470_c0_g1	AO3	-	3,18**	5,29**	2,10*	4,25**	2,01*
	TR_9470_c0_g2	AO4	-	-1,13	-2,28	-1,15	-3,99**	-1,21
	TR_11794_c0_g1	AO5	-	-1,52	-1,23	0,29	-4,99**	-2,77**
	TR_14310_c0_g3	AO6	-	0,00	0,00	0,00	-6,16**	-3,46*
	TR_13937_c0_g1	AO7	K00423 [1.10.3.3]	-0,24	-0,94	-0,69	-2,27**	-2,19**
	TR_13937_c0_g5	AO8	K00423 [1.10.3.3]	0,00	0,80	0,82	-4,99**	0,00
TR_13937_c0_g2	AO9	K00423 [1.10.3.3]	-0,59	-0,80	-0,21	-12,24**	-1,68	
TR_13937_c0_g3	AO10	K00423 [1.10.3.3]	-0,05	-0,26	-0,20	-11,67**	-0,27	

Translocação	TR_15671_c0_g3	NAT3	K14611	-0,56	-1,94**	-1,40**	0,72	-0,07
	TR_17143_c0_g3	NAT4	K14611	-0,64	-1,35*	-0,70	3,07**	2,83**
	TR_16344_c0_g3	NAT6	K14611	-1,03**	-2,19**	-1,15**	0,36	0,08
	TR_16344_c0_g2	NAT6-like	K14611	-0,90	-2,06**	-1,15**	0,32	-0,25
	TR_14495_c0_g1	NAT1	K14611	-0,02	1,06*	1,09*	-0,16	2,09**
	TR_8307_c0_g1	NAT2	K14611	0,14	-0,69	-0,83	-4,18**	-0,62
	TR_10998_c0_g1	NAT7	K14611	-0,07	0,09	0,17	-6,56**	-5,78**
	TR_12849_c0_g1	NAT12	K14611	0,88	0,26	-0,61	-0,02	-1,87**

Fonte: elaborada pelo autor.

6.3.8 Transcritos diferencialmente expressos envolvidos na regulação do metabolismo do etileno durante o amadurecimento da acerola

No presente estudo, várias famílias multigênicas que codificam para a biossíntese, percepção e sinalização do etileno foram importantemente reguladas durante o amadurecimento. Dois transcritos que codificam para a ACC sintase (ACS1 e 2; TR_13848_c1_g1 e TR_12412_c0_g2) e uma ACC oxidase (ACO2; TR_6311_c0_g1), envolvidas na biossíntese de etileno, aumentaram fortemente do estágio intermediário para o maduro. Entretanto, TR_12412_c0_g2 ($\log_2FC = 8,2$) exibiu o maior incremento na abundância dos transcritos até o estágio intermediário ($\log_2FC = 5,80$) (Tabela 9).

A respeito da percepção e transdução do etileno, dois transcritos codificando para o receptores de etileno (ETR1 e 2; TR_15312_c2_g2 e TR_15312_c2_g6) e três transcritos *EBF1/2a-c* (TR_15024_c0_g1, TR_16758_c3_g1 e TR_16758_c3_g2), envolvidos na degradação de EIN3 diminuíram a expressão em frutos no estágio intermediário, em seguida aumentaram até frutos maduros (Tabela 9). Além disso, dois transcritos que codificam para o a proteína serina/treonina quinase de resposta tripla constitutiva (CTR1 e 2; TR_18225_c0_g2 e TR_14883_c0_g1) e a proteína insensível ao etileno 3 (EIN3; TR_15498_c1_g4) foram regulados positivamente em frutos verdes (Tabela 9). O maior nível de expressão de ETR, CTR e EIN3 coincidiram com a maior quantidade de etileno de frutos no estágio verde.

Um total de 55 fatores de transcrição da superfamília AP2/ERF (apetala2/fator de resposta ao etileno) foram expressos em frutos. Notavelmente, sete ERFs foram regulados negativamente durante o amadurecimento dos frutos (Tabela 9). Quatro deles, TR_14953_c0_g1, TR_13174_c0_g5, TR_17325_c1_g6 e TR_8284_c0_g1 apresentaram \log_2FC entre 2,1 e 5,1 maior em frutos verdes, quando comparados aos maduros (Tabela 9). Além disso, quatro transcritos, TR_11743_c0_g1, TR_58_c0_g1, TR_38185_c0_g1 e TR_21068_c0_g1 foram detectados apenas em frutos verdes. Mesmo assim, transcritos que codificam para a proteína insensível ao etileno 2 (EIN2; TR_18241_c1_g1), um ativador de EIN3, e dois ERFs (TR_11732_c0_g1 e TR_8561_c0_g2; $\log_2FC = 2,6$ e $2,3$, respectivamente) aumentaram a expressão em função do amadurecimento. Três ERFs (TR_6567_c0_g1, TR_2073_c0_g1 e TR_15441_c2_g1) foram induzidos neste estágio, em concordância com o aumento da expressão de ACS e ACO (Tabela 9). Enquanto, transcritos *ERF114* (TR_10962_c0_g1) foram reprimidos em frutos no estágio intermediário e *ERF13* (TR_11298_c1_g3) reprimidos apenas em frutos maduros.

Tabela 9 – Lista de transcritos diferencialmente expressos codificando para a biossíntese, percepção e transdução do etileno e suas respectivas atribuições ao KEGG. Transcritos considerados como diferencialmente expressos exibiram $\log_2 \text{fold change} \geq 1$ ou ≤ -1 e $\text{FDR} < 0,05$. Foram estabelecidas as seguintes comparações: frutos intermediários (16 DAA) versus verdes (12 DAA), frutos maduros (20 DAA) vs. verdes (12 DAA), frutos maduros (20 DAA) vs. intermediários (16 DAA). Os símbolos * e ** significam $\text{FDR} < 0,05$ e $0,01$, respectivamente.

ID dos transcritos	Enzimas	Números EC	Valores de $\log_2 \text{fold change}$		
			16 vs. 12 DAA	20 vs. 12 DAA	20 vs. 16 DAA
TR_13848_c1_g1/ XP_021668407.1/aminocyclopropane-1-carboxylate synthase-like	ACS1	K20772 [4.4.1.14]	0,85	2,64**	1,79**
TR_12412_c0_g2/ BAA94600.1/1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase	ACS2	K20772 [4.4.1.14]	5,80**	8,21**	2,41**
TR_6311_c0_g1/ CAN85570.1/ACC oxidase 2	ACO2	K05933 [1.14.17.4]	0,95	2,78**	1,82**
TR_15312_c2_g2/ XP_021649747.1/ethylene receptor 2-like	ETR1	K14509 [2.7.13.-]	-1,54**	-0,61	0,93**
TR_15312_c2_g6/ XP_021649747.1/ethylene receptor 2-like	ETR2	K14509 [2.7.13.-]	-1,10	0,17	1,27*
TR_15024_c0_g1/ XP_011017769.1/EIN3-binding F-box protein 1-like	EBF1-2a	K14514	-1,50**	0,95	2,45**
TR_16758_c3_g1/XP_021662997.1/EIN3-binding F-box protein 1-like	EBF1-2b	K14514	-2,14**	0,12	2,13*
TR_16758_c3_g2/ XP_002524506.1/EIN3-binding F-box protein 1	EBF1-2c	K14514	-1,68**	-0,03	1,64**
TR_18225_c0_g2/ XP_021679474.1/serine/threonine-protein kinase CTR1-like	CTR1	K14510 [2.7.11.1]	-0,66	-1,38*	-0,71
TR_14883_c0_g1/ XP_021644841.1/serine/threonine-protein kinase CTR1-like	CTR2	K14510 [2.7.11.1]	0,50	-1,23	-1,73*
TR_15498_c1_g4/ XP_010557480.1/ethylene insensitive protein 3-like	EIN3	K14515	-0,52	-1,46**	-0,93
TR_14953_c0_g1/ XP_002306712.2/AP2 domain-containing transcription factor	RAP2	-	-1,71**	-2,16**	-0,45
TR_13174_c0_g5/ XP_021687038.1/ethylene-responsive transcription factor ERF105	ERF105	K09286	-2,8**	-3,85**	-1,05*
TR_17325_c1_g6/ XP_011029525.1/ethylene-responsive transcription factor 4-like	ERF4-like	K09286	-1,73**	-3,41**	-1,68**
TR_8284_c0_g1/ XP_021687037.1/ethylene-responsive transcription factor ERF107	ERF107	K09286	-3,8**	-5,12**	-1,31
TR_15036_c2_g1/ XP_021639373.1/ethylene-responsive transcription factor RAP2-12	RAP2/12-like	K09286	-0,88	-1,18**	-0,29
TR_3512_c0_g1/ XP_021649290.1/ethylene-responsive transcription factor 1B-like	ERF1B-like	K14516	-1,69**	-1,51**	0,17
TR_18464_c1_g1/ XP_012091652.1/ethylene-responsive transcription factor 4	ERF4	K09286	-0,04	-1,38**	-1,33*
TR_18241_c1_g1/ XP_011010448.1/ethylene-insensitive protein 2-like	EIN2	K14513	0,32	1,26**	0,94
TR_11732_c0_g1/ XP_021678689.1/ethylene-responsive transcription factor ERF113	ERF113	-	2,01**	2,66**	0,65
TR_8561_c0_g2/ XP_021692873.1/ethylene-responsive transcription factor RAP2-3	ERF-AP2-3	K09286	1,30**	2,32**	1,02*

TR_11743_c0_g1/ XP_011031921.1/ethylene-responsive transcription factor ERF039	ERF039	-	Induzido apenas em frutos verdes
TR_58_c0_g1/ XP_021896704.1/ethylene-responsive transcription factor ERF109	ERF109	-	Induzido apenas em frutos verdes
TR_38185_c0_g1/ XP_021679289.1/ethylene-responsive transcription factor 1-like	ERF1-like	K09286	Induzido apenas em frutos verdes
TR_21068_c0_g1/ XP_021677744.1/ethylene-responsive transcription factor 1B	ERF-1B	K14516	Induzido apenas em frutos verdes
TR_6567_c0_g1/ XP_017644036.1/ethylene-responsive transcription factor ABR1-like	ERF-ABR1	-	Induzido apenas em frutos maduros
TR_2073_c0_g1/ XP_021660363.1/ethylene-responsive transcription factor LEP	ERF/LEP-like	K09286	Induzido apenas em frutos maduros
TR_15441_c2_g1/ XP_021657412.1/ethylene-responsive transcription factor ESR2	ERF/ESR2	-	Induzido apenas em frutos maduros
TR_10962_c0_g1/ XP_011043029.1/ethylene-responsive transcription factor ERF114	ERF114	-	Reprimido apenas em frutos intermediários
TR_11298_c1_g3/ XP_021687956.1/ethylene-responsive transcription factor 13-like	ERF13-like	K09286	Reprimido apenas em frutos maduros

Fonte: elaborada pelo autor.

6.3.9 Transcritos diferencialmente expressos envolvidos na regulação da respiração durante o amadurecimento da acerola

No presente estudo, vários transcritos codificando membros de famílias multigênicas e subunidades de complexos enzimáticos, identificados como importantes pontos regulatórios da respiração foram diferencialmente expressos. Transcritos que codificam para fosfofrutoquinase 6 dependente de ATP (cyPFK6; TR_9657_c0_g1), fosfoglicerato mutase (cyPGM4; TR_10356_c0_g1), várias subunidades do complexo NADH desidrogenase mitocondrial (mNDH; TR_15988_c0_g8, TR_18319_c1_g13, TR_17909_c0_g1, TR_16500_c1_g2, TR_15079_c1_g3, TR_17007_c0_g3, TR_16057_c0_g2 e TR_13313_c1_g2), succinato desidrogenase (SDH1; TR_15694_c0_g2), citocromo c oxidase (COX; TR_14185_c1_g6, TR_14248_c1_g1 e TR_15096_c1_g2), subunidades da ATP sintase (mF-ATPase; TR_9396_c0_g1, TR_9599_c0_g1, TR_16837_c1_g1 e TR_18594_c0_g11) e isocitrato desidrogenase (IDH1 e 2; TR_17209_c0_g5 e TR_17209_c0_g4) foram regulados positivamente em frutos verdes (Tabela 10). Neste mesmo estágio, verificou-se também maior abundância de transcritos codificando para fosfoglicerato mutase (cPGM; TR_17981_c2_g3) e piruvato quinase (cPK-G; TR_12806_c0_g1), isoformas da glicólise plastidial (Tabela 10).

Notavelmente, transcritos codificando para isoformas citosólicas tais como: cyPGM1 (TR_13854_c0_g1), frutose-bifosfato aldolase (cyFBA3; TR_18055_c0_g4) e cyPK1 e 2 (TR_14833_c0_g2 e TR_22625_c0_g1), operando na glicólise; glucose-6-fosfato-1-desidrogenase (cyG6PDH1 e 2; TR_17282_c0_g3 e TR_16808_c2_g4) da via das pentoses fosfato (PPP); e mPDHE1-B1 (TR_16858_c0_g3) do complexo piruvato desidrogenase exibiram incrementos na expressão durante o amadurecimento (fruto maduro) (Tabela 10). Simultaneamente, outros transcritos codificando isoformas endereçadas aos plastídeos tais como: cPFK5 (TR_14487_c3_g1) e cPK2 (TR_15034_c0_g1) da via glicolítica; vários codificando isoformas do complexo piruvato desidrogenase (cPDHE; TR_10924_c0_g2, TR_8475_c0_g1, TR_13639_c3_g2 e TR_15071_c0_g1); cG6PDH2 (TR_17530_c0_g1) e ribose-5-fosfato isomerase (cR5PI4; TR_9847_c0_g1) da via PPP foram importantemente regulados positivamente em frutos maduros (Tabela 10).

Tabela 10 – Lista de transcritos diferencialmente expressos codificando para vias envolvidas na respiração de da acerola e suas respectivas atribuições ao KEGG. Transcritos considerados como diferencialmente expressos exibiram $\log_2 \text{fold change} \geq 1$ ou ≤ -1 e $\text{FDR} < 0,05$. Foram estabelecidas as seguintes comparações: Frutos intermediários (16 DAA) versus verdes (12 DAA), frutos maduros (20 DAA) vs. verdes (12 DAA), frutos maduros (20 DAA) vs. intermediários (16 DAA). Os símbolos * e ** significam $\text{FDR} < 0,05$ e $0,01$, respectivamente. A localização celular do produto enzimático codificado pelos transcritos foi predita de acordo com os resultados da anotação (*GenBank*), e com o auxílio das ferramentas *TargetP*, *MitoProt* e *ChloroP* disponíveis no *website Expasy* (<https://www.expasy.org>). Proteínas com predição para os plastídeos apresentam a letra minúscula (c), citosol (cy) e mitocôndrias (m), precedendo o símbolo da enzima.

Vias da respiração	ID dos transcritos	Enzimas	Números EC	Valores de $\log_2 \text{fold change}$		
				16 vs. 12 DAA	20 vs. 12 DAA	20 vs. 16 DAA
Glicólise plastidial	TR_17981_c2_g3/EEF52014.1/phosphoglycerate mutase	cPGM	-	-0,43	-2,11**	-1,67**
	TR_12806_c0_g1/XP_006385619.1/pyruvate kinase isozyme G family protein	cPK-G	K00873 [2.7.1.40]	-0,05	-1,36**	-1,30**
	TR_14487_c3_g1/XP_021652367.1/ATP-dependent 6-phosphofructokinase 5	cPFK5	K00850 [2.7.1.11]	0,82	1,08**	0,25
	TR_15034_c0_g1/XP_021655735.1/pyruvate kinase 2	cPK2	K00873 [2.7.1.40]	0,70	1,32**	0,62
Complexo do piruvato desidrogenasee	TR_10924_c0_g2/XP_021649028.1/pyruvate dehydrogenase complex component 4	cPDHC	K00627 [2.3.1.12]	0,97	1,31**	0,34
	TR_8475_c0_g1/XP_021690492.1/pyruvate dehydrogenase E1 component. beta-3	cPDHE1-B3	K00162 [1.2.4.1]	0,34	1,15**	0,80
	TR_13639_c3_g2/XP_021691252.1/pyruvate dehydrogenase E1 component alpha-3	cPDHE1-A3	K00161 [1.2.4.1]	0,54	1,06**	0,52
	TR_15071_c0_g1/XP_015574741.1/dihydrolipoyl dehydrogenase 2	cDDH2	K00382 [1.8.1.4]	0,86	1,17**	0,31
Pentoses fosfato	TR_16858_c0_g3/XP_019160821.1/pyruvate dehydrogenase E1 component - beta-1	mPDHE1-B1	K00162 [1.2.4.1]	0,55	1,80**	1,25**
	TR_15999_c0_g1/XP_021653287.1/glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	cG6PDH	K00036 [1.1.1.49]	-0,55	-1,16**	-0,61
	TR_17741_c0_g1/XP_021661015.1/ribose-5-phosphate isomerase 4	cR5PI4	K01807 [5.3.1.6]	-0,02	-1,00**	-0,98
	TR_17530_c0_g1/XP_021644271.1/glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase 2	cG6PDH2	K00036 [1.1.1.49]	0,16	1,32**	1,15**
	TR_9847_c0_g1/XP_021645822.1/ribose-5-phosphate isomerase 2	cR5PI2	K01807 [5.3.1.6]	1,88**	3,30**	1,41**
	TR_17282_c0_g3/JAU22693.1/glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	cyG6PDH1	K00036 [1.1.1.49]	1,50**	2,95**	1,44**
Respiração	TR_16808_c2_g4/XP_021677725.1/glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	cyG6PDH2	K00036 [1.1.1.49]	1,55**	3,26**	1,71**
	TR_10356_c0_g1/XP_018857760.1/phosphoglycerate mutase-like 4	cyPGM4	K15634 [5.4.2.12]	-2,94**	-5,63**	-2,69**
	TR_18055_c0_g4/XP_006468780.1/fructose-bisphosphate aldolase 3	cyFBA3	K01623 [4.1.2.13]	0,74	1,18**	0,44
	TR_13854_c0_g1/XP_011016967.1/phosphoglycerate mutase-like protein 1	cyPGM1	-	0,88	1,39**	0,50
	TR_14833_c0_g2/XP_015570836.1/ pyruvate kinase	cyPK1	K00873 [2.7.1.40]	0,91	1,53**	0,61

	TR_22625_c0_g1/XP_021692462.1/pyruvate kinase	cyPK2	K00873 [2.7.1.40]	0,42	1,22**	0,80
	TR_9657_c0_g1/XP_021683465.1/ATP-dependent 6-phosphofructokinase 6	cyPFK6	K00850 [2.7.1.11]	-1,19	-2,23**	-1,03
	TR_15988_c0_g8/YP_001718491.1/NADH dehydrogenase subunit 1	mNDH1	K03878 [1.6.5.3]	-0,58	-1,96**	-1,37*
	TR_18319_c1_g13/YP_717114.1/NADH-ubiquinone oxidoreductase	mNDH	K03936 [1.6.5.3]	-0,57	-1,93**	-1,35*
	TR_17909_c0_g1/AGZ63042.1/NADH dehydrogenase subunit 6	mNDH6	K03884 [1.6.5.3]	-0,56	-1,86**	-1,30**
	TR_16500_c1_g2/YP_009306119.1/NADH dehydrogenase subunit 4	mNDH4	K03881 [1.6.5.3]	-0,39	-1,32**	-0,92
	TR_15079_c1_g3/AOP12432.1/NADH dehydrogenase subunit 2	mNDH2	K03879 [1.6.5.3]	-0,68	-1,30**	-0,62
	TR_17007_c0_g3/AET62908.1/NADH dehydrogenase subunit 5	mNDH5	K03883 [1.6.5.3]	-0,60	-1,29**	-0,69
	TR_16057_c0_g2/XP_018852096.1/ NAD(P)H dehydrogenase (quinone) FQR1	mNDH-FQR1	K03809 [1.6.5.2]	-0,17	-1,08**	-0,90
	TR_13313_c1_g2/XP_021682513.1/NAD(P)H dehydrogenase (quinone) FQR1-like 3	mNDH-FQR1-3	K03809 [1.6.5.2]	-1,19**	-5,19**	-4,00**
	TR_15694_c0_g2/EOX91115.1/Succinate dehydrogenase 1 isoform 2	mSDH1	K00234 [1.3.5.1]	-0,95	-2,40**	-1,45
	TR_14185_c1_g6/YP_009412600.1/cytochrome c oxidase subunit 3	mCOX3	K02262	-0,92	-1,70**	-0,78
	TR_14248_c1_g1/XP_006466401.1/cytochrome c oxidase subunit 6a	mCOX6a	K02266	-0,37	-1,41**	-1,03**
	TR_15096_c1_g2/JAP31508.1/putative cytochrome oxidase subunit 1	mCOX1	K02256 [1.9.3.1]	-0,53	-1,35**	-0,81
	TR_9396_c0_g1/XP_021659133.1/ATP synthase subunit delta	mF-ATPaseB	-	-0,77	-1,97**	-1,19
	TR_9599_c0_g1/EEF36631.1/ATP synthase gamma chain 2	mF-ATPaseG2	K02115	-0,37	-1,51**	-1,15
	TR_16837_c1_g1/ALF04039.1/ATP synthase F1 subunit 1	mF-ATPaseF1	K02132	-0,54	-1,45**	-0,91
	TR_18594_c0_g1/AET62942.1/ATPase subunit 4	mF-ATPase4	-	-0,27	-1,29**	-1,01
	TR_16548_c0_g10/XP_011036570.1/ATP synthase subunit b	cF-ATPase	K02109	0,96**	1,82**	0,86**
	TR_11447_c0_g2/XP_021683015.1/alternative NAD(P)H-ubiquinone oxidoreductase	mNUOB2	K17871	0,66	2,66**	1,99**
	TR_13362_c0_g1/NP_188876.1/alternative oxidase 1a	mAOX1a	K17893 [1.10.3.11]	0,06	5,27**	5,20**
	TR_17209_c0_g5/EEF33886.1/NADP-specific isocitrate dehydrogenase	mIDH1	K00031 [1.1.1.42]	-0,10	-0,86	-0,75
	TR_17209_c0_g4/XP_002305928.1/isocitrate dehydrogenase	mIDH2	K00031 [1.1.1.42]	-0,20	-0,93**	-0,72
Biossíntese de malato	TR_14215_c1_g1/XP_015076781.1/ATP-citrate lyase alpha chain protein 2	cyACLYA	-	1,19**	2,23**	1,04**
	TR_17887_c1_g1/KEH27751.1/ATP-citrate lyase alpha chain protein	cyACLY1A1	K01648 [2.3.3.8]	0,44	0,91**	0,46
	TR_17019_c1_g2_i6/XP_012455352.1/ATP-citrate s lyase beta chain protein 2	cyACLYB	K01648 [2.3.3.8]	8,0**	10,06**	2,0**
	TR_17019_c1_g2_i3/XP_021653557.1/ATP-citrate lyase beta chain protein 2	cyACLYB2	K01648 [2.3.3.8]	0,38	1,01**	0,62

Fonte: elaborada pelo autor.

Interessantemente, transcritos codificando para uma ATP sintase endereçada aos plastídeos (cF-ATPase; TR_16548_c0_g10) apresentou expressão aumentada em frutos maduros (Tabela 10). Curiosamente, frutos neste estágio, também registraram maior abundância dos transcritos que codificando para NAD (P) H-ubiquinona oxidoreductase alternativa externa (NUOB2; TR_11447_c0_g2) e para a oxidase alternativa (AOX1a; TR_13362_c0_g1), vias não fosforilativas, sugerindo sua provável predominância após o estágio intermediário do amadurecimento dos frutos (Tabela 10). Além disso, observou-se regulação positiva de transcritos que codificam para cadeias alfa e beta da ATP-citrate liase (ACLY; TR_14215_c1_g1, TR_17887_c1_g1, TR_17019_c1_g2_i6 e TR_17019_c1_g2_i3; log₂FC entre 1,01 a 10,06), responsável pela conversão do citrato em oxaloacetato (OAA) e acetil-CoA (Tabela 10).

6.3.10 Transcritos diferencialmente expressos envolvidos na regulação do acúmulo de amido e de açúcares durante o desenvolvimento da acerola

A investigação por transcritos envolvidos no metabolismo do amido e dos açúcares (glicose e frutose) revelou regulação transcricional temporal específica. Frutos no estágio verde exibiram expressão aumentada de transcritos codificando para invertases da parede celular (cwINV; TR_15077_c0_g2, TR_11104_c0_g1, TR_18398_c1_g1 e TR_15077_c0_g1) (Tabela 11), um transportador de sacarose (SUC2; TR_14176_c1_g1) e dois envolvidos na biossíntese do amido (SS4; TR_15155_c0_g1) e (WAXY; TR_16282_c0_g1), que diminuíram em função do amadurecimento (Tabela 11).

Entretanto, transcritos da beta-amilase (AmyB1 e 2; TR_17036_c0_g1 e TR_17865_c1_g2) e invertase vacuolar (vINV; TR_17517_c0_g2), responsáveis pela degradação do amido nos plastídeos e hidrólise da sacarose no vacúolo, respectivamente, foram regulados positivamente do estágio verde até o intermediário, apresentando redução na sua abundância em frutos maduros (Tabela 11). Enquanto, aqueles codificando a alfa-glicano fosforilase (AGP; TR_17770_c0_g2), alfa-amilase (AmyA; TR_14898_c0_g4), enzimas de degradação de amido, bem como uma invertase solúvel (sINV; TR_17282_c0_g1) aumentaram gradualmente sua abundância durante o amadurecimento (Tabela 11). Além disso, transcritos de dois transportadores de sacarose, frutose ou glicose (SWEET; TR_13074_c0_g1 e TR_13530_c1_g1), um transportador de monossacarídeos (frutose e glicose) (MST; TR_11632_c0_g1) e da sacarose fosfato sintase (SPS; TR_17564_c0_g1) exibiram incrementos substanciais à medida que o amadurecimento do fruto avançou (Tabela 11).

Tabela 11 – Lista de transcritos diferencialmente expressos codificando para o metabolismo de açúcares durante o desenvolvimento dos da acerola e suas respectivas atribuições ao KEGG. Transcritos considerados como diferencialmente expressos exibiram $\log_2 \text{fold change} \geq 1$ ou ≤ -1 e FDR < 0,05. Foram estabelecidas as seguintes comparações: Frutos intermediários (16 DAA) versus verdes (12 DAA), frutos maduros (20 DAA) vs. verdes (12 DAA), frutos maduros (20 DAA) vs. intermediários (16 DAA). Os símbolos * e ** significam FDR < 0,05 e 0,01, respectivamente.

ID dos transcritos	Enzimas	Números EC	Valores de $\log_2 \text{fold change}$		
			16 vs. 12 DAA	20 vs. 12 DAA	20 vs. 16 DAA
TR_14176_c1_g1/CAA83436.1/sucrose carrier	SUC2	K15378	-1,53**	-3,08**	-1,54**
TR_15077_c0_g2/XP_021649964.1/cell wall invertase	cwINV1	K01193 [3.2.1.26]	-1,08	-1,44*	-0,36
TR_11104_c0_g1/XP_011019433.1/cell wall invertase	cwINV2	K01193 [3.2.1.26]	-1,50**	-1,24**	0,26
TR_18398_c1_g1/AFH77950.1/cell wall invertase	cwINV3	K01193 [3.2.1.26]	-0,53	-1,39**	-0,86
TR_15077_c0_g1/AFH77950.1/cell wall invertase	cwINV4	K01193 [3.2.1.26]	-0,42	-0,91*	-0,48
TR_15155_c0_g1/XP_021683258.1/ starch synthase 4	SS4	-	-1,20**	-4,98**	-3,78**
TR_16282_c0_g1/XP_021650623.1/granule-bound starch synthase 1	WXY	K13679 [2.4.1.242]	-1,12**	-1,98**	-0,85
TR_17036_c0_g1/XP_006385389.1/beta-amylase	AmyB1	K01177 [3.2.1.2]	2,26**	1,09	-1,17
TR_17865_c1_g2/XP_021650272.1/beta-amylase 1	AmyB2	-	1,93**	0,39	-1,54**
TR_17770_c0_g2/KHF98972.1/alpha-glucan phosphorylase	AGP	K00688 [2.4.1.1]	0,75**	0,83**	0,07
TR_14898_c0_g4/XP_017981207.1/alpha-amylase	AmyA	K01176 [3.2.1.1]	-0,44	1,18*	1,62*
TR_17517_c0_g2/AFH77957.1/vacuolar invertase	vINV	K01193 [3.2.1.26]	1,32**	-0,96*	-2,28**
TR_17282_c0_g1/XP_011000150.1/soluble invertase	sINV	K01193 [3.2.1.26]	0,72	1,52**	0,80
TR_11632_c0_g1/XP_021283894.1/monosaccharide-sensing protein	MST	-	-0,39	1,45**	0,82
TR_13074_c0_g1/XP_021655634.1/bidirectional sugar transporter SWEET1	SWEET1	K15382	0,62	3,03**	3,43**
TR_13530_c1_g1/XP_021679769.1/bidirectional sugar transporter SWEET2	SWEET2	K15382	0,81	1,07**	0,26
TR_17564_c0_g1/XP_021641487.1/sucrose-phosphate synthase	SPS	K00696 [2.4.1.14]	0,17	1,94*	1,76*

Fonte: elaborada pelo autor.

6.3.11 Transcritos diferencialmente expressos envolvidos na regulação da firmeza da acerola durante o amadurecimento

No presente estudo, pelo menos 54 transcritos associados à remodelagem da parede celular (pectina, hemicelulose e celulose) registraram aumentos significativos em função do amadurecimento dos frutos (Tabela 12). Em relação à degradação da pectina, transcritos codificando para enzimas envolvidas na degradação da homogalacturonana, dentre eles: três poligalacturonases (PG; TR_14145_c0_g1, TR_14016_c2_g1 e TR_12269_c0_g1), pectato liases (PL; TR_16340_c1_g3, TR_13183_c3_g1 e TR_13183_c3_g2) e galacturonosiltransferases (GAULT; TR_17080_c0_g3, TR_14614_c3_g2 e TR_16461_c0_g1); quatro pectinesterases (PME; TR_18103_c1_g5, TR_16514_c0_g3, TR_18103_c1_g7 e TR_15034_c2_g1) foram todos regulados positivamente (Tabela 12). Além disso, o aumento da expressão de dois transcritos (TR_16711_c0_g1 e TR_13070_c0_g1) codificadores de arabinosiltransferase (ARAT) e beta-1,3-galactosiltransferase (B3GALT; TR_14611_c1_g2) indicaram a degradação de polímeros de arabinanas e arabinogalactanas – ramificações da ramnogalacturonana tipo I (Tabela 12). Ainda, a glicoproteína arabinogalactana (AGP protein; TR_13434_c4_g2) e manana endo-1,4-beta-manosidase (MANs; TR_17428_c0_g2, TR_14931_c1_g1 e TR_17428_c1_g1) foram reguladas positivamente ao longo do amadurecimento.

A abundância de três transcritos xiloglucano endotransglucosilase/hidrolases (*XTH/XET*; TR_18195_c0_g2, TR_18195_c0_g1 e TR_8763_c1_g1), glicano endo-1,3-beta-glicosidases (*GEG*; TR_17229_c5_g1, TR_10533_c0_g1 e TR_10852_c0_g1), dois beta-xilosidases (*XYD*; TR_22555_c0_g1 e TR_9533_c0_g1) e uma endo-1,4-beta-xilanase (*XYN*; TR_15868_c0_g2), envolvidos na degradação de xiloglucanos (hemicelulose), também aumentaram em frutos maduros (Tabela 12). Verificou-se também a regulação positiva de transcritos de três beta-glicosidases (*BGL*; TR_18558_c1_g1, TR_18264_c0_g3 e TR_14374_c0_g1; \log_2FC ; 1,7 a 4,9), dois endo-1,4-beta-glicanase (*EGL*; TR_18522_c1_g8 e TR_16666_c2_g2; \log_2FC ; 3 a 7,5) e uma endoglicanase (TR_14215_c1_g2), codificando enzimas do complexo multienzimático da celulase (Tabela 12).

Tabela 12 – Lista de transcritos diferencialmente expressos codificando para proteínas/enzimas envolvidas no metabolismo da parede celular de da acerola e suas respectivas atribuições ao KEGG. Transcritos considerados como diferencialmente expressos exibiram $\log_2 \text{fold change} \geq 1$ ou ≤ -1 e $\text{FDR} < 0,05$. Foram estabelecidas as seguintes comparações: Frutos intermediários (16 DAA) versus verdes (12 DAA), frutos maduros (20 DAA) vs. verdes (12 DAA), frutos maduros (20 DAA) vs. intermediários (16 DAA). Os símbolos * e ** significam $\text{FDR} < 0,05$ e $0,01$, respectivamente.

ID dos transcritos	Enzimas	Números EC	Valores de $\log_2 \text{fold change}$		
			16 vs. 12 DAA	20 vs. 12 DAA	20 vs. 16 DAA
TR_14145_c0_g1/XP_011034135.1/polygalacturonase	PG3	-	1,11	2,49**	1,37
TR_14016_c2_g1/XP_021672763.1/polygalacturonase	PG2	K01213 [3.2.1.67]	0,70	2,07**	1,36**
TR_12269_c0_g1/XP_021673211.1/polygalacturonase	PG1	K01213 [3.2.1.67]	7,48**	8,58**	1,10**
TR_16340_c1_g3/XP_021636032.1/pectate lyase 8	PL8	K01728 [4.2.2.2]	0,94	3,89**	2,94
TR_13183_c3_g1/XP_021648160.1/pectate lyase 18	PL18	K01728 [4.2.2.2]	0,99	2,46*	1,46
TR_13183_c3_g2/XP_021614688.1/pectate lyase 5	PL5	K01728 [4.2.2.2]	1,37	2,11*	0,73
TR_17080_c0_g3/XP_007044464.2/galacturonosyltransferase-like 9	GAULT9	-	0,13	2,51**	2,37**
TR_14614_c3_g2/XP_021651368.1/galacturonosyltransferase-like	GAULT9b	-	0,85	2,45*	1,59
TR_16461_c0_g1/XP_012082218.1/galacturonosyltransferase 4	GAULT4	-	0,71	1,43**	0,71
TR_18103_c1_g5/XP_021639441.1/pectinesterase 1	PME1	K01051 [3.1.1.11]	3,83**	5,94**	2,10
TR_16514_c0_g3/XP_021677422.1/pectinesterase 15	PME15	-	2,40**	4,3**	1,89
TR_18103_c1_g7/EOY30121.1/pectin methylesterase 3	PME3	K01051 [3.1.1.11]	1,91*	3,65**	1,73*
TR_15034_c2_g1/XP_018850544.1/pectinesterase-like	PME-like	K01051 [3.1.1.11]	1,17	1,63*	0,46
TR_16711_c0_g1/XP_021654600.1/arabinosyltransferase	ARAT1	-	0,56	2,03*	1,47
TR_13070_c0_g1/XP_011013802.1/arabinosyltransferase	ARAT2	-	0,96	1,60*	0,63
TR_14611_c1_g2/XP_011463344.1/beta-1,3-galactosyltransferase 2	B3GALT	-	0,86	1,85**	0,99

TR_13434_c4_g2/NP_200137.1/arabinogalactan protein 22	AGP22	-	1,95**	2,68**	0,73
TR_17428_c0_g2/XP_021676093.1/mannan endo-1,4-beta-mannosidase 4	MAN4	K19355 [3.2.1.78]	3,14**	4,98**	1,83**
TR_14931_c1_g1/XP_021671996.1/mannan endo-1,4-beta-mannosidase 7	MAN7	K19355 [3.2.1.78]	2,09**	3,79**	1,70**
TR_17428_c1_g1/XP_021685066.1/mannan endo-1,4-beta-mannosidase 2	MAN2	K19355 [3.2.1.78]	1,64**	2,14**	0,49
TR_18195_c0_g2/XP_021672823.1/xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase	XTH/XET1	K08235 [2.4.1.207]	2,11**	6,11**	4,00**
TR_18195_c0_g1/XP_021679869.1/xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase	XTH/XET2	K08235 [2.4.1.207]	3,43**	4,38**	0,94
TR_8763_c1_g1/XP_021655226.1/xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase	XTH/XET3	K14504 [2.4.1.207]	0,55	3,86**	3,30**
TR_17229_c5_g1/XP_021655314.1/glucan endo-1,3-beta-glucosidase A6	GEG-A6	-	1,02*	1,24**	0,21
TR_10533_c0_g1/XP_021655992.1/ glucan 1,3-beta-glucosidase A	GEG-A	-	1,05	2,36**	1,30
TR_10852_c0_g1/XP_011039449.1/glucan endo-1,3-beta-glucosidase	GEG	-	-0,18	1,98**	2,16**
TR_9533_c0_g1/XP_021660154.1/beta-D-xylosidase 5	XYD5	-	0,68	5,95**	5,26**
TR_22555_c0_g1/XP_021660154.1/beta-D-xylosidase	XYD1	-	-0,72	3,63**	4,36**
TR_15868_c0_g2/XP_015575457.1/endo-1,4-beta-xylanase A	XYN-A	-	1,68*	2,73**	1,04
TR_18558_c1_g1/XP_021281062.1/beta-glucosidase 11	BGL11	K01188 [3.2.1.21]	1,05	4,98**	3,83**
TR_18264_c0_g3/XP_021664181.1/beta-glucosidase 40	BGL40	K01188 [3.2.1.21]	0,40	2,38**	1,97**
TR_14374_c0_g1/XP_021651072.1/beta-glucosidase 41	BGL41	K01188 [3.2.1.21]	0,90	1,71**	0,81
TR_18522_c1_g8/APR63564.1/endo-1,4-beta-glucanase B14	EGL-B14	K01179 [3.2.1.4]	2,52*	7,48**	4,96**
TR_16666_c2_g2/AKH03677.1/endo-1,4-beta-glucanase	EGL	-	1,96*	3,04**	1,07
TR_14215_c1_g2/XP_007040506.2/endoglucanase 6	EGL6	-	2,30**	3,72**	1,41*
TR_11976_c0_g1/XP_021686981.1/expansin-B2	EXP-B2	K20628	2,52**	6,99**	4,47**
TR_16279_c1_g2/ARA90630.1/alpha-expansin	EXP-A1	K20628	3,91**	6,8**	2,88**
TR_16567_c0_g5/KHG15821.1/Expansin-A4 -like	EXP-A4-like	-	2,75**	3,14**	0,39
TR_17053_c1_g6/XP_015583914.1/expansin-A4	EXP-A4	-	2,74**	3,04**	0,30

TR_16567_c0_g6/XP_021653849.1/expansin-A4-like	EXP-A4a-like	-	0,45	2,79*	2,33
TR_16279_c1_g3/OMO82502.1/expansin	EXP	K20628	2,11**	2,28**	0,16
TR_15566_c0_g3/ABR57478.1/alpha-expansin 6	EXP-A6	K20628	1,90**	2,24**	0,34
TR_13892_c0_g2/XP_021685206.1/expansin-B3-like	EXP-B3	K20628	1,50	2,34**	0,83
TR_13575_c0_g1/APR63590.1/cellulose synthase-like protein E1	CESY-E1	-	0,78	2,79**	2,01*
TR_16044_c0_g1/XP_021689910.1/cellulose synthase-like protein E6	CESY-E6	-	1,72**	2,45**	0,72
TR_15615_c3_g1/XP_015964704.1/cellulose synthase-like protein D3	CESY-D3	K20924 [2.4.1.-]	1,55**	2,02**	0,47
TR_18095_c0_g1/XP_017191507.1/cellulose synthase-like protein G3	CESY-G3	-	4,29**	10,2**	5,91**
TR_16097_c0_g1/EEF42356.1/cellulose synthase A catalytic subunit 3	CESY-A	K20924 [2.4.1.-]	1,08**	1,97**	0,88
TR_14867_c2_g4/APR63605.1/cellulose synthase-like protein C3	CESY-C3	-	0,15	2,2**	2,04**
TR_16179_c0_g2/NP_189118.1/cellulose synthase, putative DUF1644	CESY	-	0,22	1,07**	0,84
TR_9506_c0_g2/NP_564769.1/1,3-beta-glucan synthase component	GLSY	-	2,15**	3,98**	1,82*
TR_18075_c0_g1/XP_012080311.1/ xyloglucan 6-xylosyltransferase 5	XXT5	K08238 [2.4.2.39]	1,55**	1,55**	-0,00
TR_18075_c0_g6/XP_002516919.1/xyloglucan 6-xylosyltransferase 2	XXT2	K08238 [2.4.2.39]	0,26	1,31**	1,04**
TR_9598_c0_g1/XP_002318880.1/invertase/pectin methylesterase inhibitor	PMEI	-	2,49	8,94**	6,44**

Fonte: elaborada pelo autor.

Neste estudo, oito membros gênicos de expansinas (EXP), dois deles, TR_11976_c0_g1 e TR_16279_c1_g2, apresentando $\log_2FC = 6,8$ e $6,9$ registraram aumentos substanciais até frutos maduros. Além desses, outros seis membros (TR_16567_c0_g5, TR_17053_c1_g6, TR_16279_c1_g3, TR_15566_c0_g3, TR_13892_c0_g2; $\log_2FC = 2,2$ a $3,1$), exceto TR_16567_c0_g6, exibiram aumentos mais significativos na expressão até o estágio intermediário (Tabela 12).

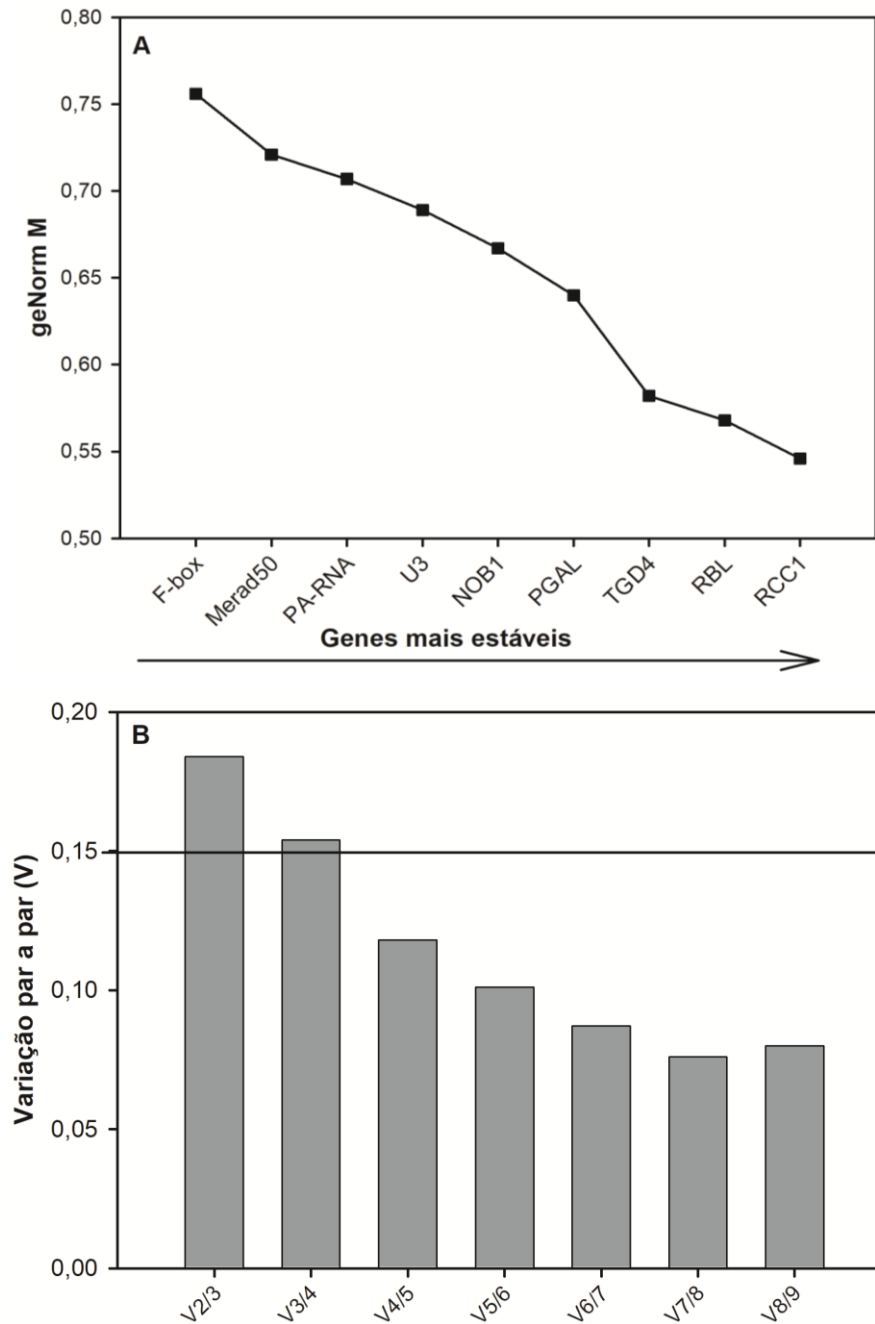
Curiosamente, sete transcritos distintos que codificam para celulose sintases (CESY), um deles TR_18095_c0_g1, com $\log_2FC = 10,2$, e seis (TR_13575_c0_g1, TR_16044_c0_g1, TR_15615_c3_g1, TR_16097_c0_g1, TR_14867_c2_g4 e TR_16179_c0_g2; \log_2FC ; $1,0$ a $3,0$), bem como um transcrito codificando 1,3-beta-glicano sintase (GLSY; TR_9506_c0_g2; $\log_2FC = 3,98$), dois membros da xiloglicano-6-xilosiltransferase (XXT; TR_18075_c0_g1 e TR_18075_c0_g6) e um inibidor da pectinesterase (PMEI; TR_9598_c0_g1; $\log_2FC = 8,9$) aumentaram gradualmente até frutos maduros (Tabela 12).

6.4 Validação dos dados de RNA-seq por RT-qPCR

6.4.1 Confirmação da qualidade dos iniciadores e da estabilidade dos genes

A análise da curva de dissociação de cada par de iniciadores mostrou a presença de um único pico (Dados não mostrados), sugerindo a amplificação de apenas um único produto gênico, dessa forma confirmando a especificidade dos iniciadores desenhados. A análise de estabilidade de expressão (valor de $M < 0,75$) mostrou que os 9 genes de referência selecionados (*F-box*, *Merad50-ATPase*, *PA-RNA*, *U3*, *NOB1*, *PGAL*, *TGD4*, *RBL* e *RCC1*) apresentaram estabilidade similar àquela previamente verificada nas análises de RNA-seq (Figura 12A). De acordo com Vandesompele *et al.* (2002) genes que apresentam valores de estabilidade (valor de $M < 1,5$) e variação par a par de genes ($V_n/V_{n+1} < 0,15$) são estáveis e adequados para uso como genes de controle endógeno. De maneira geral, observou-se estabilidade similar entre os genes, destacando *F-box* e *RCC1* como o menos e o mais estável, respectivamente. A variação par a par ($V_6/V_7 < 0,087$) evidenciou que os 7 primeiros genes mais estáveis, em conjunto (*PA-RNA*, *U3*, *NOB1*, *PGAL*, *TGD4*, *RBL* e *RCC1*) são os mais indicados para a normalização da expressão dos genes interesse nos órgãos estudados (Figura 12B).

Figura 12 – Confirmação por RT-qPCR da estabilidade de expressão (valor de M) (A) e da variação par a par (B) de nove genes candidatos.



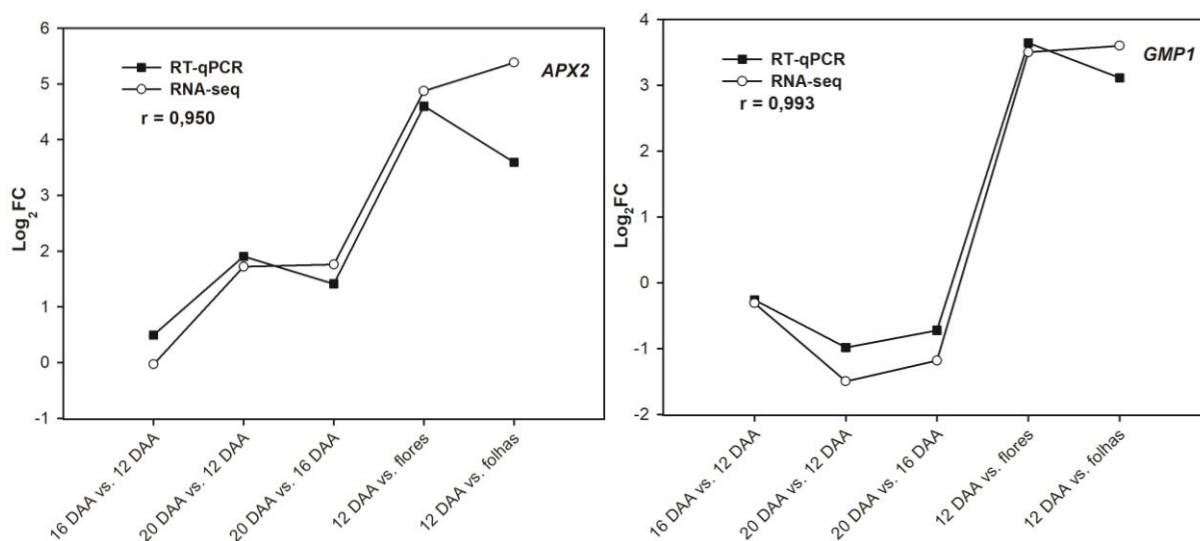
Fonte: elaborada pelo autor.

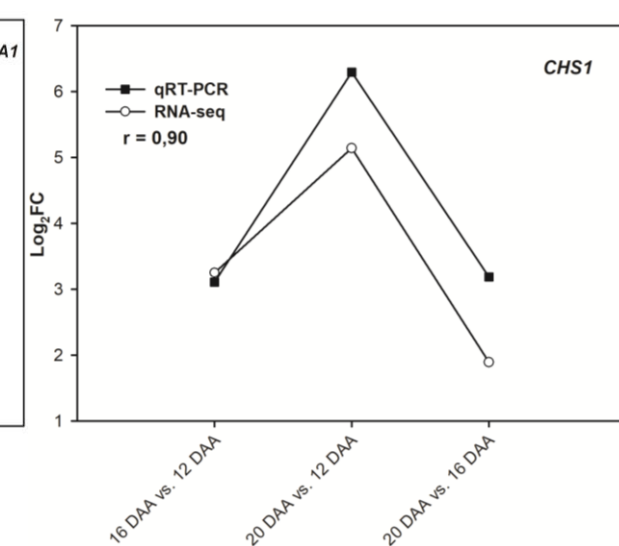
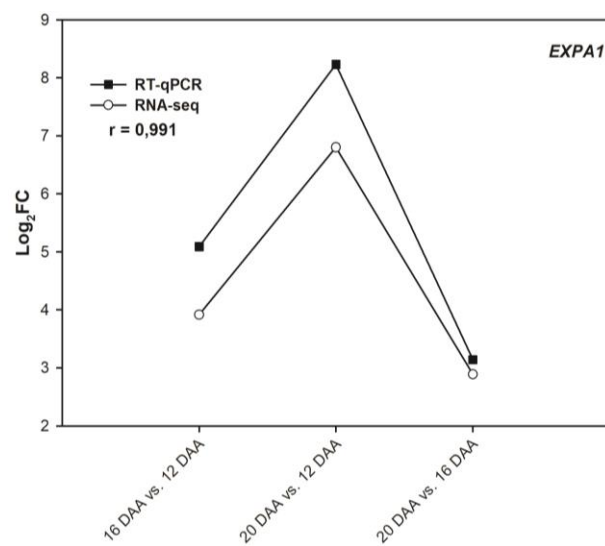
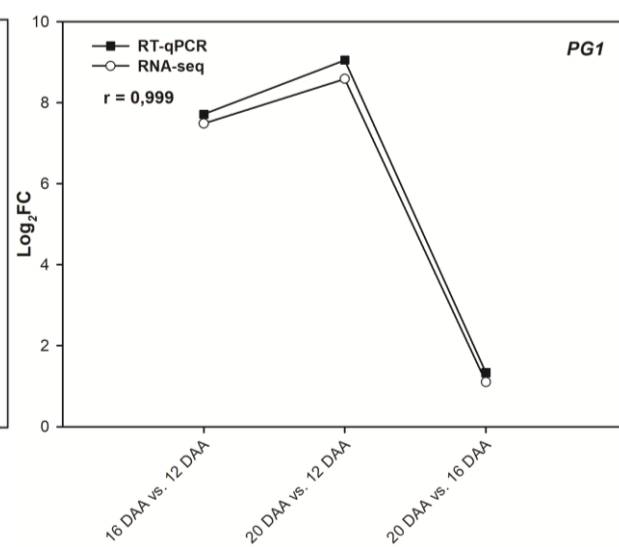
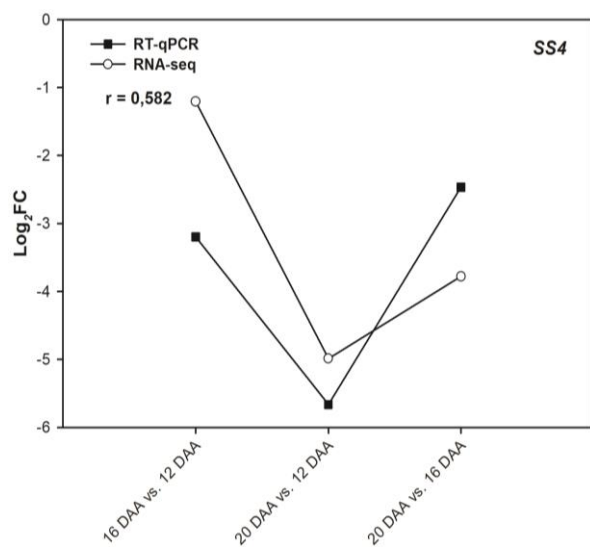
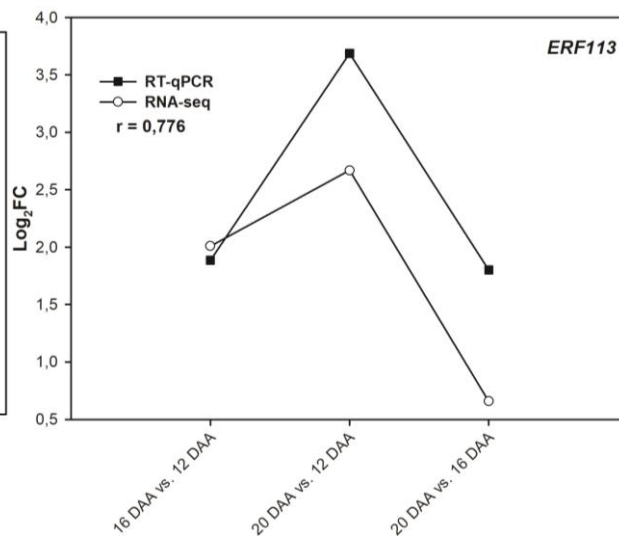
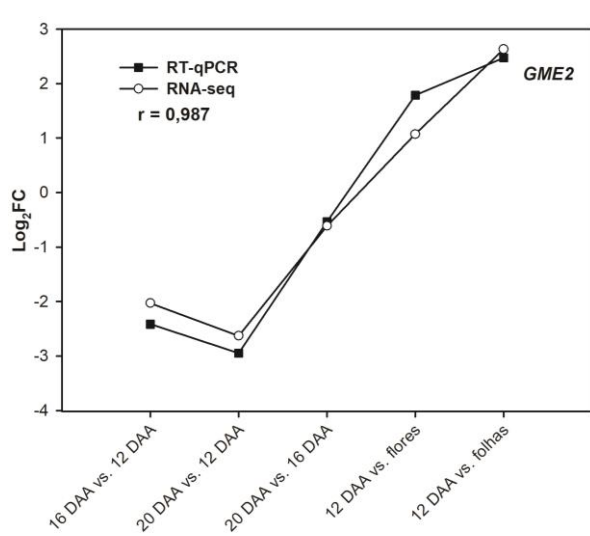
6.4.2 Validação do perfil de expressão via RNA-seq através de RT-qPCR

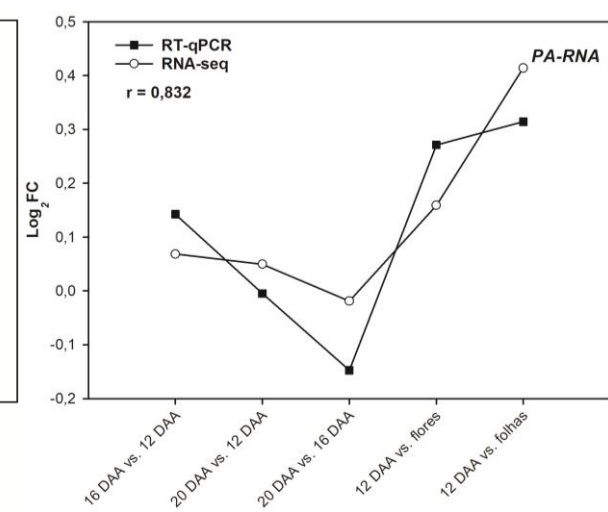
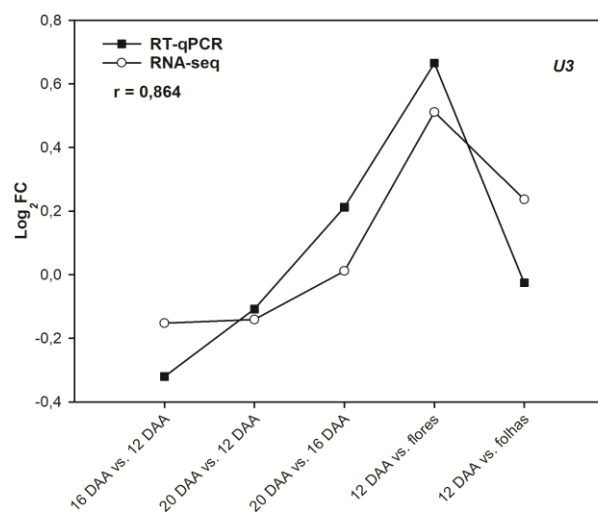
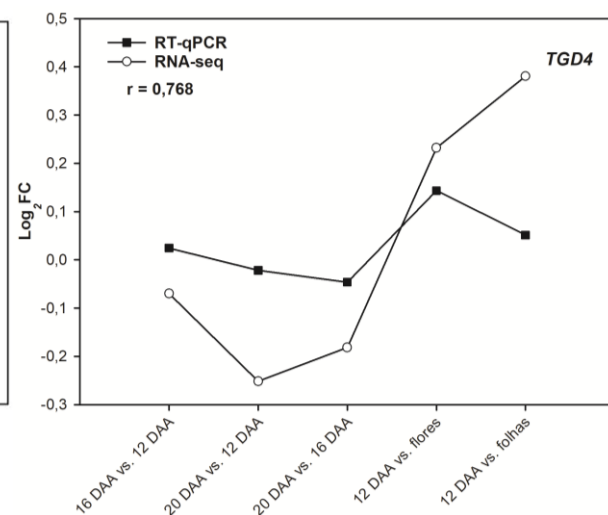
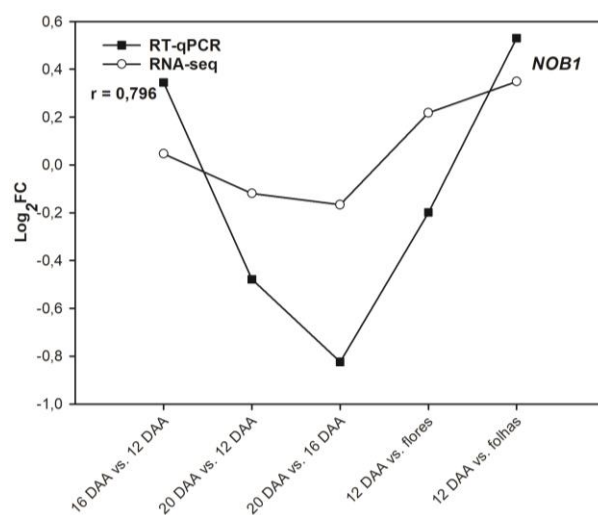
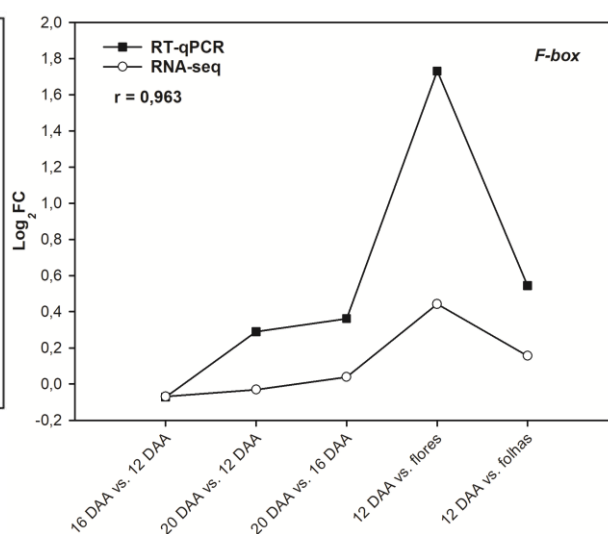
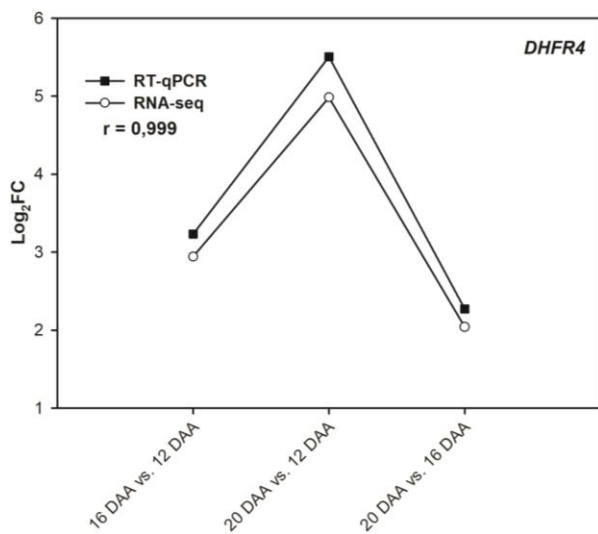
Todos os nove TDEs alvo (*APX2*, *GMP1*, *GME2*, *ERF113*, *SS4*, *PG1*, *EXPA1*, *CHS1* e *DHFR4*) e os nove genes de referência (*F-box*, *NOB1*, *TGD4*, *U3*, *PA-RNA*, *PGAL*, *Merad50-ATPase*, *RBL* e *RCC1*) (Figura 13) apresentaram valores de \log_2FC e/ou perfis de expressão similares àqueles verificados pela técnica de RNA-seq. Quatorze genes revelaram coeficientes

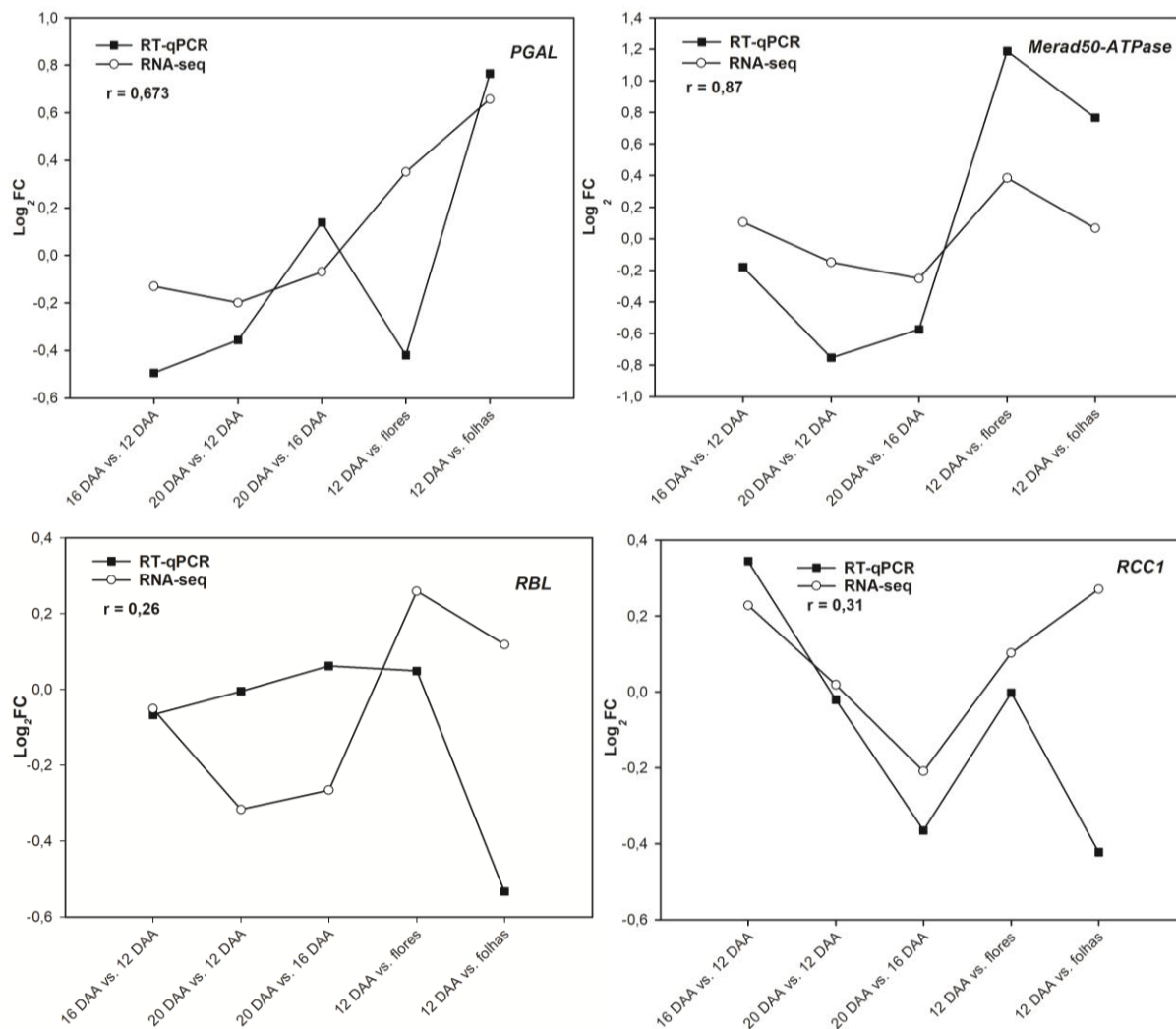
de correlação de Pearson (r) positivo e alto (entre 0,76 e 0,999). Apenas dois genes *SS4* ($r = 0,58$) e *PGAL* ($r = 0,67$) apresentaram correlação moderada. Embora, os dois genes de referência mais estáveis, *RBL* ($r = 0,26$) e *RCCI* ($r = 0,31$), tenham apresentado correlação positiva baixa, ambos mantiveram o mesmo perfil de expressão (estabilidade) evidenciada em via RNA-seq e RT-qPCR (Figura 13). A baixa correlação verificada entre as técnicas para *RBL* e *RCCI* é atribuída a alta estabilidade que, ocasionalmente pode resultar em valores de \log_2FC negativos e positivos, discrepantes, porém próximo de zero (0). Vale ressaltar que o conjunto de genes selecionados é representativo de diferentes vias metabólicas, apresentando genes altamente (ex. *GMP1* e *CHS1*) a pouco expresso (ex. *SS4*), bem como altamente diferencialmente expresso (ex. *PGI* e *EXPA1*) à próximo da estabilidade (ex. *RBL* e *RCCI*). No geral, tais resultados confirmaram a precisão e a confiabilidade dos perfis de expressão inferidos após a análise do transcriptoma gerado via RNA-seq.

Figura 13 – Correlação de Pearson (r) dos valores de \log_2FC gerados através da análises de RNA-seq e RT-qPCR para 18 genes.









Fonte: elaborada pelo autor.

7 DISCUSSÃO

Atualmente, o sequenciamento de RNA (RNA-seq) tornou-se a estratégia mais utilizada e adequada para caracterização estrutural e da expressão gênica em larga escala de transcriptomas. A acerola é um fruto de crescente importância socioeconômica, uma vez que vem ganhando consumo, mercado interno e externo, em vista da sua relevância para a nutrição humana e sua aplicabilidade nas indústrias de alimentos (HANAMURA *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Porém, devido a total escassez de dados genômicos disponíveis para a aceroleira, o presente estudo, priorizou a obtenção do perfil transcricional na escala do genoma inteiro. Este estudo produziu o sequenciamento de mRNA de flores, folhas e frutos em três estágios de desenvolvimento, gerando mais de 600 milhões de leituras de 101 pb (Tabela 3). Posteriormente, esse conjunto de leituras resultou nas sequências de 40.830 *contigs* > 300 pb e não redundantes (Tabela 4). Além disso, boa parte deles, 25.298 unigenes (62%) puderam ser anotados através de bancos de dados públicos de proteínas, indicando que as etapas de sequenciamento, montagem e anotação do transcriptoma, procedeu de maneira satisfatória e forneceu resultados de excelente qualidade, e foi bem representativo do *pool* celular do RNA interesse (mRNA).

Vale destacar que a ausência de um genoma de referência bem anotado para aceroleira torna-se um fator limitante do número de sequências anotadas. Somado a isso, outras sequências não anotadas podem representar RNA longos não codificantes (lncRNA > 200 nt), ou outros tipos de RNA que também apresentam calda poli (A) (HRDLICKOVA *et al.*, 2017). Mesmo assim, o presente resultado está de acordo com vários estudos anteriormente descritos para outras espécies frutíferas sem genoma de referência. A taxa de anotação após a montagem *de novo* dos transcriptomas de pimenta (52%) (MARTÍNEZ-LÓPEZ *et al.*, 2014) e abacaxi (59%) (ONG *et al.*, 2012) foi inferior a verificada para o de aceroleira, enquanto a taxa relatada para coco (68%) (FAN *et al.*, 2013) e manga (78%) foi superior (WU *et al.*, 2014).

O típico amadurecimento climatérico da acerola envolve várias alterações bioquímicas e fisiológicas, incluindo a perda de firmeza dos frutos, alteração nos pigmentos (verde para vermelho), acúmulo de açúcares, redução de ascorbato e acúmulo de malato decorrentes do aumento da produção de etileno e da respiração (ALVES *et al.*, 1995; ASSIS *et al.*, 2008; HANAMURA *et al.*, 2008). Todas essas alterações fazem parte de um processo altamente coordenado, geneticamente programado e irreversível, desencadeado pela ativação de um programa de expressão de genes de amadurecimento (GIOVANNONI *et al.*, 2017). Os resultados da análise de expressão dos transcritos revelaram que o controle do processo de

amadurecimento em acerola é mediado através da regulação positiva e/ou negativa da expressão de vários membros da mesma e de diferentes famílias multigênicas. Cerca de 4.326 TDEs foram selecionados como importantes alvos regulatórios dos mais diversos processos bioquímicos e fisiológicos do amadurecimento (Figura 10). No presente estudo, uma investigação direcionada ao metabolismo do ascorbato, etileno, respiração, açúcares e firmeza, confrontada à análise de metabólitos destacou importantes membros gênicos e forneceu uma visão geral da regulação desses metabolismos em acerola.

7.1 Transcritos diferencialmente expressos envolvidos na regulação do metabolismo do ascorbato

A acerola é reconhecida como uma das mais importantes fontes naturais de vitamina C (ASSIS *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Neste estudo, a análise do transcriptoma revelou o perfil de expressão de várias famílias multigênicas que codificam para a biossíntese, reciclagem, degradação e translocação do ascorbato. A respeito da via de biossíntese (L-galactose) verificou-se altos níveis de expressão gênica em todos os órgãos e estádios de desenvolvimento dos frutos analisados (Tabela 7; Tabela S2), evidenciando a predominância desta via para a biossíntese de ascorbato em aceroleira. Esta via de biossíntese é reconhecida como a de maior contribuição em vários outros frutos, incluindo kiwi (*Actinidia eriantha*) (BULLEY *et al.*, 2009), rosa (*Rosa roxburghii*) (HUANG *et al.*, 2014), pimenta (*Capsicum annuum*) (GÓMEZ-GARCÍA; OCHOA-ALEJO, 2016) e jujuba (*Ziziphus jujube*) (ZHANG *et al.*, 2016).

Notavelmente, a redução nos níveis de expressão de transcritos codificando para *PGII*, *PMII*, *PMM*, *GMP1*, 2 e 3, *GME1* e 2 e *GGP1* e 2 se relacionou com a diminuição acentuada nos conteúdos de AAs à medida que o fruto amadureceu (Figura 4; Tabela 7), sugerindo estes membros gênicos como importantes candidatos a regulação dessa via de biossíntese e do acúmulo do ácido em frutos verdes de aceroleira. Estudos prévios associaram a expressão aumentada de membros específicos de *GMP*, *GME*, *GGP* e *GaldH* com os altos valores de AAs encontrados em frutos verdes de aceroleira (BADEJO *et al.*, 2009) e de jujubeira (ZHANG *et al.*, 2016), bem como de frutos maduros de roseira (*Rosa roxburghii*) (HUANG *et al.*, 2014). Em kiwi (*Actinidia eriantha*), o aumento da concentração de AAs ocorreu próximo aos picos de expressão dos genes *AeGGP* e *AeGME*, 6 semanas após a antese. Além disso, a co-expressão de *AeGGP* e *AeGME* em *A. thaliana* aumentou 7 vezes seu conteúdo de AAs, destacando-os como importantes reguladores das quantidades de AAs (BULLEY *et al.*, 2009).

Posteriormente, a menor expressão de membros específicos das famílias *PMM*, *GMP1 e 2*, *GME1 e 2*, *GaldH2*, *GalLDH* em folhas e *PGI2*, *GMP1 e 2*, *GGP1 e 2*, *GaldH1 e 2* em flores, comparados a frutos verdes, sugeriu que a regulação negativa de *GMP1 e 2* e *GaldH2* deve ser um importante requerimento para a menor biossíntese do AAs em folhas e flores, o que é consistente com o baixo conteúdo registrado nestes órgãos. Enquanto os outros membros gênicos destacados parecem ser cruciais para o ajuste fino órgão específico, bem como para o contraste das quantidades de AAs registrado em cada órgão (Figura 4; Tabela 7).

Para a via da L-gulose, a expressão dos genes *GulLOs* foi moderada em flores e quase ausente em frutos (Tabela 7). Recentemente, a caracterização bioquímica e molecular de *GulLO3 e 6* em *A. thaliana* revelou baixa afinidade dessas isoformas pelo substrato (L-gulonono-1,4-lactona), além disso a superexpressão de ambos os genes não alterou significativamente os níveis de AAs (ABOONBUCKER *et al.*, 2017), evidenciando contribuição insignificante para a biossíntese de AAs.

A respeito da via do mio-inositol, embora o gene *MIOX4* tenha reduzido sua expressão durante amadurecimento dos frutos, níveis mais altos foram verificados em flores e folhas. Enquanto isso, *MIOX1* exibiu maior abundância em frutos verdes comparado aos outros estádios e órgãos analisados, evidenciando, a primeira vista, uma provável contribuição desta via para o acúmulo de AAs em frutos verdes. Mesmo assim, em vista desta via convergir com a via da L-gulose (*GulLO3 e 6*), sua contribuição não está clara (Tabela 7). Nas plantas, o mio-inositol desempenha diferentes papéis funcionais além da biossíntese de AAs, os quais incluem sinalização celular, componentes estruturais da parede celular e resposta a estresses (LOEWUS; MURTHY, 2000; GILLASPY, 2011).

A maioria dos genes que codifica para a via do D-galacturonato, dentre eles, *GAE*, *PME*, *GAULT*, *PG* aumentaram sua expressão em função do amadurecimento dos frutos (Tabela 7). Assim, à medida que o D-galacturonato tornou-se disponível com a degradação da pectina, o conteúdo de AAs diminuiu (Figura 4). Tal observação enfatiza a ausência de relação entre a provável disponibilidade de substrato e o acúmulo de AAs. O gene *GalUR3* foi pouco expresso em frutos. Embora esse gene tenha sido mais abundante nos frutos verdes (Tabela 7), sua baixa expressão e sua não associação com a disponibilidade de substrato nos frutos maduros sugere contribuição incerta dessa via.

Em suma, os níveis de expressão de genes relacionados as vias da L-gulose, mio-inositol e D-galacturonato, bem como sua dinâmica transcricional durante o amadurecimento apresentaram nenhuma relação clara com os altos conteúdos de AAs detectados em frutos verdes, de modo a sugerir contribuição incerta dessas vias para o acúmulo do AAs neste

estádio (Tabela 7; Tabela S2; Figura 4) como relatado nos frutos de kiwizeiro (BULLEY *et al.*, 2009) e pimenteira (GÓMEZ-GARCÍA; OCHOA-ALEJO, 2016). De qualquer forma, estudos posteriores do proteoma, bem como o silenciamento de membros gênicos específicos serão cruciais para esclarecer a significância de dessas vias para o acúmulo de AAs em acerola.

Mesmo assim, as vias mencionadas acima demonstraram relevante contribuição em outros frutos. Em jujuba e laranja, tanto a via da L-galactose quanto a do mio-inositol foram destacadas como de importante contribuição para o acúmulo e a manutenção das reservas de AAs (ALÓS *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2016). Para tomate, a via da L-galactose foi sugerida como predominante em frutos imaturos, enquanto a expressão aumentada dos genes *GalUR* (BADEJO *et al.*, 2012), *PME*, *PG* e *GAE* (RIGANO *et al.*, 2018) foi consistente com o acúmulo de AAs em frutos maduros, evidenciando a predominância da via do D-galacturonato neste estágio. Em morango, a expressão aumentada do gene *GalUR* (via do D-galacturonato), em cerca de 150 vezes, e do *MIOX4* (via do mio-inositol) foram fortemente associadas com o acúmulo do AAs durante o amadurecimento do fruto (CRUZ-RUS *et al.*, 2011).

A respeito dos outros processos envolvidos na regulação do AAs, a expressão aumentada de vários transcritos codificando para prováveis transportadores de ascorbato (*NAT3*, *4*, *6* e *6-like*) e para via de reciclagem (*MDHAR2* e *DHAR1*) em frutos verdes (Tabela 8), sugeriu que o acúmulo de AAs neste estágio, depende também do transporte do desidroascorbato de órgãos, como folhas, seguido da ação cooperativa da *MDHAR2* e *DHAR1* para uma eficiente regeneração de DHA translocado, bem como daqueles produzidos nos frutos via a expressão aumentada das isoformas APX1 e 6 plastidiais.

De acordo com Huang *et al.* (2014) o ciclo da glutathiona-ascorbato oferece contribuição similar ou superior que a via de biossíntese (L-galactose) para o acúmulo de AAs. Tal conclusão dos autores foi suportada pelos perfis de expressão e atividade aumentada da *DHAR*, que mostraram-se determinantes para o controle do estado redox do AAs em frutos de *Rosa roxburghii*. Outros estudos têm enfatizado o papel central da regulação positiva simultânea dos genes *MDHAR2* e *DHAR1* para o reestabelecimento de AAs em frutos verdes de kiwizeiro e o seu acúmulo em frutos de jujubeira nos estádios de expansão II e branco (BULLEY *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2016), de modo similar ao verificado para acerola no presente estudo. Curiosamente, Eltelib *et al.* (2011) verificaram a maior abundância de *DHAR1* no estágio intermediário, enquanto a expressão de *MDHAR2* foi detectada apenas em frutos muito maduros de aceroleira, não se relacionando com o acúmulo do AAs em frutos

verdes. Em contrapartida, Horemans *et al.* (2008) demonstraram em *A. thaliana* que o desidroascorbato é a forma escolhida para a translocação deste ácido, via transportador similar e distinto ao de glicose, o GLUT. Além disso, foi demonstrado que a translocação do ascorbato das folhas de tomateiro contribuiu para o aumento do seu conteúdo em frutos imaturos (BADEJO *et al.*, 2012).

Durante o amadurecimento, os frutos diminuíram gradativamente a expressão dos genes anteriormente associados ao acúmulo de AAs no estágio verde (Tabela 7 e 8). Enquanto apenas *MDHAR4* e *NAT1*, porém notavelmente *APX2*, *AO2* e *3* foram regulados positivamente em frutos maduros (Tabela 8). Tais resultados sugerem que, durante o amadurecimento, os frutos sofreram regulação negativa da via da L-galactose e menor eficiência dos sistemas de reciclagem e translocação. Tal cenário parece ter sido acompanhado de um processo de degradação mais ativo, que culminou em substancial depleção de AAs. Estudos com pimenta, rosa e jujuba têm demonstrado que o acúmulo de AAs é negativamente correlacionado com a expressão aumentada de genes *AO* e *APX* (ALÓS *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2016). Segundo Asenjo (1959), citado por Alves *et al.* (1995), a degradação de AAs em acerola foi acompanhada pelo aumento da atividade da *AO* até frutos maduros.

Notavelmente, a expressão aumentada de *APX5* e dos transcritos *AO2-10*, porém de apenas *MDHAR1* em flores (Tabela 8), bem como da *APX5*, *6-like*, *tAPX*, *AO3*, *5*, *6* e *7*, *MDHAR2* e *DHAR3* em folhas (Tabela 8) auxiliou na compreensão a respeito das proporções das quantidades da forma reduzida e da oxidada verificado nesses órgãos quando comparado a frutos verdes (Figura 4). O grande número de transcritos *APX* e *AO* regulados positivamente em flores e folhas sugeriu que o processo de oxidação/degradação parece superar a eficiência/capacidade do sistema de reciclagem, uma vez que foram verificadas altas quantidades de DHA em flores e moderadas em folhas (Figura 4). Tais níveis de AAs oxidado indicaram taxas de degradação significativas, mas também parecem ser necessários para a translocação por isoformas específicas *NAT2* e *7* (flores) e *NAT7* e *12* (folhas) para outros órgãos (ex. frutos), o que é consistente com a função antioxidante e transportadora desses órgãos (ZHANG *et al.*, 2016).

7.2 As quantidades de etileno e dióxido de carbono envolvem a regulação de um complexo programa de expressão gênica temporal

O etileno é um hormônio chave para iniciação e controle do amadurecimento de frutos climatéricos, sendo responsável por induzir um aumento dramático da taxa respiratória (TUCKER, 1993; COLOMBIÉ *et al.*, 2017). Acerola é um fruto climatérico que produz pico respiratório elevado, o qual resulta no amadurecimento acelerado dos frutos, tornando-os rapidamente perecíveis quando separados da planta mãe (CARRINGTON; KING, 2002; ASSIS *et al.*, 2008). No presente trabalho, tanto o etileno quanto o CO₂ revelaram maiores concentrações em frutos verdes (Figura 3B-C). Nordey *et al.* (2016) verificaram que a retirada de frutos verdes de mangueira da planta, promoveu o aumento da produção de etileno e CO₂, a qual foi associada à perda de água e ao aumento da resistência do exocarpo do fruto à difusão gasosa, que segundo os autores, desencadeou o início do amadurecimento. De maneira semelhante, o pico respiratório observado em frutos de meloeiro retirados da planta, porém não verificado em frutos amadurecidos na planta, foi interpretado como um artefato causado pelo estresse devido a separação do fruto da planta (BOWER *et al.*, 2002; SHELLIE; SALTVEIT, 1993).

No corrente estudo, a quantidade de CO₂ de frutos verdes (58.9 mg.kg⁻¹.h⁻¹) (Figura 3C) revelou um valor intermediário quando comparado com a taxa de respiração basal (42 mg.kg⁻¹.h⁻¹) de frutos colhidos no estágio intermediário, e do pico climatérico (80 mg.kg⁻¹.h⁻¹) após 3–4 dias de armazenamento dos frutos (ALVES *et al.*, 1995). De acordo com Carrington; King (2002), a respiração da acerola colhidos no estágio verde aumentou rapidamente até atingir elevada taxa respiratória (900 mL.kg⁻¹.h⁻¹), quando os frutos exibiram coloração laranja-vermelha. Porém, estes autores observaram quantidades muito baixa de etileno (3,8 µL.kg⁻¹.h⁻¹), em torno de 3 dias após a colheita, quando comparado aquelas descritas neste estudo para os frutos nos estádios verde e intermediário (13,3–10,9 µg.kg⁻¹.h⁻¹) (Figura 3B). É importante ressaltar que, no presente trabalho, não foi possível detectar os picos de produção de etileno ou de CO₂, uma vez que os frutos foram colhidos e após uma hora submetidos a quantificação gasosa.

As maiores quantidades de etileno e CO₂ registrada em frutos verdes estiveram de acordo com a indução de vários genes ERFs (*ERF039*, *ERF109*, *ERF1-like* e *ERF-1B*), regulação positiva de transcritos *CTR1* e *2*, *EIN3* e ERFs (*RAP2*, *ERF105*, *ERF4-like*, *ERF107*, *RAP2/12-like*, *ERF1B-like* e *ERF4*), bem como *cyPFK6*, *cyPGM4* (glicólise) e várias subunidades do complexo I, II, IV e ATP-sintases envolvidos nos processos de transporte de elétrons/fosforilação oxidativa (Tabela 9 e 10). Estes resultados indicaram que a

retirada dos frutos verdes da planta, possivelmente ativou o início do amadurecimento, conforme relatado para frutos verdes colhidos da mangueira (NORDEY *et al.*, 2016). Como esperado, a colheita dos frutos verdes bloqueou o dreno de sacarose, o que imediatamente refletiu no aumento da taxa respiratória. Segundo Colombié *et al.* (2017), o aumento da respiração é concomitante com o aumento na produção de ATP para suprir as necessidades energéticas dos frutos. É importante ressaltar que a maioria dos transcritos regulados positivamente codifica para enzimas/complexos enzimáticos de reconhecida função regulatória da respiração (TUCKER, 1993; ZEEMAN, 2015). Em tomate, o pico de atividade da PFK, antecedeu o início do amadurecimento e foi relacionado com a necessidade de reciclagem de hexoses fosfato, proveniente do início da degradação do amido (BIAIS *et al.*, 2014).

O modelo mais bem aceito para a sinalização de etileno propõe que a redução nos níveis do receptor de etileno (ETR) aumenta sua sensibilidade (KLEE; GIOVANNONI, 2011). Além disso, sua associação com o etileno ativa a degradação dos receptores, de maneira a favorecer a transdução de sinal (KEVANY *et al.*, 2007). Nesse contexto, a expressão aumentada de transcritos *ETR1* e *2* e *EBF1/2a-c* coincidiram com a maior quantidade de etileno registrada em frutos verdes (Tabela 9; Figura 3B), sugerindo inicialmente, a necessidade de aumento na produção de hormônio para desencadear a degradação do receptor, e assim favorecer a ativação do início do amadurecimento.

Notavelmente, os níveis de etileno não mudaram significativamente do estágio verde para o intermediário (Figura 3B) e pôde ser relacionado ao notório aumento nos níveis de transcritos *ACS2* envolvidos na biossíntese, e com a diminuição de transcritos *ETR1* e *2* (percepção) e *EBF1/2a-c* (transdução) (Tabela 9), fornecendo evidências de que o pico de etileno na planta, provavelmente ocorreu em frutos entre os estádios intermediário e maduro. De maneira similar, em nêspera (*Eriobotrya japonica*), um fruto de comportamento (não) climatérico ainda em debate, verificou-se que a maior produção de etileno coincidiu com a menor expressão dos genes *ERS1a* e *b*, no estágio intermediário (cor amarela) de frutos colhidos (ALOS *et al.*, 2017). Em contrapartida, em tomate, a expressão dos genes *ETR3* e *4* e *EBF1*, *2* e *3* aumentaram durante o amadurecimento, coincidindo com o pico de expressão de membros específicos de *ACS2*, *ACO1* e *2*, *CTR1* e *ERF-E1*, *E2* e *E4* no início do amadurecimento e precedendo o pico de etileno (LIU *et al.*, 2015). Segundo, Nordey *et al.* (2016), o amadurecimento de manga na planta revelou a ocorrência de pico de etileno tardio e respiratório mais baixo, quando comparado aos frutos armazenados, o que explica o amadurecimento mais lento do fruto na planta. Estudos com melão nesta mesma linha de

raciocínio, revelaram que o amadurecimento do fruto na planta é acompanhado apenas de pico de etileno, levando os autores a hipotetizar que: (1) o etileno é essencial, mas a planta consegue seletivamente inibir certos efeitos mediados por ele; (2) o pico respiratório não é essencial para o amadurecimento (SHELLIE; SALTVEIT, 1993; BOWER *et al.*, 2002). De qualquer forma, estudos futuros a respeito da quantificação do etileno e CO₂ da acerola amadurecida na planta e armazenada são requeridos para maiores esclarecimentos sobre o comportamento climatérico deste fruto em ambas as condições.

Adicionalmente, no presente estudo, foi registrado forte declínio de etileno em frutos maduros de aceroleira. Embora, este resultado seja consistente com o aumento da expressão de *ETR1* e 2 e *EBF1/2a-c* (menor sensibilidade), foi inconsistente com os picos de expressão dos transcritos *ACS1* e 2 e *ACO2* neste estágio (Figura 3B e Tabela 9). De acordo com De Poel *et al.* (2012), no tomate, a fase pós-climatérica é caracterizada pela diminuição gradual da quantidade de etileno, que segundo estes autores é requerida para atrasar a senescência e maximizar o tempo disponível para a dispersão das sementes. De maneira similar, em nêspera, a maior produção de etileno em frutos amarelos não relacionou com a maior expressão dos genes *ACS1* e *ACO1* exibida em frutos maduros (ALOS *et al.*, 2017). Uma explicação proposta por Alos *et al.* (2017) foi o possível envolvimento de outros genes, não analisados, na regulação da produção do pico de etileno. Em contrapartida, o aumento na produção de etileno em pêsego e em maçã foi acompanhado de incrementos na abundância dos transcritos *ACS1*, *ACO1* e 2 (MATHOOKO *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2013).

As isoformas de ACS e ACO são codificadas por famílias multigênicas. Só no genoma de tomate, foram detectados 14 genes *ACS* e 6 *ACO* (LIU *et al.*, 2015). No presente estudo, apenas 3 genes *ACS* e 3 *ACO* foram detectados (Dados não mostrados). Em vista disso, especula-se o potencial papel regulatório de outros genes *ACS* e/ou *ACO*, não detectados no transcriptoma de acerola, em estádios anteriores ao do fruto maduro, bem como a regulação pós-transcricional e/ou traducional de *ACS1* e 2 ou *ACO2* na fase pós-climatérica. Estudos têm destacado que ambas as enzimas, ACS e ACO, constituem etapas limitantes da produção de etileno, passíveis de regulação pós-transcricional e/ou traducional (DE POEL; DER STRAETEN, 2014). Em tomate, De Poel *et al.* (2012), relacionaram apenas a redução da atividade da ACO com a diminuição da produção de etileno na fase pós-climatérica do amadurecimento, uma vez que a expressão e a atividade de isoformas ACS aumentaram. De acordo com De Poel; Der Straeten (2014), a regulação da produção de etileno ocorre também nos níveis de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) disponíveis, pois trata-se de uma molécula versátil que pode ser conjugada a malonil-ACC, glutamil-ACC e jasmonil-ACC,

acumulada no vacúolo, transportada a curta e longas distâncias, que pode funcionar como molécula sinalizadora independente do etileno.

Vale ressaltar que, além do grande número de *ERFs* regulados positivamente em frutos verdes, *EIN2*, dois *ERFs* (*ERF113* e *ERF-AP2-3*) foram regulados positivamente e três *ERFs* (*ERF-ABR1*, *ERF/LEP-like* e *ERF/ESR2*) foram induzidos em frutos maduros de aceroleira (Tabela 9). De maneira geral, o grande número de *ERFs* diferencialmente expressos e induzidos, ao longo do amadurecimento, sugeriu que a ativação de genes de amadurecimento faz parte de uma rede regulatória, altamente complexa, mediada pela expressão temporal de membros específicos de *ERFs*, que por sua vez, depende de uma importante coreografia da expressão de membros envolvidos na biossíntese, percepção e transdução de sinal desse hormônio, que em conjunto modulam os níveis de etileno e a ativação ou desativação de vários genes de amadurecimento.

O estudo realizado por Karlova *et al.* (2011) revelou que a ativação de um membro *ERF-AP2* tem dupla função no amadurecimento do tomate: regulador positivo ao promover a ativação de diferentes genes envolvidos em diferentes processos do amadurecimento, e negativo da síntese de etileno. Recentemente, foi demonstrado que um fator *ERF2* de maçã se liga a região promotora de *MdACSI*, de modo a evitar a ligação do ativador *ERF3*, suprimindo, desta forma, a expressão de *ACSI*, e resultando no declínio da produção de etileno durante o amadurecimento (LI *et al.*, 2016). No genoma do tomateiro, foram identificados 77 genes *ERFs*. Destes, 27 genes exibiram expressão aumentada no início do amadurecimento, ao passo que 28 reduziram os níveis de expressão durante o amadurecimento, corroborando também com o presente achado na acerola (LIU *et al.*, 2016).

A respeito da respiração, à medida que a expressão dos transcritos regulados positivamente em frutos verdes e codificando para a glicólise citosólica (*cyPFK6* e *cyPGM4*), subunidades da CTE (complexos I, II e IV) e da fosforilação oxidativa (V-ATP sintases) mitocondrial diminuiu sua abundância com o avanço do amadurecimento da acerola, a produção de CO₂ também declinou (Tabela 10; Figura 3C). Simultaneamente, outros membros codificando para a glicólise (*cPFK5* e *cPK2*), via das pentoses fosfato (*cG6PDH* e 2, *cR5PI2* e 4) e complexo do piruvato desidrogenase (*cPDHC*, *cPDHE1-B3*, *cPDHE1-A3*, *cDDH2*), plastidiais mostraram aumentos significativos nos níveis de transcritos em frutos maduros (Tabela 10). Em plastídeos de frutos não fotossintetizantes, a glicólise, complexo do piruvato desidrogenase e via das pentoses fosfato são importantes para fornecer esqueleto de carbono e poder redutor (NADPH) necessários para a demanda energética e biossintética de ácidos graxos e aminoácidos aromáticos (RENATO *et al.*, 2014; ZEEMAN, 2015).

Surpreendentemente, neste estudo, foi também verificado em frutos maduros, a expressão aumentada de genes da subunidade β -ATP sintase, apresentando peptídeo trânsito para os plastídeos (Tabela 10). De maneira geral, a presença e a expressão aumentada da ATP sintase plastidial em frutos maduros de aceroleira, associada a expressão aumentada de transcritos codificando para as vias plastidiais anteriormente destacadas indicaram a ocorrência, bem como um provável aumento gradual da cromorespiração durante o amadurecimento para suprir ATP via fosforilação oxidativa (complexo ATP sintase) nesta organela. Além disso, a expressão aumentada de *cPK2* em frutos maduros (Tabela 10), sugeriu o aumento na produção de ATP via fosfoenolpiruvato (PEP). Enquanto, a maior abundância de transcritos *cG6PDH* para a fase oxidativa e *cR5PI4* não oxidativa da via das pentoses fosfato refletiu a necessidade de NADPH nesta organela (Tabela 10). Enquanto os esqueletos de carbono são fornecidos via glicólise e complexo do piruvato desidrogenase (Acetil-CoA) plastidiais.

De maneira geral, a expressão aumentada desse conjunto de transcritos para várias vias apontaram para uma regulação coordenada dos cromoplastos, afim de atingir uma possível autonomia energética e de precursores biossintéticos, diante da sua alta demanda. Vale ressaltar que estudos posteriores relacionando a expressão de genes/proteínas com os reagentes/produtos da cromorespiração, bem como o uso de inibidores e/ou o silenciamento do gene da β -ATP sintase plastidial serão essenciais para definir a significância desse processo para a amadurecimento da acerola.

Similar a esses resultados, a análise proteômica de cromoplastos de tomate identificou a abundância de subunidades proteicas da ATP sintase, bem como da NADH desidrogenase e do complexo citocromo b_6/f (BARSAN *et al.*, 2010). A autonomia de cromoplasto para a produção de ATP foi evidenciada após a observação de que cromoplastos isolados de tomate eram capazes sintetizar lipídeos, mesmo sem o suprimento de ATP e de intermediários glicolíticos (FLÜGGE *et al.*, 2011; ANGAMAN *et al.*, 2012). Estudos posteriores confirmaram a síntese *de novo* de ATP, através de um processo chamado de cromorespiração, envolvendo os complexos NADH desidrogenase e complexo citocromo b_6/f para o transporte de elétrons, e a ATP sintase para a síntese de ATP (PATERAKI *et al.*, 2013; RENATO *et al.*, 2014).

De acordo com Renato *et al.* (2014), a contribuição dos cromoplastos para a respiração total do tomate parece aumentar em estádios finais do amadurecimento. Além disso, os autores constataram que a ativação da cromorespiração foi acompanhada da redução do número de mitocôndrias e do aumento da densidade da AOX e de outras proteínas

desacopladoras. Estas observações previamente relatadas no tomate corroboram com a redução nos níveis de transcritos da succinato desidrogenase (SDH), isocitrato desidrogenase (IDH1 e 2), do ciclo do ácido cítrico, subunidades do complexo I, II e IV da CTE e ATP sintases mitocondrial ao longo do amadurecimento da acerola (Tabela 10). Esse declínio sugeriu uma provável redução da capacidade das mitocôndrias para produzir ATP. Outros estudos têm ressaltado que os níveis de muitos intermediários e a expressão de enzimas do ciclo do ácido cítrico (CARRARI *et al.*, 2006; BIAIS *et al.*, 2014), bem como da ATP sintase e do citocromo c oxidase (HOLTZAPFFEL *et al.*, 2002) diminuíram em função do aumento das quantidades de AOX e UCP durante o amadurecimento do tomate (HOLTZAPFFEL *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Notavelmente, verificou-se também a regulação positiva de outros membros gênicos codificando para isoformas citosólicas da via das pentoses fosfato (*cyG6PDH1* e 2) em frutos maduros, sugerindo também o aumento da demanda citosólica por NADPH (Tabela 10), como relatado previamente para o tomate na fase de expansão dos frutos (BIAIS *et al.*, 2014). De maneira similar, a maior abundância de transcritos *cyPGM1*, *cyFBA3*, *cyPK1* e 2 para a glicólise citosólica, e *mPDHE1-B1* para o complexo do piruvato desidrogenase mitocondrial (Tabela 10), sugeriram a produção de triose fosfato, piruvato e acetil, que diretamente ou ao entrar no ciclo do ácido cítrico, devem priorizar a canalização de intermediários metabólicos para atender a grande demanda das vias anabólicas durante o amadurecimento.

Este argumento, é fortemente suportado pela regulação positiva de quatro transcritos que codificam cadeias alfa e beta da ATP-citrato liase (ACLY) durante o amadurecimento (Tabela 10). A ACLY é uma enzima comprometida com a conversão do citrato em oxaloacetato (OAA) e acetil-CoA no citosol. A expressão aumentada dos genes ACLY para a produção de acetil-CoA tem sido associada à síntese de flavonoides e isoprenoides e malato durante o amadurecimento de frutos (SWEETMAN *et al.*, 2009; ETIENNE *et al.*, 2013). Adicionalmente, o leve declínio nos níveis de expressão de transcritos codificando para *IDH1* e 2 em frutos maduros de aceroleira, fortalece o argumento do desvio de citrato para o citosol. Nesta mesma linha de raciocínio, Hu *et al.* (2015) associaram o declínio do conteúdo de citrato em função do aumento na expressão de genes ACLY de laranja. Além disso, o presente resultado indicou que os genes ACLY regulam positivamente para o acúmulo de malato em acerola madura, através da redução do OAA mediada pela enzima malato desidrogenase citosólica. Hanamura *et al.* (2008) verificaram em cinco genótipos de aceroleira que diferentemente do ascorbato, o malato é acumulado durante o amadurecimento do fruto.

Outra importante evidência é fornecida pelo forte aumento na expressão de *AOX1a* e *NUOB2* durante o amadurecimento da acerola (Tabela 10), sugerindo assim, a predominância de duas vias alternativas dissipadoras do fluxo de elétrons (fosforilação não oxidativa) para o complexo do citocromo c oxidase (fosforilação oxidativa). Em mamão, o aumento gradual da atividade da via não fosforilativa foi acompanhada da diminuição de atividade da via fosforilativa (OLIVEIRA *et al.*, 2015). Em tomate, constatou-se que a NUOB transfere elétrons de NAD (P) H para a ubiquinona, contornando o Complexo I (GOODENOUGH *et al.*, 1985), e evitando assim, o bombeamento parcial de prótons. Posteriormente, no tomate, o aumento da expressão de *AOX1a* coincidiu com a maior atividade respiratória total e da via resistente ao cianeto em frutos no estágio de coloração rosa (XU *et al.*, 2012). Outros estudos têm reportado que transcritos de *AOX1* em manga (CRUZ-HERNÁNDEZ; GÓMEZ-LIM, 1995), mamão (OLIVEIRA *et al.*, 2015), e proteínas AOX1 em tomate (HOLTZAPFFEL *et al.*, 2002) aumentaram fortemente em função do amadurecimento destes frutos.

O aumento de AOX atende a pelo menos dois propósitos: a respiração não fosforilativa e a redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SWEETMAN *et al.*, 2009; DEL-SAZ *et al.*, 2018). A expressão de *AOX1a* em acerola, aumentou gradualmente especificamente do estágio intermediário para o maduro (Tabela 10), à medida que a produção de etileno e CO₂ declinaram, a evidência anteriormente destacada, de que o pico climaterico tenha ocorrido em frutos entre os estádios intermediários e maduro. Além disso, sugeriu que *AOX1a* é um gene central na regulação simultânea dos metabolismos de etileno, respiratório e oxidativo. Estudos já destacados têm relacionado a ativação da AOX com a maior produção de HCN, produto da biossíntese de etileno, piruvato (via glicólise) e malato durante o pico climaterico (ZHANG *et al.*, 2003; SWEETMAN *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2015), revelando que o pico de etileno e aumento da glicólise, potencialmente, modulam positivamente a via da oxidase alternativa, com o propósito também de aliviar a fermentação aeróbica e a super-redução dos respirassomos.

Segundo Oliveira *et al.* (2015), o processo de amadurecimento, por si só, é um potencial ativador da atividade de AOX. Além disso, através das vias alternativas, o desacoplamento mitocondrial pode sustentar um fluxo contínuo de carbono pelo metabolismo respiratório, mesmo sob grande demanda energética, conferindo assim, flexibilidade de acordo com a necessidade metabólica (OLIVEIRA *et al.*, 2015; DEL-SAZ *et al.*, 2018). Curiosamente, tomate com níveis reduzidos de *LeAOX1a* refletiram em menor produção de carotenoides, etileno, respiração (ausência de pico climaterico) e na regulação negativa de

vários genes de maturação, o que resultou no retardo do amadurecimento e destacou a AOX como um importante alvo regulatório desse processo (XU *et al.*, 2012).

7.3 Genes regulados positivamente envolvidos no transporte e hidrólise da sacarose, e degradação do amido sugerem o acúmulo de açúcar em frutos maduros

O sabor doce é um dos atributos mais desejáveis e determinantes da qualidade dos frutos. Porém, sua intensidade depende do acúmulo de açúcares durante o amadurecimento (VIMOLMANKANG *et al.*, 2016). A glicose e frutose foram os principais açúcares acumulados nos frutos de cinco diferentes genótipos de aceroleira (HANAMURA *et al.*, 2008). De maneira geral, o acúmulo de açúcar em frutos maduros é o resultado da degradação do amido e/ou do transporte de sacarose dos tecidos fotossintéticos (TUCKER, 1993). No presente estudo, transcritos de um transportador de sacarose (SUC2) e de quatro invertases de parede celular/apoplasto (cwINV1-4) apresentaram regulação positiva em frutos verdes (Tabela 11). Tais resultados indicaram que o dreno de sacarose para o apoplasto de frutos verdes é intenso e acompanhado do transporte via SUC2 ou da hidrólise a hexoses. Estudos anteriores detectaram maior expressão de transcritos *cwINV* em frutos imaturos de tomateiro e pessegueiro (BALIBREA *et al.*, 2006; VIMOLMANKANG *et al.*, 2016), porém transcritos codificando transportadores SUC específicos exibiram expressão aumentada tanto em frutos verdes quanto em maduros de macieira (WEI *et al.*, 2014). Segundo Ruan (2014), a maior atividade de *cwINV* pode facilitar o descarregamento de sacarose do floema através da redução de sua concentração no apoplasto, contribuindo assim, para o desenvolvimento do fruto. Simultaneamente, a maior abundância dos transcritos da amido sintase (SS4 e WAXY) em frutos verdes (Tabela 11) foi consistente com a atividade de hidrólise da sacarose a hexoses por *cwINV* e sugeriu que o processo supracitado provavelmente culminou na síntese e no acúmulo do amido no fruto verde.

Posteriormente, o aumento da expressão de transcritos para duas beta-amilases (AmyB1 e 2) e uma amido fosforilase (AGP), especificamente do estágio verde para o intermediário, bem como o aumento gradual daqueles codificando para alfa-amilase (*amyA*) (Tabela 11) até frutos maduros, sugeriram que a degradação do amido contribui para o acúmulo de glicose na acerola madura. De maneira bem pronunciada, o acúmulo de amido na banana verde é considerado a principal fonte de hexoses para conversão e acúmulo de sacarose nos frutos maduros (TUCKER, 1993; CORDENUNSI; LAJOLO, 1995). Adicionalmente, o presente resultado sugeriu que a hidrólise da sacarose armazenada no vacúolo e citosólica, resultante do dreno das folhas para frutos ao longo do desenvolvimento,

parece ter sido crucial para o acúmulo de glicose e frutose no estágio final. Essa observação é suportada pela expressão aumentada dos transcritos da invertase vacuolar (vINV) de frutos verdes até o estágio intermediário, bem como devido ao aumento gradual daqueles da sINV ao longo do amadurecimento (Tabela 11). Frutos de tomateiro apresentando alta expressão de vINV exibiram acúmulo de hexoses, porém a repressão desse gene resultou no acúmulo de sacarose e na redução de cerca de 30% do tamanho dos frutos (KLANN *et al.*, 1993; KLANN *et al.*, 1996).

Os transportadores de sacarose e hexoses são também determinantes para a dinâmica de tais metabólitos nos diferentes órgãos da planta e compartimentos da célula. O transportador SWEET é uma família diversificada com membros específicos para o transporte bidirecional de sacarose, glicose e/ou frutose através da membrana plasmática ou do tonoplasto (CHARDON *et al.*, 2013; KLEMENS *et al.*, 2014). Enquanto o transportador de monossacarídeos (MST) é exclusivo para hexoses (SLEWINSKI, 2011; WEI *et al.*, 2014). Neste trabalho, transcritos codificando para um transportador MST e SWEET1 e 2 aumentaram sua expressão durante o amadurecimento (Tabela 11) em concordância com a maior abundância de *AmyB*, *AmyA* e *sINV*, indicando assim, um potencial fluxo de glicose e frutose, através desses membros, para seu acúmulo no vacúolo.

Finalmente, a regulação positiva de transcritos da sacarose fosfato sintase (SPS) (Tabela 11) evidenciou um provável incremento nos níveis de sacarose em frutos maduros. Na banana, a expressão e atividade da SPS se relacionaram fortemente com o acúmulo de sacarose durante o amadurecimento (NASCIMENTO *et al.*, 1997).

7.4 A perda de firmeza decorrente do amadurecimento da acerola destaca uma complexa rede de genes regulatórios envolvidos na degradação e biossíntese da parede celular

O amaciamento do fruto é um processo irreversível, o qual culmina na desmontagem da parede celular durante o amadurecimento, devido principalmente à degradação da pectina e da hemicelulose (PANIAGUA *et al.*, 2014). Neste estudo, a parede celular de frutos verdes de aceroleira mudou de 17 N para um estado muito frágil (1,6 N) no estágio maduro (Figura 3A). Perdas ainda mais expressivas na firmeza de frutos verdes (102 N) para maduros (1 N) foram registradas no mamão (OLIVEIRA *et al.*, 2015), porém bem menos expressiva em maçã, que alterou a firmeza de 16 N nos frutos verdes para 7 N naqueles maduros (YANG *et al.*, 2018).

Recentemente, a determinação da estrutura da pectina da acerola revelou ser constituída por um polímero de homogalacturonana linear altamente metoxilado e de

ramnogalacturonana do tipo I apresentando ramificações do tipo arabinana e arabinogalactanas (KLOSTERHOFF *et al.*, 2018). A investigação do perfil transcricional revelou um conjunto de pelo menos 54 transcritos com expressão aumentada em frutos maduros de aceroleira e relacionados a remodelagem da parede celular.

Em acerola, 86% das unidades do ácido D-galacturônico (homogalacturonana) são metiladas (KLOSTERHOFF *et al.*, 2018). Quatro transcritos *PME1*, *PME15*, *PME3* e *PME1-like* codificando para isoformas da pectinesterase apresentaram regulação positiva (Tabela 12), revelando a necessidade de desmetilação desse polímero para subsequente degradação. Em tomate, observou-se *in vitro*, que a ação prévia da PME sobre a pectina é um importante pré-requisito para a atividade da PG e PL (KOCH; NEVINS, 1989; PRAASNNA *et al.*, 2007). Neste estudo, um transcrito codificando para um inibidor da PME (*PMEI1*; TR_9598_c0_g1), também aumentou gradualmente sua abundância até frutos maduros (Tabela 12). Tal observação sugeriu que a atividade da PME é regulada pelo menos no nível transcricional e pós-traducional (PMEI), como tentativa de controlar a taxa de degradação da pectina. Neste contexto, De Matteo *et al.* (2005) demonstraram que PMEI forma um complexo com PME, possivelmente bloqueando sua atividade.

A identificação de oito transcritos regulados positivamente codificando para expansinas (EXP), dentre eles (*EXP-B2* e *A1*; TR_11976_c0_g1 e TR_16279_c1_g2; $\log_2FC > 6,8$) (Tabela 12), destacou o papel chave desses genes *EXPs* para a regulação da perda de firmeza da acerola. Além disso, o forte aumento na expressão de outros cinco transcritos (*EXP-A4-like*, *EXP-A4*, *EXP*, *EXP-A6* e *EXP-B3*) (Tabela 12) até o estágio intermediário, indicou que a ação dessas isoformas, em adição a *EXP-B2* e *A1*, é também um importante pré-requisito para a posterior atividade das hidrolases (PG, PL, XTH/XET1, BGL, EGL, entre outras). Embora desprovida de função catalítica, as expansinas promovem o afrouxamento da parede celular, possivelmente rompendo as ligações de hidrogênio entre a celulose e hemicelulose, expondo assim, a pectina para degradação enzimática (WANG *et al.*, 2018). A supressão de *LeEXPI* ou *LePG* de tomate não provocou retardo significativo na perda de firmeza. Entretanto, a supressão da expressão de ambos, refletiu no aumento da firmeza dos frutos, tornando-os menos suscetível a deterioração durante o armazenamento a longo prazo (POWELL *et al.*, 2003). Recentemente, Minoia *et al.* (2016) demonstraram que mutantes de tomateiro sem função da proteína *SlEXP1* prolongaram a firmeza e o tempo de amadurecimento.

Membros específicos da PG1, 2 e 3, PL5, 8 e 18 e GAULT4, 9 e 9b que codificam enzimas chave do processo de degradação de homogalacturonana, bem como *ARATI* e 2 e

B3GALT envolvidos na degradação do arabinana/arabinogalactana foram identificados (Tabela 12). Em vista do maior \log_2FC verificado, foi possível destacar os transcritos: *PGI* (TR_12269_c0_g1; $\log_2FC = 8,6$), *PL8* (TR_16340_c1_g3; $\log_2FC = 3,8$), *PME1* e 15 (TR_18103_c1_g5 e TR_16514_c0_g3; $\log_2FC = 5,9$ e $4,3$) como os mais expressivos no processo de mediação da degradação da pectina ao longo do amadurecimento. Particularmente, o gene *PGI* parece ser também crucial para a iniciação da perda de firmeza. Mesmo assim, esses resultados revelaram a existência de uma regulação orquestrada entre vários membros da mesma e de diferentes famílias multigênicas para atingir substanciais perdas na firmeza do fruto (Tabela 12).

Estudos prévios com tomate têm evidenciado a existência de um sinergismo entre as atividades dessas enzimas (PRAASNNA *et al.*, 2007). Embora, a poligalacturonase (PG), seja uma hidrolase central para a solubilização da pectina, a supressão de um gene *SIPG* em tomate para 1% da sua atividade total, não refletiu em significativa redução na perda de firmeza (BRUMMELL; LABAVITCH, 1997), indicando ser insuficiente para controlar o processo. Posteriormente, o silenciamento de um gene da *SIPL* do tomate (ULUISIK *et al.*, 2016), e dos genes *FaPL* e *FaPG* do morango (JIMÉNEZ-BERMÚDEZ *et al.*, 2002; QUESADA *et al.*, 2009) revelaram ser cruciais para o controle da perda de firmeza nesses frutos.

A expressão aumentada de vários transcritos codificando para xiloglicanos endotransglicosilase hidrolase (XTH/XET1, 2 e 3), xilosidase (XYD1 e 5), endo-beta-1,4-xilanase (XYN-A) e glicano-endo-beta-1,3-glicosidase (GEG, A e A6) representaram um forte indicativo da degradação de polímeros de xiloglicanos (hemicelulose) durante o amadurecimento da acerola (Tabela 12). Em maçã, o aumento de expressão temporal de genes XTH específicos nos estádios inicial (não ativado pelo etileno) e tórdio do amadurecimento (ativado pelo etileno), bem como a superexpressão de *MdXTH2* e *MdXTH10* no tomate, mostraram ser essenciais para a ativação de outros genes envolvidos na degradação da parede celular (MUÑOZ-BERTOMEU *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2017). Atkinson *et al.* (2009) confirmaram que os transcritos XTH mais abundantes em frutos maduros de macieira e kiwizeiro codificam produtos com atividade de endotransglicosilase de xiloglucanos, sugerindo que a desmontagem do xiloglucano através dessas enzimas promove o afrouxamento da parede celular para posterior modificação por outras enzimas de degradação.

Além disso, o presente resultado sugeriu a ocorrência da degradação da celulose, em vista da expressão aumentada de seis transcritos codificando para a beta-glicosidases (BGL11, 40 e 41) e endoglicanases (EGL, B14 e 6) (Tabela 12). As atividades da celulase e PG

aumentaram dramaticamente durante o amadurecimento e manga, relacionando-se com a redução na perda de firmeza desse fruto (ROE; BRUEMMER, 1981; ABU-SARRA; ABU-GOUKH, 1992).

Curiosamente, oito transcritos *CESY*, dentre eles (*CESY-G3*; *TR_18095_c0_g1*; $\log_2FC = 10,2$) envolvidos na biossíntese de celulose, dois *XXT2* e 5 e *GLSY* na biossíntese de hemicelulose e *PMEI*, um inibidor da desmetilação da pectina ($\log_2FC = 8,9$) também aumentaram gradualmente durante o amadurecimento (Tabela 12). Em vista destas observações, especula-se que a grande fragilidade dos frutos maduros, potencialmente, induziu a inibição da degradação da pectina por meio de *PMEI*. Além disso, a biossíntese de hemicelulose e celulose deve ter sido regulada positivamente na tentativa de manter certa integridade da parede celular e evitar o ataque de patógenos. Segundo Assis *et al.* (2008), o conteúdo de pectina da acerola declinou durante o amadurecimento, mesmo assim, apresentou incrementos significativos nos estádios finais. Embora, a acerola aumente substancialmente de tamanho durante a maturação (ALVES *et al.*, 1995), a divisão celular encontra-se muito ativa até 8 DAA, então cessa à medida que a fase de expansão se estende até frutos maduros (CARRINGTON; KING, 2002).

7.5 Modelo proposto destacando as principais alterações moleculares e metabólicas durante o amadurecimento da acerola

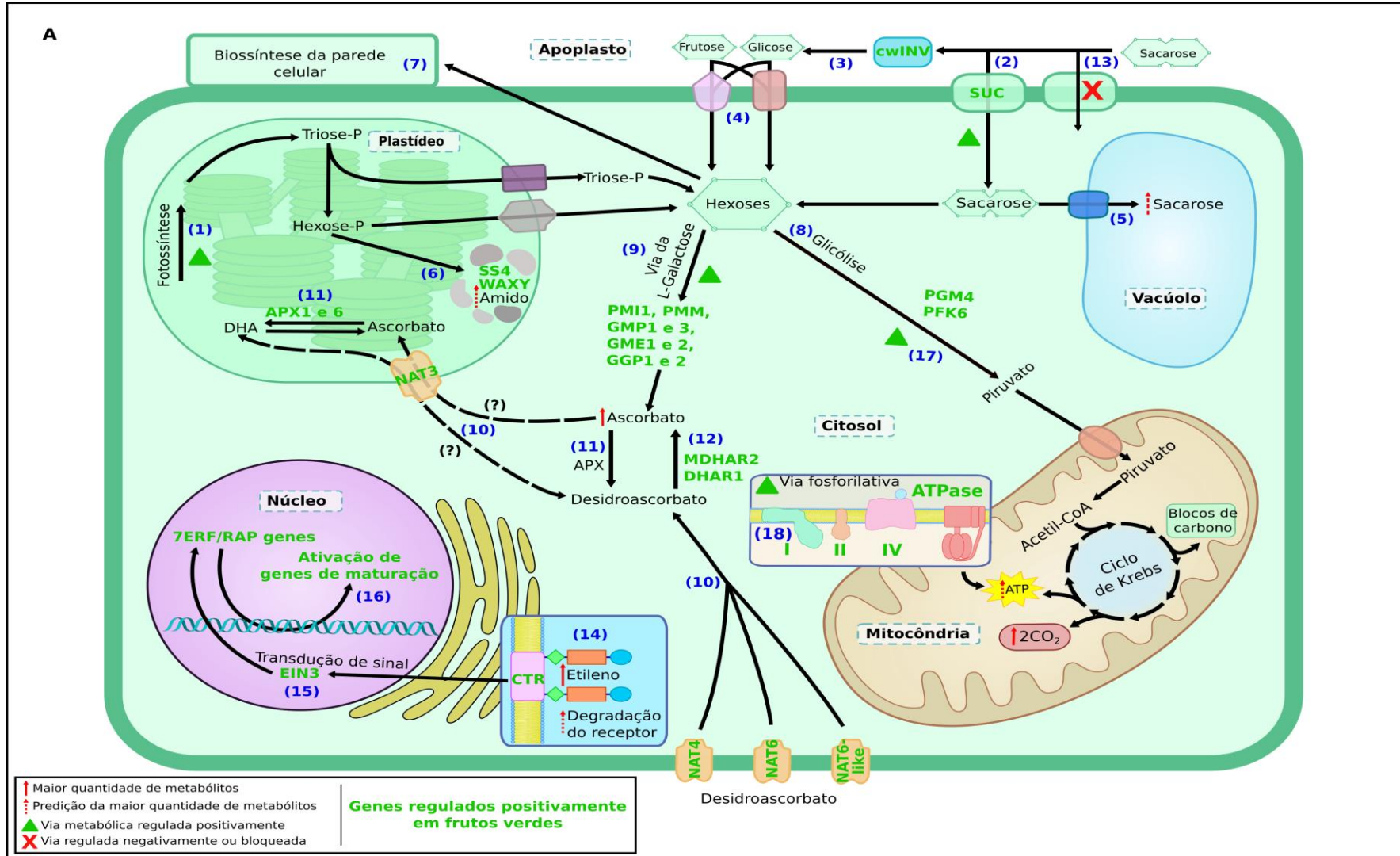
Com base nos perfis de transcritos e metabólitos apresentados em frutos nos estádios verde, intermediário e maduro propôs-se um modelo destacando as principais mudanças ocorridas no metabolismo do ascorbato, etileno, respiração, açúcares e firmeza (Figura 14A-B).

Perfil molecular e metabólico de frutos verdes (Figura 14A). Neste estágio, a fotossíntese está ativada (1). Mesmo assim, o transporte de sacarose das folhas também está fortemente ativo. No apoplasto, a sacarose pode ser translocada para o citosol via transportadores de sacarose (*SUC*) (2) ou ser convertida por invertases da parede celular (*cwINVs*) em hexoses (3), para em seguida, ser translocada através da membrana plasmática para o citosol (4). A sacarose sintetizada no fruto e translocada contribuem para seu acúmulo no vacúolo (5), bem como para a síntese e acúmulo de amido (6) nos plastídeos pela ação das enzimas amido sintase (*SS4*) e amido sintase ligada a grânulos (*WAXY*). Simultaneamente, a sacarose também fornece substrato para a biossíntese da parede celular (7) e glicólise (8).

Vários genes, *PMII*, *PMM*, *GMP1* e 3, *GME1* e 2, *GGP1* e 2, regulados positivamente para a via da L-galactose medeiam o desvio da hexose citosólica da via glicolítica para a

biossíntese e acúmulo do ascorbato nos frutos neste estágio (9). Além disso, provável translocação de desidroascorbato de órgãos tais como folhas e flores para frutos verdes via transportadores NAT3, 4, 6 e 6-like (10), bem como aqueles gerados pela ação de APX1 e 6 plastidiais (11) são eficientemente regenerados a sua forma reduzida, através da ação cooperativa de MDHAR2 e DHAR1 (12), contribuindo também para o acúmulo de AAs em frutos neste estágio.

Figura 14 – Perfil molecular e metabólico da acerola no estágio verde (A).



Fonte: elaborada pelo autor

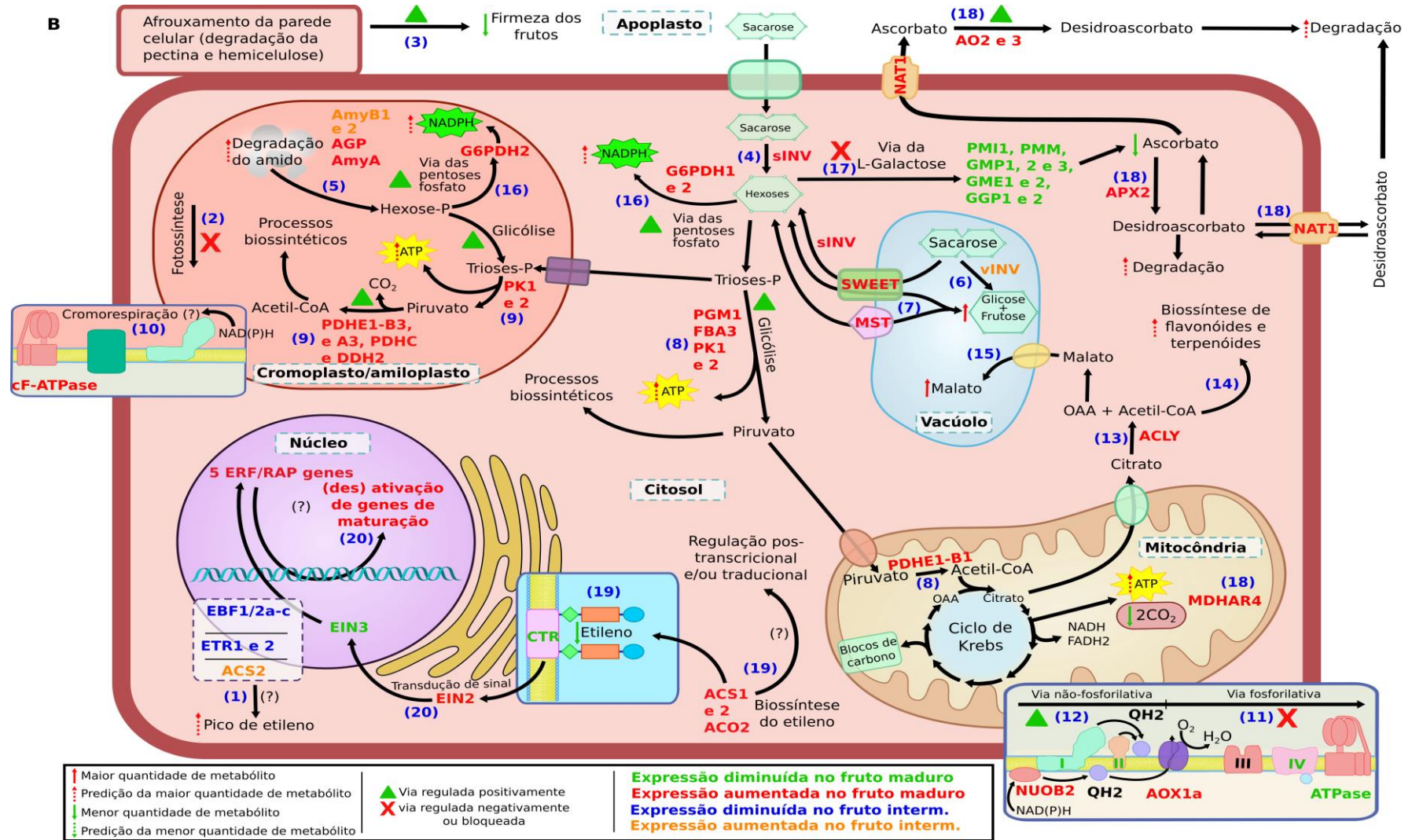
Em contrapartida, a retirada de frutos verdes da planta mãe inibiu a fotossíntese e bloqueou o dreno de sacarose (13). Como resultado, os frutos desencadearam aumento na produção de etileno, que potencialmente promoveu a degradação de receptores de etileno *ETR1* e *2* (14), conseqüentemente, esse evento parece ter ativado uma cascata de transdução de sinal, em vista da expressão aumentada de genes *CTR1*, *2* e *EIN3*. A regulação positiva de transcritos do fator de transcrição *EIN3* culminou na regulação positiva de vários fatores de resposta ao etileno *RAP2*, *ERF105*, *ERF4*, *ERF107*, *RAP2/12-like*, e *ERF1B-like*, bem como na indução de *ERF039*, *ERF109*, *ERF1-like* e *ERF-1B* (15). Essas alterações na percepção e sinalização do etileno, aparentemente refletiu na ativação de vários de genes de amadurecimento, sendo interpretado como o início do amadurecimento dos frutos (16).

Simultaneamente, a regulação positiva dos transcritos que codificam para a fosfoglicerato mutase (cyPGM4) e fosfofrutoquinase-6-dependente de ATP (cyPFK6) (17), subunidades dos complexos mitocondriais I, II, IV (*mNDH1*, *mNDH*, *mNDH6*, *mNDH4*, *mNDH2*, *mNDH5*, *mNDH-FQR1*, *mNDH-FQR1-3*, *mSDH1*, *mCOX3*, *mCOX6a*, *mCOX1*) e ATP sintase (*mF-ATPaseB*, *mF-ATPaseG2*, *mF-ATPaseF1*, *mF-ATPase4*) sugeriram um maior fluxo de hexoses canalizadas para a respiração dos frutos em função do aumento da produção de CO₂ registrado e da demanda por ATP (18) na tentativa de substituir a inibição da fotossíntese e o bloqueio do suprimento de sacarose decorrentes da colheita dos frutos.

Perfil molecular e metabólico da acerola nos estádios intermediário e maduro (Figura 14B). Notavelmente, frutos no estágio intermediário apresentaram regulação positiva de transcritos *ACS2* (aumentaram substancialmente de frutos nos estádios verde ao intermediário), enquanto aqueles dos receptores de etileno (*ETR1* e *ETR2*) e de três proteínas F-box ligadas a *EIN3* (*EBF1/2a-c*) foram regulados negativamente, indicando maior sensibilidade ao etileno (1), e que seu pico, na planta, provavelmente ocorreu entre os estádios intermediário e maduro.

Com o programa de genes de amadurecimento ativado, a fotossíntese foi desligada (2) e a firmeza drasticamente reduzida (3; aumento na abundância de 54 transcritos relacionados) à medida que o amadurecimento avançava. A respeito da demanda por energia, os frutos mobilizaram duas fontes principais: (I) dreno de sacarose das folhas para o citosol do fruto, possibilitando sua rápida conversão em hexoses através da invertase solúvel (sINV), provavelmente, para evitar seu acúmulo no vacúolo (4); (II) mobilização das reservas de amido pela ação de beta-amilases (*amyB1* e *B2*), alfa-glicano fosforilase (*AGP*) mais expressos em frutos intermediários, e alfa-amilase (*amyA*; 5), mais expresso em frutos maduros.

Figura 14 – Perfil molecular e metabólico da acerola nos estádios intermediário e maduro (B).



Fonte: elaborada pelo autor

Simultaneamente, a sacarose acumulada no vacúolo foi convertida em frutose e glicose pela invertase vacuolar (vINV; 6). Enquanto, a regulação positiva de transportadores de sacarose e hexoses (MST, SWEET1 e 2), parecem desempenhar um papel chave para o equilíbrio entre o acúmulo de frutose e glicose no vacúolo e o seu consumo no citosol e plastídios (7).

Notavelmente, a regulação positiva de transcritos de outras isoformas citosólicas da fosfoglicerato mutase (cyPGM1), frutose-bisfosfato aldolase (cyFBA3), piruvato quinase (cyPK1 e 2), complexo piruvato desidrogenase (mPDHE1-B1; 8); bem como as isoformas glicolíticas plastidiais (cPFK e cPK2) e do complexo piruvato desidrogenase (cPDHC, cPDHE1-B3, cPDHE1-A3, cDDH2) (9) destacaram o fluxo intensivo de glicose através dessas vias para geração de esqueletos de carbono e energia. Surpreendentemente, a regulação positiva de transcritos de uma subunidade da ATP-sintase do cromoplasto revelou a potencial produção de ATP através do processo da cromorespiração (10), provavelmente intensificada durante o amadurecimento. Simultaneamente, observou-se a regulação negativa dos transcritos codificando enzimas dos complexos I, II e IV (cadeia respiratória) e fosforilação oxidativa (ATP sintase), que foi consistente com a redução na produção de CO₂ e sugeriu também redução na geração de ATP via mitocôndria (11). Interessantemente, a regulação positiva de transcritos da NAD(P)H ubiquinona oxidoredutase externa (mNUOB2) e da oxidase alternativa (mAOX1a) (12) sugeriu a predominância de vias dissipadoras de elétrons (não fosforilativa), após o estágio intermediário, como mecanismo de flexibilizar a respiração às demandas por bloco de carbono e energéticas. Simultaneamente, o transporte e conversão do citrato em oxaloacetato (OAA) e acetil-CoA, no citosol, através da ATP-citrato liase (ACLY) corroborou com esta observação presumindo-se atender a dois propósitos (13): fornecimento de acetil-CoA para a biossíntese de flavonoides e terpenoides (14); redução de OAA a malato para o acúmulo do último no vacúolo (15). O aumento na abundância de transcritos que codificam a glicose-6-fosfato-1-desidrogenase (cG6PDH2) plastidial, bem como cyG6PDH1 e 2 citosólica da via das pentoses fosfato sugeriu aumento no fornecimento do poder redutor (NADPH) para atender aos requerimentos biossintéticos (16).

A canalização de hexoses para atingir as demandas supracitadas do amadurecimento evidenciou a redução da biossíntese de AAs devido à regulação negativa de vários transcritos da via da L-galactose (17). A leve regulação positiva apenas nos transcritos *MDHAR4* e *NAT1*, mas notavelmente *APX2* e *AO2* e 3, indicaram que durante o amadurecimento os processos de reciclagem e translocação do ascorbato foram menos eficientes, e acompanhados

de um processo de degradação mais ativo, que culminou em substancial depleção das quantidades AAs (18).

Por fim, nos frutos maduros, as baixas quantidades de etileno foram inconsistentes com os níveis aumentados de transcritos *ACS1*, *2* e *ACO2* (19), sugerindo a ocorrência de regulação pós-transcricional e/ou transducional. Curiosamente, *EIN2* e dois *ERF113* e *ERF-AP2-3* foram mais abundantes em frutos maduros, enquanto *ERF-ABR1*, *ERF/LEP* e *ERF/ESR2* foram induzidos neste estágio, destacando o complexo controle do etileno para provável des (ativação) de genes de amadurecimento e/ou regulação negativa da produção de etileno (20).

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Em conclusão, o presente estudo apresenta o primeiro esforço para o sequenciamento do transcriptoma de aceroleira, fornecendo informações sobre sequências e a anotação de milhares de transcritos. Além disso, estabeleceu-se uma visão geral do perfil transcricional do programa genético, evidenciando alguns redirecionamentos ocorridos nas vias metabólicas, necessários para modular o amadurecimento da acerola. Em particular, a investigação do metabolismo do ascorbato, etileno, respiração, açúcares e firmeza dos frutos destacou redes de genes regulatórios, gerando assim, uma maior compreensão da regulação gênica em acerola.

A respeito do metabolismo de ascorbato destacou-se o papel predominante das vias de biossíntese (L-galactose), reciclagem e translocação, após o conhecimento do perfil transcricional de um conjunto de genes candidatos ao controle do seu acúmulo em frutos verdes (Figura 14A). Espera-se que a superexpressão desses genes seja promissora para o acúmulo de AAs em outros frutos e legumes que exibem baixos níveis, bem como para conferir às plantas cultiváveis maior tolerância aos estresses e que estudos futuros sejam conduzidos neste sentido.

Além disso, os resultados fornecem um compreensivo entendimento sobre o complexo papel do etileno, sugerindo-se os transcritos *ACS2* e *ETR1* e *2* como importantes reguladores do processo de transdução de sinal e ativação de *ERFs* (Figura 14A-B). Vários genes *ERFs* foram temporalmente expressos, entretanto, o papel funcional de cada membro para a (des) ativação de genes de amadurecimento requer estudos posteriores. A respeito da respiração, o perfil transcricional evidenciou predominância da via fosforilativa de frutos verdes até intermediários. Além disso, indicou também a predominância de vias não fosforilativas (NUOB e AOX) e provavelmente da cromorespiração, após o estágio intermediário (Figura 14A-B), destacando esses achados como relevantes e promissores para regulação da taxa respiratória. A respeito do metabolismo de firmeza, sugere-se pelo menos os membros das famílias *EXP-A1* e *B2*, *PME1* e *15*, *PG1*, *XTH/XET1* e *2*, *XYD1* e *5*, *BGL11* e *EGL-B14* como os alvos mais promissores de supressão para retardo da perda de firmeza da acerola.

Por fim, o presente estudo é um precedente e fornece uma importante base, que abre caminhos para condução de muitas outras pesquisas dedicadas a compreensão destes e outros metabolismos de interesse, visando a melhoria da qualidade da acerola.

REFERÊNCIAS

- ABOBUCKER, S. I.; SUZA, W. P.; LORENCE, A. Characterization of two Arabidopsis L-Gulonolactone oxidases, AtGuLO3 and AtGuLO5, involved in ascorbate biosynthesis. **Reactive Oxygen Species**, v. 4, p. 389–417, 2017.
- ABU-SARRA, A. F.; ABU-GOUKH, A. A. Changes in pectinesterase, polygalacturonase and cellulase activity during mango fruit ripening. **Journal of Horticultural Science**, v. 67, p. 561–568, 1992.
- ADRIANO, E.; LEONEL, S.; EVANGELISTA, R. M. Qualidade de fruto da aceroleira cv. olivier em dois estádios de maturação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 541–545, 2011.
- AGIUS, F.; GONZÁLEZ-LAMOTHE, R.; CABALLERO, J. L.; MUNÓZ-BLANCO, J.; BOTELLA, M. A.; VALPUESTA, V. Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 177–181, 2003.
- ALÓS E, RODRIGO MG, ZACARÍAS L. Transcriptomic analysis of genes involved in the biosynthesis, recycling and degradation of L-ascorbic acid in pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). **Plant Science**, v. 207, p. 2–11, 2013.
- ALOS, A. E.; MARTINEZ-FUENTES, C.; REIG, C.; MESEJO, M. J.; RODRIGO, M.; AGUSTÍ, L. ZACARÍAS. Ethylene biosynthesis and perception during ripening of loquat fruit (*Eriobotrya japonica* Lindl.). **Journal of Plant Physiology**, v. 210, p. 64–71, 2017.
- ALÓS, E.; RODRIGO, M. G.; ZACARÍAS, L. Differential transcriptional regulation of L-ascorbic acid content in peel and pulp of citrus fruits during development and maturation. **Planta**, v. 239, p. 1113–1128, 2014.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANGE, J.; ZHANGE, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389–3402, 1997.
- ALVES, R. E.; CHITARRA, A. B.; CHITARRA, M. I. F. Postharvest physiology of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) fruits: maturation changes, respiration activity and refrigerated storage at ambient and modified atmospheres. **Acta Horticulture**, v. 370, p. 223–229, 1995.
- AMPOPHO, B.; CHAPMAN, N.; SEYMOUR, G. B.; GIOVANNONI, J. J. **Regulatory networks controlling ripening**. In: SEYMOUR, G. B.; POOLE, M.; GIOVANNONI, J. J.; TUCKER, G. A. The molecular biology and biochemistry of fruit ripening. Wiley-Blackwell, p. 189–201, 2013.
- ANDREWS, S. 2010. **FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data**. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc> Acesso: 02/02/2018.

ANGAMAN, D. M.; PETRIZZO, R.; HERNANDEZ-GRAS, F.; ROMERO-SEGURA, C.; PATE RAKI, I.; BUSQUETS, M.; BORONAT, A. Precursor uptake assays and metabolic analyses in isolated tomato fruit chromoplasts. **Plant Methods**, v. 8, 2012.

ASSIS, S. A.; FERNANDES, F. P.; MARTINS, A. B. G.; FARIA-OLIVEIRA, O. M. M. Acerola: importance, culture conditions, production and biochemical aspects. **Fruits**, v. 63, p. 93–101, 2008.

ATKINSON, R. G.; JOHNSTON, S. L.; YAU, Y. K.; SHARMA, N. N.; SCHRÖDER, R. Analysis of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) gene families in kiwifruit and apple. **Postharvest Biology and Technology**, v. 51, p.149–157, 2009.

BADEJO, A. A.; FUJIKAWA, Y.; ESAKA, M. Gene expression of ascorbic acid biosynthesis related enzymes of the Smirnoff-Wheeler pathway in acerola (*Malpighia glabra*). **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 652–660, 2009.

BADEJO, A. A.; WADA, K.; GAO, Y.; MARUTA, T.; SAWA, Y.; SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T. Translocation and the alternative D-galacturonate pathway contribute to increasing the ascorbate level in ripening tomato fruits together with the D-mannose/L-galactose pathway. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 229–239, 2012.

BAIROCH, A.; BOECKMANN, B. The SWISS-PROT protein sequence data bank, recent developments. **Nucleic Acids Research**, v. 21, p. 3093–3106, 1993.

BALIBREA, M. E.; MARTÍNEZ-ANDÚJAR, C.; CUARTERO, J.; BOLARÍN, M. C.; PÉREZ-ALFOCEA, F. The high fruit soluble sugar content in wild *Lycopersicon* species and their hybrids with cultivars depends on sucrose import during ripening rather than on sucrose metabolism. **Functional Plant Biology**, v. 33, p. 279–288, 2006.

BAPAT, V. A.; TRIVEDI, P. K.; GHOSH, A.; SANE, V. A.; GANAPATHI, T. R.; NATH, P. Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 94–107, 2010.

BARBOZA, S. B. S. C.; TAVARES, E. D.; DE MELO, M. B. **Instruções para o cultivo da acerola**. Aracaju: Embrapa-CPATC, Circular Técnica, 1996. 42p.

BARRY, C. S.; LLOP-TOUS, M. I.; GRIERSON, D. The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. **Plant Physiology**, v. 123, p. 979–986, 2000.

BARSAN, C.; SANCHEZ-BEL, P.; ROMBALDI, C.; EGEE, I.; ROSSIGNOL, M.; KUNTZ, M.; ZOUINE, M.; LATCHE, A.; BOUZAYEN, M.; PECH, J.-C. Characteristics of the tomato chromoplast revealed by proteomic analysis. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 2413–2431, 2010.

BIAIS, B.; ALLWOOD, J. W.; DEBORDE, C.; XU, Y.; MAUCOURT, M.; BEAUVOIT, V.; DUNN, W. V.; JACOB, D.; GOODACRE, R.; ROLIN, D. ¹H NMR, GC-EI-TOFMS, and data set correlation for fruit metabolomics: application to spatial metabolite analysis in melon. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 2884–2894, 2009.

BIAIS, B.; BÉNARD, C.; BEAUVOIT, B.; COLOMBIÉ, S.; PRODHOMME, D.; MÉNARD, G.; BERNILLON, S.; GEHL, B.; GAUTIER, H.; BALLIAS, P.; MAZAT, J-P.; SWEETLOVE, L.; GÉNARD, M.; GIBON, Y. Remarkable reproducibility of enzyme activity profiles in tomato fruits grown under contrasting environments provides a roadmap for studies of fruit metabolism. **Plant Physiology**, v. 164, p. 1204–1221, 2014.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, p. 2114–2120, 2014.

BOWER, J.; HOLFORD, P.; LATCHÉ, A.; PECH, J-C. Culture conditions and detachment of the fruit influence the effect of ethylene on the climacteric respiration of melon. **Postharvest Biology and Technology**, v. 26, p. 135–146, 2002.

BRUMMELL, D. A.; LABAVITCH, J. M. Effect of antisense suppression of endopolygalacturonase activity on polyuronide molecular weight in ripening tomato fruit and in fruit homogenates. **Plant Physiology**, v. 115, p. 717–725, 1997.

BULLEY, S. M.; RASSAM, M.; HOSER, D.; OTTO, W.; SCHÜNEMANN, N.; WRIGHT, M.; MACRAE, E.; GLEAVE, A.; LAING, W. Gene expression studies in kiwifruit and gene over-expression in Arabidopsis indicates that GDP-L-galactose guanyltransferase is a major control point of vitamin C biosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 765–778, 2009.

BULLEY, S.; LAING, W. The regulation of ascorbate biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 33, p. 15–22, 2016.

CARPENTIERI-PÍPOLO, V.; NEVES, C. S. V. J.; BRUEL, D. C.; SOUZA, S. G. H.; GARBÚGLIO, D. D. Frutificação e desenvolvimento de frutos de aceroleira no Norte do Paraná. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1871–1876, 2008.

CARRARI, F.; BAXTER, C.; USADEL, B.; URBANCZYK-WOCHNIAK, E.; ZANOR, M. I.; NUNES NESI, A.; NIKIFOROVA, V.; CENTERO, D.; RATZKA, A.; PAULY, M.; SWEETLOVE, L.J.; FERNIE, A. R. Integrated analysis of metabolite and transcript levels reveals the metabolic shifts that underlie tomato fruit development and highlight regulatory aspects of metabolic network behavior. **Plant Physiology**, v. 142, p. 1380–1396, 2006.

CARRINGTON, C. M. S.; KING, R. A. G. Fruit development and ripening in Barbados cherry, *Malpighia emarginata* DC. **Scientia Horticulturae**, v. 92, p. 1–7, 2002.

CASTRO, J. C.; MADDOX, J. D.; COBOS, M.; REQUENA, D.; ZIMIC, M.; BOMBARELY, A.; IMÁN, A. S.; CERDEIRA, L. A.; MEDINA, A. E. De novo assembly and functional annotation of *Myrciaria dubia* fruit transcriptome reveals multiple metabolic pathways for L-ascorbic acid biosynthesis. **BMC Genomics**, v. 16, p. 997–1010, 2015.

CHARDON, F.; BEDU, M.; CALENGE, F.; KLEMENS, P. A. W.; SPINNER, L.; CLEMENT, G.; CHIETERA, G.; LÉLAN, S.; FERRAND, M.; LACOMBE, B.; LOUDET, O.; DINANT, S.; BELLINI, C.; NEUHAUS, H. E.; DANIEL-VEDELE, F.; KRAPP, A. Leaf fructose content is controlled by the vacuolar transporter SWEET17 in Arabidopsis. **Current Biology**, v. 23, p. 697–702, 2013.

CHEN, H.; BOUTROS, P. C. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. **BMC Bioinformatics**, v. 12, p. 35, 2011.

CIDRA.IBGE. **Sistema IBGE de Recuperação Automática**. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/pms/brasil>. Acesso em: 05 Jun. 2018.

COLOMBIÉ, S.; BEAUVOIT, B.; NAZARET, C.; CAMILLE BÉNARD, C.; VERCAMBRE, G.; GALL, S. L.; BIAIS, B.; CABASSON, C.; MAUCOURT, M.; BERNILLON, S.; MOING, A.; DIEUAIDE-NOUBHANI, M.; MAZAT, J-P.; GIBON, Y. Respiration climacteric in tomato fruits elucidated by constraint-based modelling. **New Phytologist**, v. 213, p. 1726–1739, 2017.

CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Starch breakdown during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 347–351, 1995.

CRUZ-HERNÁNDEZ, A.; GÓMEZ-LIM, M. A. Alternative oxidase from mango (*Mangifera indica*, L.) is differentially regulated during fruit ripening. **Planta**, v. 197, p. 569-576, 1995.

CRUZ-RUS, E.; AMAYA, I.; SÁNCHEZ-SEVILLA, J. F.; BOTELLA, M. A.; VALPUESTA, V. Regulation of L-ascorbic acid content in strawberry fruits. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 4191–4201, 2011.

DE MATTEO, A. D.; GIOVANE, A.; RAIOLA, A.; CAMARDELLA, L.; BONIVENTO, D.; LORENZO, G. D.; CERVONE, F.; BELLINCAMPI, D.; TSERNOGLOU, D. Structural Basis for the Interaction between Pectin Methyltransferase and a Specific Inhibitor Protein. **The Plant Cell**, v. 17, p. 849–858, 2005.

DE POEL, B. V.; BULENS, I.; MARKOULA, A.; HERTOOG, M. L. A. T. M.; DREESEN, R.; MARKUS WIRTZ, VANDONINCK, S.; OPPERMAN, Y.; KEULEMANS, J.; HELL, R.; WAELKENS, E.; DE PROFT, M. P.; SAUTER, M.; NICOLAI, B. M.; GEERAERD, A. H. Targeted systems biology profiling of tomato fruit reveals coordination of the yang cycle and a distinct regulation of ethylene biosynthesis during postclimacteric ripening. **Plant Physiology**, v. 160, p. 1498–1511, 2012.

DE POEL, B. V.; DER STRAETEN, D. V. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, Artigo, 640, 2014.

DELLAPENNA, D.; ALEXANDER, D. C.; BENNETT, A. B. Molecular cloning of tomato fruit polygalacturonase: analysis of polygalacturonase mRNA levels during ripening. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, p. 6420–6424, 1986.

DEL-SAZ, N. F.; RIBAS-CARBO, M.; MCDONALD, A. E.; LAMBERS, H.; FERNIE, A. R.; FLOREZ-SARAAS, I. An *in vivo* perspective of the role (s) of the alternative oxidase pathway. **Trends in Plant Science**, v. 23, p. 206–219, 2018.

DELUC, L. G.; GRINPLET, G.; WHEATLEY, M. D.; TILLET, R. L.; QUILLIC, D. R.; OSBORNE, C.; SCHOOLEY, D. A.; SCHLAUCH, K. A.; CUSHMAN, J. C.; CRAMER, G.

R. Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. **BMC Genomics**, v. 8, 429, 2007.

DESHPANDE, A. B.; ANAMIKA, K.; JHA, V.; CHIDLEY, H. G.; OAK, P. S.; KADDOO, N. Y.; PUJARI, K. H.; GIRI, A. P.; GUPTA, V. S. Transcriptional transitions in Alphonso mango (*Mangifera indica* L.) during fruit development and ripening explain its distinct aroma and shelf life characteristics. **Scientific Reports**, v. 7, Artigo, 8711, 2017.

ELTELIB, H. A.; BADEJO, A. A.; FUJIKAWA, Y.; ESAKA, M. Gene expression of monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase during fruit ripening and in response to environmental stresses in acerola (*Malpighia glabra*). **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 619–627, 2011.

ETIENNE, A.; GÉNARD, M.; LOBIT, P.; MBEGUIÉ-A-MBÉGUIÉ, D.; BUGAUD, C. What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p. 1451–1469, 2013.

FAN, H.; XIAO, Y.; YANG, Y.; XIA, W.; MASON, A. S.; XIA, Z.; QIAO, F.; ZHAO, S.; TANG, H. RNA-seq analysis of *Cocos nucifera*: transcriptome sequencing and de novo assembly for subsequent functional genomics approaches. **Plos One**, v. 8, e59997, 2013.

FENG, C.; CHEN, M.; XU, C.; BAI, L.; YIN, X.; LI, X.; ALLAN, A. C.; FERGUSON, I. B.; CHEN, K. Transcriptomic analysis of Chinese bayberry (*Myrica rubra*) fruit development and ripening using RNA-Seq. **BMC Genomics**, v. 13, p. 1–15, 2012.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência agrotecnologia**, v. 38, p. 109–112, 2014.

FERREIRA, R. M. A.; AROUCHA, E. M. M.; SOUZA, P. A.; QUEIROZ, R. F.; PONTES-FILHO, F. S. Ponto de colheita da acerola visando à produção industrial de polpa. **Revista Verde**, v.4, p. 13–16, 2009.

FLÜGGE, U. I.; HÄUSLER, R. E.; LUDEWIG, F.; GIERTH, M. The role of transporters in supplying energy to plant plastids. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 2381–2392, 2011.

FREITAS, V. S.; MIRANDA, R. S.; COSTA, J. H.; DE OLIVEIRA, D. F.; PAULA, S. O.; MIGUEL, E. C.; FREIRE, R. S.; PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Ethylene triggers salt tolerance in maize genotypes by modulating polyamine catabolism enzymes associated with H₂O₂ production. **Environmental and Experimental Botany**, v. 145, p. 75–86, 2018.

FURLANETO, F. P. B.; NASSER, M. D. Panorama da cultura da acerola no estado de São Paulo. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 12, n. 1, 2015.

GAPPER, N. E.; GIOVANNONI, J. J.; WALKINS, C. B. Understanding development and ripening of fruit crops in an ‘omics’ era. **Horticulture Research**, v. 34, p. 1–10, 2014.

GILLASPY, G. E. The cellular language of myo-inositol signaling. **New Phytologist**, v. 192, p. 823–839, 2011.

GIOVANNONI, J. J. Genetic regulation of fruit development and ripening. **The Plant Cell**, v.16, p.170–180, 2004.

GIOVANNONI, J. Molecular biology of fruits maturation and ripening. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 52, p. 725–749, 2001.

GIOVANNONI, J.; NGUYEN, C.; AMPOFO, B.; ZHONG, S.; FEI, Z. 2017. The epigenome and transcriptional dynamics of fruit ripening. **Annual Review of Plant Biology**, v. 68, p. 61–84, 2017.

GÓMEZ-GARCÍA, M. R.; OCHOA-ALEJO, N. Predominant role of the L-galactose pathway in L-ascorbic acid biosynthesis in fruits and leaves of the *Capsicum annum* L. chili pepper. **Brazilian Journal of Botany**, v. 39, p. 157–168, 2016.

GOODENOUGH, P. W.; PROSSER, I. M.; YOUNG, K. NADP-linked malic enzyme and malate metabolism in ageing tomato fruit. **Phytochemistry**, v. 24, p. 1157–1162, 1985.

GOUTHU, S.; NEIL, S. T. O.; DI, Y.; ANSAROLIA, M.; MEGRAW, M.; DELUC, L. A comparative study of ripening among berries of the grape cluster reveals an altered transcriptional programme and enhanced ripening rate in delayed berries. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 5889–5902, 2014.

GRABHERR, G. M.; HAAS, B. J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J. Z.; THOMPSON, D. A.; AMIT, I.; ADICONIS, X.; FAN, L.; RAYCHOWDHURY, R.; ZENG, Q.; CHEN, Z.; MAUCELI, E.; HACOEN, N.; GNIRKE, A.; RHIND, N.; PALMA, F.; BIRREN, B. W.; NUSBAUM, C.; LINDBLAD-TOH, K.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, v. 29, p. 644–652, 2011.

GRIERSON, D. **Ethylene and the control of fruit ripening**. In: SEYMOUR, G. B.; POOLE, M.; GIOVANNONI, J. J.; TUCKER, G. A. The molecular biology and biochemistry of fruit ripening. Willey-Blackwell, p. 43–68, 2013.

HANAMURA, T.; UCHIDA, E.; AOKI, H. Changes of the composition in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit in relation to cultivar, growing region and maturity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 1813–1820, 2008.

HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biology**, v. 8, p. R19, 2007.

HOLTZAPFFEL, R. C.; FINNEGAN, P. M.; MILLAR, A. H.; BADGER, M. R.; DAY, D. A. Mitochondrial protein expression in tomato fruit during on-vine ripening and cold storage. **Functional Plant Biology**, v. 29, p. 827–834, 2002.

HOREMANS, N.; SZARKA, A.; DE BOCK, M.; RAEYMAEKERS, T.; POTTERS, G.; LEVINE, M.; BANHÉGYI, G.; GUISEZ, Y. Dehydroascorbate and glucose are taken up into *Arabidopsis thaliana* cell cultures by two distinct mechanisms. **FEBS Letters**, v. 582, p. 2714–2718, 2008.

HORTA, R. N.; KAHL, V. F.; SARMENTO, M. D. A. S.; NUNES, M. F.; PORTO, C. R.; ANDRADE, V. M.; FERRAZ, A. D. E. B.; SILVA, J. D. Protective effects of acerola juice on genotoxicity induced by iron in vivo. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, p. 122–128, 2016.

HRDLICKOVA, R.; TOLOUE, M.; TIAN, B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 8, p. 1–24, 2017.

HU, X-M.; SHI, C-Y.; LIU, X.; JIN, L-F.; LIU, Y-Z.; PENG, S-A. Genome-wide identification of citrus ATP-citrate lyase genes and their transcript analysis in fruits reveals their possible role in citrate utilization. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 290, p. 29–38, 2015.

HUANG, M.; XU, Q.; DENG, X-X. L-Ascorbic acid metabolism during fruit development in an ascorbate-rich fruit crop chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt). **Journal of Plant Physiology**, v. 171, p. 1205–1216, 2014.

JIMÉNEZ-BERMÚDEZ, S.; REDONDO-NEVADO, J.; MUÑOZ-BLANCO, J.; CABALLERO, J. L.; LÓPEZ-ARANDA, J. M.; VALPUESTA, V.; PLIEGO-ALFARO, F.; QUESADA, M. A.; MERCADO, J. A. Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. **Plant Physiology**, v. 128, p. 751–759, 2002.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 27–30, 2000.

KARLOVA, R.; CHAPMAN, N.; DAVID, K.; ANGENENT, G. C.; SEYMOUR, G. B.; MAAGD, R. A. Transcriptional control of fleshy fruit development and ripening. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 4527–4541, 2014.

KARLOVA, R.; ROSIN, F. M.; BUSSCHER-LANGE, J.; PARAPUNOVA, V.; DO, P. T.; FERNIE, A. R.; FRASER, P. D.; BAXTER, C.; ANGENENT, G. C.; DE MAAGD, R. A. Transcriptome and metabolite profiling show that APETALA2a is a major regulator of tomato fruit ripening. **The Plant Cell**, v. 23, p. 923–941, 2011.

KEVANY, B.; TIEMAN, D. M.; TAYLOR, M.; DAL CIN, V.; KLEE, H. Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. **The Plant Journal**, v. 51, p. 458–67, 2007.

KLANN, E. M.; HALL, B.; BENNETT, A. B. Antisense acid invertase (TW7) gene alters soluble sugar composition and size in transgenic tomato fruit. **Plant Physiology**, v. 11, p. 1321–1330, 1996.

KLANN, E. M.; ROGER, T.; CHETELAT, R. T.; BENNETT, A. B. Expression of acid invertase gene controls sugar composition in tomato (*Lycopersicon*) fruit. **Plant Physiology**, v. 103, p. 863–870, 1993.

KLEE, H. J.; GIOVANNONI, J. J. Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. **Annual Review of Genetics**, v. 45, p. 41–59, 2011.

- KLEMENS, P. A.; PATZKE, K.; TRENTMANN, O.; POSCHET, G.; BÜTTNER, M.; SCHULZ, A.; MARTEN, I.; HEDRICH, R.; NEUHAU, H. E. Overexpression of a proton-coupled vacuolar glucose exporter impairs freezing tolerance and seed germination. **New Phytologist**, v. 202, p. 188–197, 2014.
- KLOSTERHOFF, R. R.; BARK, J. M.; GLÄNZEL, N. M.; IACOMINI, M.; MARTINEZ, G. R.; WINNISCHOFER, S. M. B.; CORDEIRO, L. M. C. Structure and intracellular antioxidant activity of pectic polysaccharide from acerola (*Malpighia emarginata*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 473–480, 2018.
- KNAPP, S.; LITT, A. **Fruit – an angiosperm innovation**. In: SEYMOUR, G. B.; POOLE, M.; GIOVANNONI, J. J.; TUCKER, G. A. The molecular biology and biochemistry of fruit ripening. Wiley-Blackwell, p. 21–38, 2013.
- KOCH, J. L.; NEVINS, D. J. Tomato fruit cell wall: I. Use of purified tomato polygalacturonase and pectinmethylesterase to identify developmental changes in pectins. **Plant Physiology**, v. 91, p. 816–822, 1989.
- LANGMEAD, B.; TRAPNELL, C.; POP, M.; SALZBERG, S. L. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biology**, v. 10, R25, 2009.
- LI, B.; DEWEY, C. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. **BMC Bioinformatics**, v. 12, R323, 2011.
- LI, T.; JIANG, Z.; ZHANG, L.; TAN, D.; WEI, Y.; YUAN, H.; LI, T.; WANG, A. Apple (*Malus domestica*) MdERF2 negatively affects ethylene biosynthesis during fruit ripening by suppressing MdACS1 transcription. **The Plant Journal**, v. 88, p. 735–748, 2016.
- LI, W.; GODZIK, A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. **Bioinformatics**, v. 22, p. 1658, 2006.
- LINSTER, C. L.; CLARKE, S. G. L-Ascorbate biosynthesis in higher plants: the role of VTC2. **Trends in Plant Science**, v. 13, p. 567–573, 2008.
- LIU, M.; GOMES, B. L.; MILA, I.; PURGATTO, E.; PERES, L. E. P.; FRASSE, P.; MAZA, E.; ZOUINE, M.; ROUSTAN, J-P.; BOUZAYEN, M.; PIRRELLO, J. Comprehensive profiling of ethylene response factor expression identifies ripening-associated *ERF* genes and their link to key regulators of fruit ripening in tomato. **Plant Physiology**, v. 170, p. 1732–1744, 2016.
- LIU, M.; PIRRELLO, J.; CHERVIN, C.; ROUSTAN, J-P.; BOUZAYEN, M. Ethylene control of fruit ripening: revisiting the complex network of transcriptional regulation. **Plant Physiology**, v. 169, p. 238–2390, 2015.
- LOEWUS, F. A. Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. **Phytochemistry**, v. 52, p. 193–210, 1999.
- LOEWUS, F. A.; MURTHY, P. P. N. Myo-Inositol metabolism in plants. **Plant Science**, v. 150, p. 1–19, 2000.

- LORENCE, A.; CHEVONE, B. I.; MENDES, P.; NESSLER, C. L. Myo-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1200–1205, 2004.
- LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. “Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2”. **Genome Biology**, v. 15, 550, 2014.
- MARDIS, E. R. Next-Generation DNA Sequencing methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 9, p. 387–402, 2008.
- MARSHALL, O. J. Perlprimer: cross-platform graphical primer design for standard bisulphite and real-time PCR. **Bioinformatics**, v. 20, p. 2471–2472, 2004.
- MARTÍNEZ-LÓPEZ, L. A.; OCHOA-ALEJO, N.; MARTÍNEZ, O. 2014. Dynamics of the chili pepper transcriptome during fruit development. **BMC Genomics**, v. 15, 143, 2014.
- MATHOOKO, F. M.; TSUNASHIMA, Y.; OWINO, W. Z. O.; KUBO, Y.; INABA, A. Regulation of genes encoding ethylene biosynthetic enzymes in peach (*Prunus persica* L.) fruit by carbon dioxide and 1-methylcyclopropene. **Postharvest Biology and Technology**, v. 21, p. 265–281, 2001.
- MAURINO, V. G.; GRUBE, E.; ZIELINSKI, J.; SCHILD, A.; FISCHER, K.; FLUGGE, U. I. Identification and expression analysis of twelve members of the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v. 47, p. 1381–1393, 2006.
- MCGETTIGAN, P. A. Transcriptomics in the RNA-seq era. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, p. 4–11, 2013.
- MENDONÇA, V.; MEDEIROS, L. F. Culturas da aceroleira e do maracujazeiro. **Boletim técnico**, Mossoró/RN, 2011.
- MEZADRI, T.; FERNANDES-PACHÓN, M. S.; VILLANÓ, D.; GARCÍA-PARRILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M. El fruto de la acerola: composición y posibles usos alimenticios. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 26, n. 2, p. 101–109, 2006.
- MINOIA, S.; BOUALEM, A.; MARCEL, F.; TROADEC, C.; QUEMENER, B.; CELLINI, F.; PETROZZA, A.; VIGOUROUX, J.; LAHAYE, M.; CARRIERO, F.; BENDAHMANE, A. Induced mutations in tomato *SlExp1* alter cell wall metabolism and delay fruit softening. **Plant Science**, v. 242, p. 195–202, 2016.
- MONDIN, M.; OLIVEIRA, C. A.; VIEIRA, M. L. C. Caracterização cariotípica de *Malpighia emarginata* (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 369-374, 2010.
- MORIYA, Y.; ITOH, M.; OKUDA, S.; YOSHIZAWA, A. C.; KANEHISA, M. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. **Nucleic Acids Research**, v. 35, W182–W185, 2007.

MOROZOVA, O.; MARRA, M. A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. **Genomics**, v. 92, p. 255–264, 2008.

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

MUTZ, K. O.; HEILKENBRINKER, A.; LÖNNE, M.; WALTER, J. G.; STAHL, F. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, p. 22–30, 2013.

NAGALAKSHMI, U.; WANG, Z.; WAERN, K.; SHOU, C.; RAHA, D.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. The Transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. **Science**, v. 320, p. 1344–1349, 2008.

NASCIMENTO, J. R. O.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M.; ALCOCER, M. J. C. Banana sucrose-phosphate synthase gene expression during fruit ripening. **Planta**, v. 203, p. 283–288, 1997.

NISHIKIMI, M.; KOSHIZAKA, T.; OZAWA, T.; YAGI, K. Occurrence in humans and guinea pigs of the gene related to their missing enzyme L-gulonolactone oxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 267, p. 842–856, 1988.

NORDEY, T.; LÉCHAUDEL, M.; GÉNARD, M.; JOAS, J. Factors affecting ethylene and carbon dioxide concentrations during ripening: Incidence on final dry matter, total soluble solids content and acidity of mango fruit. **Journal of Plant Physiology**, v. 196–197, p. 70–78, 2016.

OLIVEIRA, L. S.; MOURA, C. F. H.; BRITO, E. S.; MAMEDE, R. V. S.; MIRANDA, M. R. A. Antioxidant metabolism during fruit development of different acerola (*Malpighia emarginata* D.C) clones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7957–7964, 2012.

OLIVEIRA, M. G.; MAZORRA, L. M.; SOUZA, A. F.; SILVA, G. M. C.; CORREA, S. F.; SANTOS, W. C.; SARAIVA, K. D. C.; TEIXEIRA JR., A. J.; MELO, D. F.; SILVA, M. G.; SILVA, M. A. P.; ARRABAÇA, J. D. C.; COSTA, J. H.; OLIVEIRA, J. G. Involvement of AOX and UCP pathways in the post-harvest ripening of papaya fruits. **Journal of Plant Physiology**, v. 189, p. 42–50, 2015.

ONG, W. D.; VOO, L-Y. C.; KUMAR, V. S. De novo assembly, characterization and functional annotation of pineapple fruit transcriptome through massively parallel sequencing. **Plos One**, v. 7, e46937, 2012.

OSORIO, S.; FERNIE, A. R. **Biochemistry of fruit ripening**. In: SEYMOUR, G. B.; POOLE, M.; GIOVANNONI, J. J.; TUCKER, G. A. The molecular biology and biochemistry of fruit ripening. Wiley-Blackwell, p. 1–13, 2013.

PANIAGUA, C.; POSÉ, S.; MORRIS, V. J.; KIRBY, A. R.; QUESADA, M. A.; MERCADO, J. A. Fruit softening and pectin disassembly: an overview of nanostructural

pectin modifications assessed by atomic force microscopy. **Annals of Botany**, v. 114, p. 1375–1383, 2014.

PATERAKI, I.; RENATO, M.; AZCÓN-BIETO, J.; BORONAT, A. An ATP synthase harboring an atypical g-subunit is involved in ATP synthesis in tomato fruit chromoplasts. **Plant Journal**, v. 74, p. 74–85, 2013.

PLAZA, L.; CRESPO, I.; PASCUAL-TERESA, S.; ANCOS, B.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; MUÑOZ, M.; CANO, MP. Impact of minimal processing on orange bioactive compounds during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 124, p. 646–651, 2011.

POWELL, A. L.; KALAMAKI, M. S.; KURIEN, P. A.; GURRIERI, S.; BENNETT, A. B. Simultaneous transgenic suppression of *LePG* and *LeExpI* influences fruit texture and juice viscosity in a fresh market tomato variety. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7450–7455, 2003.

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

PRUITT, K. D.; TATUSOVA, T.; MAGLOTT, D. R. NCBI reference sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 33, D61–D65, 2005.

QUESADA, M. A.; BLANCO-PORTALES, R.; POSE´ S.; GARCÍA-GAGO, J. A.; JIMÉNEZ-BERMÚDEZ, S.; MUÑOZ-SERRANO, A.; CABALLERO, J. L.; PLIEGO-ALFARO, F.; MERCADO, J. A.; MUÑOZ-BLANCO, J. Antisensedown-regulation of the *FaPG1* gene reveals an unexpected central role for polygalacturonase in strawberry fruit softening. **Plant Physiology**, v. 150, p. 1022–1032, 2009.

RADZIO, J. A.; LORENCE, A.; CHEVONE, B. I.; NESSLER, C. L. L-Gulono-1,4-lactone oxidase expression rescues vitamin C-deficient *Arabidopsis* (*vtc*) mutants. **Plant Molecular Biology**, p. 53, p. 837–844, 2003.

RENATO, M.; PATERAKI, I.; BORONAT, A.; AZCÓN-BIETO J. Tomato fruit chromoplasts behave as respiratory bioenergetic organelles during ripening. **Plant Physiology**, v. 166, p. 920–933, 2014.

RIGANO, M. M.; LIONETTI, V.; RAIOLA, A.; BELLINCAMPI, D.; BARONE, A. Pectic enzymes as potential enhancers of ascorbic acid production through the D-galacturonate pathway in Solanaceae. **Plant Science**, v. 266, p. 55–63, 2018.

RITZINGER, R.; RITZINGER, C. H. S. P. Acerola. **Informe Agropecuário**, v. 32, p. 17–25, 2011.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, p. 139–140, 2010.

ROE, B.; BRUEMMER, J. H. Changes in pectic substances and enzymes during ripening and storage of ‘Keitt’ mangos. **Journal of Food Science**, v. 46, p. 186–189, 1981.

RUAN, Y-L. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p. 33–67, 2014.

RUGGIERI, V.; BOSTAN, H.; BARONE, A.; FRUSCIANTE, L.; CHIUSANO, M. L. Integrated bioinformatics to decipher the ascorbic acid metabolic network in tomato. **Plant Molecular Biology**, v. 91, p. 397–412, 2016.

RUIZ-MAY, E.; ROSE, J. K. C. **Cell wall architecture and metabolism in ripening fruit and the complex relationship with softening**. In: SEYMOUR, G. B.; POOLE, M.; GIOVANNONI, J. J.; TUCKER, G. A. The molecular biology and biochemistry of fruit ripening. Wiley-Blackwell, p. 163–180, 2013.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R. W.; BROWN, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarrays. **Science**, v. 270, p. 467–470, 1995.

SHELLIE, K. C.; SALTVEIT, M. E. The lack of a respiratory rise in muskmelon fruit ripening on the plant challenges the definition of climacteric behaviour. **Journal of Experimental Botany**, v. 44, p. 1403–1406, 1993.

SIQUEIRA, K. M. M.; MARTINS, C. F.; KIILL, L. H. P.; SILVA, L. T. Estudo comparativo da polinização em variedades de aceroleiras (*Malpighia emarginata* DC. Malpighiaceae). **Revista Caatinga**, v. 24, p. 18–25, 2011.

SLEWINSKI, T. Diverse transporters and their homologs in vascular plants: a physiological perspective. **Molecular Plant**, v. 4, p. 641–662, 2011.

SMIRNOFF, N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, p. 229–235, 2000.

SMIRNOFF, N.; WHEELER, G. L. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, p. 291–314, 2000.

SOUZA, M. J. H.; GUIMARÃES, M. C. A.; GUIMARÃES, C. D. L.; FREITAS, W. S.; OLIVEIRA, M. A. S. Potencial agroclimático para a cultura da acerola no Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, p. 390–396, 2006.

SWEETMAN, C.; DELUC, L. G.; CRAMER, G. R.; FORD, C. M.; SOOLE, K. L. 2009. Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1329–1344, 2009.

SWEETMAN, C.; WONG, D. C. J.; FORD, C. M.; DREW, D. P. Transcriptome analysis at four developmental stages of grape berry (*Vitis vinifera* cv. Shiraz) provides insights into regulated and coordinated gene expression. **BMC Genomics**, v. 13, p. 1–26, 2012.

TIAN, T.; LIU, Y.; YAN, H.; YOU, Q.; YI, X.; DU, Z.; XU, W.; SU Z. agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. **Nucleic Acids Research**, v. 45, W122–W129, 2017.

TRUFFAULT, V.; FRY, S. C.; STEVENS, R. G.; GAUTIER, H. Ascorbate degradation in tomato leads to accumulation of oxalate, threonate and oxalyl threonate. **The Plant Journal**, v. 89, p. 996–1008, 2017.

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

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

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; ROY, N. V.; DE PAEPE, A. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, 2002.

VERK, M. C. V.; HICHMAN, R.; PIETERSE, C. M. J.; WEES, S. C. M. V. RNA-Seq: revelation of the messengers. **Trends in Plant Science**, v. 18, p. 175–179, 2013.

VIMOLMANGKANG, S.; ZHENG, H.; PENG, Q.; JIANG, Q.; WANG, H.; FANG, T.; LIAO, L.; WANG, L.; HE, H.; HAN, Y. Assessment of sugar components and genes involved in the regulation of sucrose accumulation in peach fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 6723–6729, 2016.

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

WEI, X.; LIU, F.; CHEN, C.; MA, F.; LI, M. The *Malus domestica* sugar transporter gene family: identifications based on genome and expression profiling related to the accumulation of fruit sugars. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, 569, 2014.

WHEELER, G. L.; JONES, M. A.; SMIRNOFF, N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. **Nature**, v. 393, p. 365–369, 1998.

WINTER, H.; HUBER, S. C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, p. 253–289, 2000.

WOLUCKA, B. A.; MONTAGU, M. V. GDP-Mannose 3'-5'epimerase forms GDP-L-gulose a putative intermediate for the de Novo biosynthesis of vitamin C in plants. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 47483–47490, 2003.

WU, H.; JIA, H.; MA, X.; WANG, S.; YAO, Q.; XU, W.; ZHOU, Y.; GAO, Z.; ZHAN, R. Transcriptome and proteomic analysis of mango (*Mangifera indica* Linn) fruits. **Journal of Proteomics**, v. 105, p. 9–30, 2014.

XU, F.; YUAN, S.; ZHANG, D-W.; LV, X.; LIN, H-H. The role of alternative oxidase in tomato changes fruit ripening and its regulatory interaction with ethylene. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 5705–5716, 2012.

YANG, H.; LIU, J.; DANG, M.; ZHANG, B.; LI, H.; MENG, R.; QU, D.; YANG, Y.; ZHAO, Z. Analysis of β -galactosidase during fruit development and ripening in two different texture types of apple cultivars. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, Artigo 539, 2018.

YANG, X.; SONG, J.; CAMPBELL-PALMER, L.; FILLMORE, S.; ZHANG, Z. Effect of ethylene and 1-MCP on expression of genes involved in ethylene biosynthesis and perception during ripening of apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 78, p. 55–66, 2013.

YU, K.; XU, Q.; DA, X.; GUO, F.; DING, Y.; DENG, X. Transcriptome changes during fruit development and ripening of sweet orange (*Citrus sinensis*). **BMC Genomics**, v. 13, p. 1–14, 2012.

ZEEMAN, S. C. 2015. **Carbohydrate Metabolism**. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Ed 1. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Oxford: Wiley Blackwell.

ZHANG, C.; HUANG, J.; LI, X. Transcriptomic analysis reveals the metabolic mechanism of L-ascorbic acid in *Ziziphus jujuba* Mill. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 122, 2016.

ZHANG, Q.; MOORE, C.S.; SOOLE, K.L.; WISKICH, J.T. Over-reduction of cultured tobacco cells mediates changes in respiratory activities. **Physiologia Plantarum**, v. 119, p. 183–191, 2003.

ZHANG, Z.; WANG, N.; JIANG, S.; XU, H.; WANG, Y.; WANG, C.; LI, M.; LIU, J.; QU, C.; LIU, W.; WU, S.; CHEN, X.; CHEN, X. Analysis of the *xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase* gene family during apple fruit ripening and softening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 429–434, 2017.

ANEXO A – DESCRIÇÃO DAS 141 VIAS METABÓLICAS REPRESENTADAS DURANTE O AMADURECIMENTO DA ACEROLA, DE ACORDO O BANCO DE DADOS ENCICLOPÉDIA DE GENES E GENOMAS DE KYOTO (KEGG). NAS COLUNAS NOMEADAS “UP” (REGULADOS POSITIVAMENTE) OU “DOWN” (REGULADOS NEGATIVAMENTE) É APRESENTADO O NÚMERO DE EC (DO INGLÊS, *ENZYME COMMISSION NUMBER*).

Vias do KEGG	intermediário vs. verde		maduro vs. verde		maduro vs. intermediário	
	<i>up</i>	<i>down</i>	<i>up</i>	<i>down</i>	<i>up</i>	<i>down</i>
00010 Glycolysis / Gluconeogenesis	3	5	12	10	3	7
00020 Citrate cycle (TCA cycle)	1	1	6	3	1	2
00030 Pentose phosphate pathway	3	2	7	6	3	2
00040 Pentose and glucuronate interconversions	3	1	6	2	2	2
00051 Fructose and mannose metabolism	2	3	5	7	2	3
00052 Galactose metabolism	1	2	6	6	2	6
00520 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	2	4	10	9	5	4
00620 Pyruvate metabolism	2	3	10	7	2	5
00630 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	5	8	7	12	2	7
00650 Butanoate metabolism	1	0	3	0	0	1
00562 Inositol phosphate metabolism	2	2	4	2	0	2
00190 Oxidative phosphorylation	0	2	4	18	2	8
00195 Photosynthesis	0	12	2	19	0	16
00196 Photosynthesis - antenna proteins	0	7	0	11	0	8
00710 Carbon fixation in photosynthetic organisms	1	8	4	11	1	7
00680 Methane metabolism	2	6	5	7	2	5
00910 Nitrogen metabolism	4	1	6	7	2	0
00920 Sulfur metabolism	1	0	2	4	2	0
00061 Fatty acid biosynthesis	2	0	5	2	1	2
00062 Fatty acid elongation	1	3	2	4	1	3
00071 Fatty acid degradation	2	2	4	4	0	4
00072 Synthesis and degradation of ketone bodies	1	0	2	0	0	0
00073 Cutin, suberine and wax biosynthesis	2	1	2	5	0	4
00100 Steroid biosynthesis	2	1	3	3	2	3
00140 Steroid hormone biosynthesis	2	2	3	3	2	2
00561 Glycerolipid metabolism	3	1	7	7	3	4
00564 Glycerophospholipid metabolism	0	2	2	9	2	3

00660 C5-Branched dibasic acid metabolism	0	0	0	2	0	1
00592 alpha-Linolenic acid metabolism	2	1	4	8	1	0
00565 Ether lipid metabolism	0	2	0	3	0	3
01040 Biosynthesis of unsaturated fatty acids	1	2	3	6	1	4
00600 Sphingolipid metabolism	0	0	0	2	0	1
00590 Arachidonic acid metabolism	0	0	0	3	0	1
00591 Linoleic acid metabolism	0	1	0	2	0	2
00230 Purine metabolism	3	1	5	12	1	9
00240 Pyrimidine metabolism	1	0	4	7	1	7
00250 Alanine, aspartate and glutamate metabolism	4	2	7	4	2	2
00260 Glycine, serine and threonine metabolism	2	6	5	9	3	0
00270 Cysteine and methionine metabolism	4	2	8	9	3	0
00280 Valine, leucine and isoleucine degradation	4	0	11	3	3	2
00290 Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	1	0	2	2	0	1
00310 Lysine degradation	0	1	4	1	1	2
00220 Arginine biosynthesis	4	0	3	4	0	0
00330 Arginine and proline metabolism	2	0	7	6	1	3
00340 Histidine metabolism	3	1	1	2	0	2
00350 Tyrosine metabolism	3	2	6	4	1	5
00360 Phenylalanine metabolism	5	2	7	4	4	3
00380 Tryptophan metabolism	2	3	5	5	1	5
00400 Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	0	0	10	2	4	2
00410 beta-Alanine metabolism	2	2	5	2	2	1
00430 Taurine and hypotaurine metabolism	0	1	1	2	0	1
00450 Selenocompound metabolism	2	1	2	3	1	0
00460 Cyanoamino acid metabolism	0	5	2	8	3	5
00471 D-Glutamine and D-glutamate metabolism	1	0	1	0	0	0
00480 Glutathione metabolism	2	1	4	8	3	4
00513 Various types of N-glycan biosynthesis	0	0	1	1	1	1
00515 Mannose type O-glycan biosynthesis	0	1	0	1	0	1
00514 Other types of O-glycan biosynthesis	0	1	0	2	0	1
00532 Glycosaminoglycan biosynthesis - chondroitin sulfate / dermatan sulfate	0	0	1	0	1	2
00534 Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate / heparin	0	0	1	0	1	0

00531 Glycosaminoglycan degradation	1	0	2	0	2	0
00563 Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis	0	1	2	0	1	0
00603 Glycosphingolipid biosynthesis - globo and isoglobo series	0	0	1	1	1	0
00604 Glycosphingolipid biosynthesis - ganglio series	0	0	1	0	1	2
00511 Other glycan degradation	1	0	2	2	1	1
00730 Thiamine metabolism	0	1	1	3	1	1
00740 Riboflavin metabolism	0	0	1	0	0	0
00750 Vitamin B6 metabolism	0	0	0	1	0	0
00760 Nicotinate and nicotinamide metabolism	1	0	2	1	2	0
00770 Pantothenate and CoA biosynthesis	0	0	2	1	0	1
00780 Biotin metabolism	0	0	1	1	0	0
00790 Folate biosynthesis	0	0	2	0	0	0
00670 One carbon pool by folate	0	1	1	1	1	1
00830 Retinol metabolism	0	2	2	2	1	1
00860 Porphyrin and chlorophyll metabolism	1	3	4	7	1	5
00130 Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	3	1	4	4	2	3
00900 Terpenoid backbone biosynthesis	3	2	8	3	3	3
00909 Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis	2	2	4	2	2	1
00904 Diterpenoid biosynthesis	3	0	2	3	0	0
00906 Carotenoid biosynthesis	0	0	5	2	2	2
00905 Brassinosteroid biosynthesis	0	2	1	5	1	3
00981 Insect hormone biosynthesis	0	1	1	1	0	1
00908 Zeatin biosynthesis	1	0	2	1	1	1
00903 Limonene and pinene degradation	0	1	1	1	0	1
01051 Biosynthesis of ansamycins	0	0	1	0	0	0
00940 Phenylpropanoid biosynthesis	4	9	8	12	9	6
00945 Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis	3	2	3	5	2	2
00941 Flavonoid biosynthesis	7	4	8	4	7	1
00944 Flavone and flavonol biosynthesis	1	1	2	0	2	0
00942 Anthocyanin biosynthesis	1	2	1	2	1	1
00943 Isoflavonoid biosynthesis	0	1	1	0	0	0
00901 Indole alkaloid biosynthesis	1	0	1	1	1	0
00950 Isoquinoline alkaloid biosynthesis	2	1	4	1	1	2
00902 Monoterpenoid biosynthesis	0	0	0	1	0	0

01053 Biosynthesis of siderophore group nonribosomal peptides	0	0	0	1	0	0
00960 Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	2	0	4	0	0	0
00965 Betalain biosynthesis	0	0	1	0	0	0
03013 RNA transport	0	0	5	2	1	3
03020 RNA polymerase	0	0	0	1	0	0
03040 Spliceosome	0	2	2	1	2	0
03010 Ribosome	2	1	2	5	0	4
03022 Basal transcription factors	0	0	0	1	0	0
03015 mRNA surveillance pathway	0	0	4	1	0	0
00970 Aminoacyl-tRNA biosynthesis	0	1	0	3	0	1
04141 Protein processing in endoplasmic reticulum	2	8	4	9	7	3
03008 Ribosome biogenesis in eukaryotes	0	0	1	2	0	1
04130 SNARE interactions in vesicular transport	1	0	2	2	1	0
04120 Ubiquitin mediated proteolysis	3	1	6	3	3	1
03050 Proteasome	0	0	0	1	0	0
03018 RNA degradation	0	0	3	4	0	2
03030 DNA replication	0	0	1	11	0	10
03420 Nucleotide excision repair	1	0	2	8	1	0
03410 Base excision repair	0	0	0	5	0	6
03430 Mismatch repair	0	0	3	7	0	5
03450 Non-homologous end-joining	0	0	1	6	0	0
02010 ABC transporters	2	2	6	3	5	0
02020 Two-component system	2	0	2	2	0	0
04010 MAPK signaling pathway	1	1	2	2	1	1
04016 MAPK signaling pathway - plant	2	10	11	11	10	7
04014 Ras signaling pathway	0	2	0	2	0	0
04015 Rap1 signaling pathway	0	1	0	1	0	0
04020 Calcium signaling pathway	2	1	4	2	1	1
04070 Phosphatidylinositol signaling system	2	1	4	1	0	0
04072 Phospholipase D signaling pathway	1	0	3	1	0	0
04024 cAMP signaling pathway	1	1	2	2	0	1
04152 AMPK signaling pathway	3	2	5	4	2	4
04075 Plant hormone signal transduction	0	14	13	16	14	13
04144 Endocytosis	2	3	7	4	0	2

04142 Lysosome	0	1	6	4	0	2
04145 Phagosome	2	2	4	3	0	2
04146 Peroxisome	2	1	4	3	0	2
04110 Cell cycle	1	0	2	12	0	13
04712 Circadian rhythm – plant	4	2	5	1	4	0
04626 Plant-pathogen interaction	0	7	5	12	5	5
03060 Protein export	0	1	1	0	1	0
04218 Cellular senescence	1	2	1	4	2	4
00640 Propanoate metabolism	3	0	2	0	2	0
03440 Homologous recombination	0	0	0	5	0	5
04978 Mineral absorption	1	0	1	1	1	1

Fonte: elaborada pelo autor.

ANEXO B – PERFIL DE EXPRESSÃO DOS TRANSCRITOS ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DO ASCORBATO. AS CONTAGENS REPRESENTAM O NÚMERO DE FRAGMENTOS POR MILHÃO EM CADA BIBLIOTECA.

	EC	12 DAA_R1	12 DAA_R2	16 DAA_R1	16 DAA_R2	20 DAA_R1	20 DAA_R2	Folhas_R1	Folhas_R2	Flores
Via da L-galactose										
TR_16909_c0_g1/GPI	XP_002510371.2	36,8856	43,9116	43,4151	43,2783	48,9931	52,4576	42,9273	42,3689	87,1933
TR_17846_c1_g2/GPI	XP_012067970.1	87,6412	95,4376	68,8920	65,1511	48,6311	43,2421	154,2689	177,9411	160,4985
TR_17846_c1_g1/GPI	XP_021638825.1	69,3501	77,9197	81,1164	77,0856	93,2800	103,2363	58,4073	66,9438	32,6471
TR_17817_c0_g1/PMI	OAP17532.1	39,5295	37,7452	16,5792	17,6256	10,7801	10,7079	47,5427	73,4223	49,1921
TR_17817_c0_g3/PMI	AT3G02570	7,8452	8,9691	8,1959	9,3437	6,8783	5,894	22,7502	22,2426	25,1596
TR_16761_c0_g4/PMM	ACN54046.1	177,1896	164,9488	91,4667	103,5028	67,0538	57,3079	44,1118	75,2794	319,7088
TR_15784_c1_g1/GMP	ABB53473.1	2102,8270	2218,2835	1795,709	1830,3066	877,0898	783,4697	149,2451	270,7987	237,2254
TR_15784_c1_g3/GMP	XP_021653979.1	1,16965	1,21388	0,8426	0,8065	0,72365	0,5592	1,1013	1,4658	2,9546
TR_12911_c0_g1/GMP	XP_021634932.1	45,0099	45,5673	28,9305	27,0831	21,3881	24,6082	31,2866	42,1646	46,6980
TR_15784_c0_g1/GMP	XP_018846273.1	2,16602	3,0347	3,8854	4,5421	1,6081	1,4168	0,1223	0,3449	0,3069
TR_16652_c1_g2/GME	ABB53472.1	1448,289	1291,4793	670,0373	616,9269	433,4316	434,4852	475,7038	681,1872	1474,423
TR_18249_c3_g5/GME	XM_018122066.1	264,6445	202,7186	58,6569	46,6950	33,52951	34,1905	11,0951	64,7559	132,2280
TR_18229_c2_g2/GGP	ACG75920.1	3009,341	3040,4529	1490,860	1376,2738	1279,9119	1333,731	3679,749	4007,752	1197,381
TR_18229_c2_g3/GGP	XP_021687565.1	790,5980	888,2363	569,7166	552,997	401,550	374,0458	1023,362	1225,447	412,7235
TR_15350_c0_g1/GPP	XP_021679905.1	24,735	23,4373	18,9125	16,8951	19,8202	12,3787	14,684	29,3600	67,5721
TR_9736_c0_g1/GPP	XP_011040224.1	12,9094	13,6328	14,1843	13,796	20,624	15,21239	15,3781	15,6069	20,5287
TR_15297_c0_g1/GalDH	ACG75921.1	210,9272	241,1894	218,3367	209,4911	166,8034	112,3032	352,2704	337,3170	108,9366
TR_25084_c0_g1/GalDH	ACG75921.1	155,5823	179,6112	169,4101	161,6743	134,6622	87,5852	29,2897	48,3569	86,68691
TR_17761_c2_g1/ GalLDH	ACG75919.1	43,9702	51,91689	47,7026	48,6477	44,1834	46,5693	22,3942	33,3264	43,167

Via da L-gulose										
TR_16773_c0_g1/PDE	XP_021646311.1	18,15126	17,18112	20,17648	19,2298	22,83546	26,43525	26,3917	35,35275	41,13421
TR_10804_c0_g1/GulLO	XP_002516554.1	1,212972	1,07382	1,77890	1,69800	1,76894	2,9828	1,01977	2,4574	19,56944
TR_13774_c0_g1/GulLO	XP_002520499.1	0,47652	0,23343	0,1404	0,08490	0,08040	0,03725	0,28553	0,94848	17,07530
Via do mio-inositol										
TR_17505_c0_g2/IMP	XP_018850821.1	36,1292	35,7628	48,4516	43,8084	68,064	85,0849	382,9452	440,0124	577,0301
TR_11140_c0_g1/MIOX	XP_012069048.1	7,5810	5,3691	0,6085	0,7641	2,3317	7,5316	1,4684	1,5089	2,2255
TR_11140_c0_g2/MIOX	XP_021660216.1	0,90972	0,93375	1,21714	1,14615	1,1256	0,3728	0,4487	1,0347	7,3289
TR_15591_c0_g1/MIOX	XP_021670771.1	11,6965	7,1432	0,4213	0,84900	0,2412	0,1118	49,397	53,9776	41,940
Via do D-galacturonato										
TR_13095_c2_g7/GAE	XP_012083592.1	45,1399	43,6064	36,3270	28,3566	39,1982	37,5835	19,2125	30,6534	24,2123
TR_16925_c1_g3/GAE	XP_019447194.1	0,0866	0,1400	0,8426	1,0612	3,5378	7,4943	1,0605	3,3197	3,8371
TR_13095_c2_g2/GAE	XP_021687074.1	9,4005	10,3647	13,9035	11,5039	12,1815	11,1482	1,5908	5,43225	7,2522
TR_13095_c1_g2/GAE	XP_021667722.1	0,51984	0,3735	0,6553	0,2547	1,0050	1,8642	4,7725	9,2262	84,8009
TR_13095_c1_g1/GAE	XP_021667722.1	1,4295	0,9804	1,4512	0,9763	3,1760	2,5726	10,564	22,893	64,886
TR_14589_c0_g2/GAE	XP_015887286.1	4,4186	4,3886	3,3705	3,4384	2,0905	2,535	0,3671	15,822	9,4777
TR_13095_c2_g3/GAE	XP_021653732.1	216,9487	266,7743	103,5976	119,2422	98,8196	126,2852	11,7885	50,7441	234,1427
TR_16461_c0_g1/GAULT	XP_012082218.1	73,6880	82,2639	133,6985	134,0148	198,9258	262,4137	41,85149	43,3717	63,9652
TR_15764_c0_g1/GAULT	XP_021674872.1	36,5624	40,0114	40,0252	51,4070	42,3340	26,3234	14,03207	19,6595	29,9681
TR_14211_c0_g1/GAULT	XP_002525229.1	25,6023	29,1332	27,6666	22,838	29,1473	34,4515	76,9724	95,3661	37,6424
TR_11800_c0_g1/GAULT	XP_021632808.1	35,21951	40,0114	45,7833	46,4403	57,04846	63,012	28,2681	41,9059	61,8548
TR_18448_c0_g1/GAULT	XP_021825613.1	56,5764	67,1838	83,4211	79,6363	125,9971	102,3107	93,4112	87,26095	52,10845
TR_18448_c0_g4/GAULT	XP_021654502.1	75,1609	90,6211	100,4611	104,4696	103,6842	137,5826	94,3494	110,326	85,5300

TR_12582_c0_g1/GAULT	XP_021684317.1	22,2667	24,4177	40,7742	43,4688	40,9269	41,2375	10,6056	18,4524	12,5858
TR_12582_c0_g3/GAULT	XP_021685747.1	3,5089	5,3224	7,0687	6,5797	8,8045	9,9924	7,0568	10,347	6,7533
TR_15576_c1_g1/GAULT	XP_002520989.1	4,4186	5,4157	6,7879	7,0042	9,8900	11,0364	9,7898	7,3292	25,785
TR_9845_c0_g1/GAULT	XP_021688729.1	23,5663	26,9855	25,2323	27,2104	28,6649	31,5060	10,4832	19,2284	21,0275
TR_11191_c0_g1/GAULT	XP_021903701.1	22,6132	24,4644	20,0360	20,5033	20,5840	23,04229	20,3138	21,1685	22,217
TR_16515_c2_g2/GAULT	XP_021685127.1	2,3826	2,8946	2,71516	2,03760	2,5328	3,3183	31,4905	38,9742	18,9171
TR_9845_c0_g1/GAULT	XP_021688729.1	23,5663	26,9855	25,2323	27,2104	28,6649	31,5060	10,4832	19,2284	21,0275
TR_15764_c0_g4/GAULT	XP_021674872.1	9,61713	10,1311	14,5120	16,6404	17,36782	18,2697	11,8293	13,4081	15,0799
TR_15004_c1_g2/GAULT	XP_015898118.1	58,0060	62,2349	54,0224	63,6326	99,663	95,4130	62,69565	76,82757	94,54730
TR_14561_c0_g1/PME	XP_011036546.1	98,1641	100,7990	102,1464	90,3762	89,5327	110,1406	15,2965	18,2799	21,526
TR_17260_c0_g1/PMEI	XP_021641963.1	3,7255	2,80125	4,0727	5,3062	0,5226	0,5219	1,2237	11,7698	4,1057
TR_15138_c0_g3/PME	XP_021687752.1	4,2020	4,5754	1,91934	1,95270	1,4875	0,7084	0,40790	1,1640	0,5755
TR_15678_c3_g2/PME	XP_011015915.1	1,3429	0,60694	0,14043	0,25470	0,20101	0,1118	0,5302	4,8286	4,1441
TR_3292_c0_g1/PMEI	XP_011005053.1	1,99274	1,6340	1,1703	0,84900	1,24630	4,0640	2,40666	4,699	20,145
TR_15525_c0_g1/PME	EEF51542.1	3,3789	5,46247	5,6175	6,4524	5,74907	5,48093	5,6699	4,914	3,1848
TR_15138_c0_g1/PME	EEF34592.1	0,04337	0,0466	0,0936	0	0	0	108,2999	89,9770	101,6076
TR_17260_c0_g2/PMEI	XP_021637412.1	0,9097	1,21388	0,23406	0,29715	0,16081	0,11185	3,3040	8,4501	9,5928
TR_14941_c0_g3/PME	EEF43910.1	0	0	0	0	0	0	0,77502	8,5795	22,9077
TR_18103_c1_g5/PME	XP_021639441.1	1,81945	3,2681	42,7404	57,6896	192,091	324,3073	0,1223	1,7245	3,1080
TR_18103_c1_g7/PME	EOY30121.1	0,47652	0,98044	2,2470	3,862	9,4879	13,012	0,897	4,74244	15,8090
TR_15034_c2_g1/PME	XP_018850544.1	54,540	58,45319	141,7971	134,396	184,3320	219,7593	0,1631	1,1640	51,8782
TR_16996_c1_g3/PME	XP_002304257.2	41,67426	45,00708	15,16747	13,2444	39,6806	63,4595	0,7750	4,35442	251,2563
TR_16996_c1_g6/PME	XP_021628800.1	26,94531	26,2852	8,94132	7,8108	20,3830	24,9811	0,2039	1,1640	133,1490

TR_12269_c0_g1/PG	XP_021673211.1	3,03243	2,75458	547,8548	574,8589	1005,001	1530,448	0,12237	0,21556	124,6689
TR_12269_c0_g2/PG	XP_011020366.1	0,1299	0,0466	0	0,0849	0	0	0	0	9,8998
TR_10842_c0_g1/PG	XP_011025443.1	12,8661	14,8467	11,0947	10,4851	7,96025	7,3451	19,498	18,409	29,162
TR_14016_c2_g1/PG	XP_021672763.1	4,46200	3,96846	8,520	5,985	19,2975	20,0594	3,6711	3,88018	6,44640
TR_10041_c0_g1/PG	XP_021293467.1	3,11907	4,24859	4,0259	6,1552	5,6686	5,7792	5,34361	8,01904	6,79175
TR_15351_c0_g1/PG	XP_021612587.1	0	0	0	0	0	0	0	0	2,64763
TR_15539_c0_g1/PG	XP_021642925.1	0,04332	0	0	0	0	0	0	0,0431	46,1225
TR_17731_c2_g1/GalUR	XP_021685965.1	0,1732	0,0466	0,0468	0,0424	0	0	102,4668	54,7105	3,0697
TR_17731_c2_g5/GalUR	XP_021685967.1	1,25629	1,4940	0,6553	0,5094	0,0402	0,1118	2,8145	1,681	5,9475
TR_17731_c2_g2/GalUR	XP_021685965.1	8,92401	10,784	8,1454	8,7871	11,4177	10,2161	107,2801	108,0414	42,1318
TR_13829_c1_g2/GalUR	XP_002521902.2	45,5297	46,3610	65,9129	58,5386	38,9569	45,7490	1,42768	0,6035	82,0765
TR_17731_c2_g4/GalUR	XP_021652219.1	113,9327	132,7802	166,1400	174,5547	141,3145	117,5231	0,9789	0,99160	11,2428
TR_16079_c0_g2/GalUR	XP_021652219.1	0	0	0	0	0,0402	0	0,5302	0,6035	2,0336
TR_16502_c0_g1/GalUR	XP_021619253.1	8,23088	9,5710	9,8307	8,70226	10,0508	15,13782	523,3883	256,0488	86,2206
TR_16502_c0_g2/GalUR	XP_017439893.1	30,324	34,5956	26,870	28,950	29,4690	31,506	9,4227	10,7351	23,7135
Via de reciclagem										
TR_15865_c3_g3/MDHAR	XP_021640622.1	139,3185	145,6194	113,2879	118,7753	121,0521	143,2127	269,0569	253,8500	610,8354
TR_16854_c0_g1/MDHAR	BAJ23958.1	207,6348	248,4260	250,8251	255,5494	246,4059	226,0233	367,9749	338,4379	612,2168
TR_16821_c0_g4/MDHAR	XP_021648667.1	52,2011	66,5768	111,0409	95,8947	131,0627	119,6111	107,0761	128,7788	62,5071
TR_16451_c0_g1/MDHAR	XP_012086827.1	70,0491	81,7971	91,3793	90,84315	96,32708	90,04393	187,2303	161,6310	95,00776
TR_16821_c0_g2/MDHAR	XP_021648666.1	36,2592	39,7780	15,5419	16,0036	9,1663	10,8127	240,7072	247,2106	16,30787
TR_13219_c0_g3/DHAR	BAJ23959.1	234,1036	250,9472	192,5895	186,4407	66,8178	43,7729	367,1183	429,7515	307,969
TR_13219_c0_g6/DHAR	BAJ23959.1	4,63528	3,6883	4,2600	3,6082	3,2564	2,8336	8,32134	6,2082	7,36732

TR_17254_c0_g1/DHAR	XP_021593992.1	59,3490	66,53018	78,5057	65,03357	86,6380	80,6853	147,1328	148,7402	38,21798
Via de degradação										
TR_9063_c0_g1/APX	XP_021638321.1	76,0706	50,656	65,5852	64,9061	209,2581	257,6039	1,3053	2,2418	2,6476
TR_15395_c1_g1/APX	XP_007205775.1	696,072	656,011	618,2619	583,8158	602,8885	548,3172	778,4132	636,1771	412,2630
TR_7299_c0_g1/APX	XP_020875263.1	0,04332	0,09337	0	0,04245	0	0	4,3238	5,5615	14,6579
TR_14854_c3_g1/APX	XP_016691379.1	166,5237	199,07699	194,3215	218,278	242,5464	237,1716	233,4872	194,871	176,623
TR_17883_c4_g1/APX	XP_021663854.1	25,16917	30,9073	39,323	40,6247	40,5651	44,9287	35,8552	24,1864	40,4819
TR_15465_c0_g1/APX	XP_021663854.1	13,2127	15,2669	11,3287	11,376	3,8997	3,16924	19,9059	25,997	1,5732
TR_17883_c4_g3/APX	XP_015575411.1	6,23814	6,16279	5,10263	4,2450	1,6081	1,4168	6,0370	10,0884	0,7674
TR_15644_c1_g1/APX	XP_012067914.2	25,25581	29,4133	27,338	25,639	26,011	28,3740	79,950	94,3746	27,4739
TR_15742_c1_g1/APX	XP_012076559.1	14,9022	15,7804	15,5887	16,5555	13,8701	14,1684	58,16786	61,60864	14,3509
TR_17961_c0_g2/AO	AMN88404.1	151,3616	160,886	176,9538	236,91386	189,5987	251,3773	4,894	8,2346	128,0839
TR_10939_c0_g1/AO	XP_011039545.1	0,69312	0,3735	1,4043	2,3772	0,6834	3,6912	0,1223	0,04311	0,42289
TR_14310_c0_g1/AO	EEF33963.1	0,7797	0,6536	2,66835	4,0752	15,5184	56,077	0,04079	3,1903	64,7326
TR_14310_c1_g2/AO	XP_021668021.1	1,2129	1,02713	0,2808	0,3820	0,5226	1,0067	0,5710	4,4406	11,7032
TR_14310_c0_g3/AO	XP_021660974.1	0	0	0	0	0	0	0,0407	0,646	4,75806
TR_7076_c0_g1/AO	XP_021683877.1	0,0866	0,04668	0,3276	0,2971	0,52264	0,63384	37,4868	22,8930	7,8277
TR_9470_c0_g2/AO	XP_021675200.1	0,90972	0,3268	0,1404	0,38205	0,0804	0,1118	0,0815	3,880	22,370
TR_9470_c0_g1/AO	XP_021646093.1	0,21660	0,04668	1,54483	1,9951	7,3169	10,365	0,122	1,5520	5,026
TR_11794_c0_g1/AO	XP_021687448.1	0,08664	0,14006	0,0465	0	0	0,07459	0,73426	1,55201	7,5208
TR_12121_c0_g1/AO	XP_021641359.1	4,3320	3,31483	1,2639	2,54703	1,2060	2,0506	0,122	3,449	19,108
TR_13937_c0_g1/AO	XP_002299087.1	5,4150	5,55585	5,19626	4,4148	3,2564	2,9082	30,674	29,661	33,805
TR_13937_c0_g5/AO	XP_011025085.1	0	0	0	0	0,04020	0	0	0	2,1871

TR_13937_c0_g2/AO	XP_002299087.1	0	0,093371	0,04681	0	0	0,0372	0,08158	0,3880	419,093
TR_13937_c0_g3/AO	XP_021692466.1	0,04332	0	0	0,042450	0,0402	0	0,04079	0,0431	178,6191
Translocação										
TR_15671_c0_g3/NAT	XP_021642779.1	54,2805	61,8614	39,9316	43,5962	16,0813	16,7410	69,9156	68,5929	44,0504
TR_14495_c0_g1/ NAT	XP_021662815.1	2,5559	3,59496	2,90241	3,311	6,5531	7,49433	0,61186	1,0347	4,33597
TR_8307_c0_g1/ NAT	XP_021660124.1	0,56316	0,7470	0,6085	0,89145	0,44223	0,41013	0,77502	1,6814	17,7276
TR_16344_c0_g1/ NAT	KHG14639.1	82,61208	86,8394	64,0872	54,8030	50,2943	93,3996	89,6584	79,7592	119,3736
TR_17143_c0_g3/ NAT	XP_021663388.1	6,4547	6,2561	5,8048	2,5045	2,73382	2,5353	0,6118	1,37961	0,8441
TR_16344_c0_g3/ NAT	XP_021674512.1	21,1836	17,928	9,64351	10,230	4,5027	4,7352	17,9887	26,2558	19,185
TR_16344_c0_g2/ NAT	XP_011044342.1	60,215	56,7724	31,5520	33,4931	14,754	15,69709	66,366	100,3242	58,9002
TR_10998_c0_g1/ NAT	XP_021635851.1	0,08665	0	0	0,0849	0,08040	0,0372	3,46722	6,25140	10,1300
TR_18015_c0_g3/ NAT	XP_002533955.1	15,898	15,967	15,307	13,0321	10,57346	10,4398	4,52779	10,3905	10,3219
TR_12849_c0_g1/ NAT	XP_021636889.1	9,6171	8,8706	19,80191	15,87637	10,8548	13,3481	43,564	38,0686	11,856

Fonte: elaborada pelo autor.