



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

THAIS ANDRADE GERMANO

**ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DE PEDÚNCULOS DE CAJU (*Anacardium
occidentale* L.) DURANTE O DESENVOLVIMENTO EM GENÓTIPOS
APRESENTANDO CORES E FIRMEZAS DIFERENTES**

FORTALEZA
2020

THAIS ANDRADE GERMANO

ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DE PEDÚNCULOS DE CAJU (*Anacardium occidentale*
L.) DURANTE O DESENVOLVIMENTO EM GENÓTIPOS APRESENTANDO CORES E
FIRMEZAS DIFERENTES

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: Dr. José Hélio Costa

FORTALEZA

2020

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)

- G323a Germano, Thais Andrade.
Análise transcriptômica de pedúnculos de caju (*Anacardium occidentale* L.) durante o desenvolvimento em genótipos apresentando cores e firmeza diferentes / Thais Andrade Germano. – 2020.
86 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Jose Helio Costa.
1. Pedúnculo. 2. Antocianinas. 3. Ontologia gênica. 4. Expressão diferencial. 5. Poligalacturonase. I. Título.

CDD 572

THAIS ANDRADE GERMANO

ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DE PEDÚNCULOS DE CAJU (*Anacardium occidentale*
L.) DURANTE O DESENVOLVIMENTO EM GENÓTIPOS APRESENTANDO CORES E
FIRMEZAS DIFERENTES

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: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Dra. Maria Raquel Alcântara de Miranda
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Vânia Marilande Ceccatto
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dra. Mônica Maria Almeida Lopes
Instituto Centro de Ensino Tecnológico (Centec)

Dr. Mohibullhah Shah
Bahauddin Zakariya University

Dr. Vinicius Augusto Carvalho de Abreu
Universidade Federal do Pará (UFPA)

A Deus.

Aos meus pais, Simone e Ernani.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos durante o período do doutorado;

Ao CNPq, pelo suporte financeiro para realização do sequenciamento do transcriptoma de caju;

À Universidade Federal do Ceará, por toda minha formação acadêmica desde a graduação até o doutorado.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica, incluindo professores, funcionários e estudantes.

À EMBRAPA Agroindústria Tropical, por ter cedido os cajus para a realização do experimento, além de transporte para o campo experimental em Pacajus;

Ao Dr. José Hélio Costa, pela excelente orientação, apoio constante, incentivos e amizade. Sou muito grata por todos os conselhos e ensinamentos;

Ao Dr. Carlos Farley Herbster Moura, pelos relevantes ensinamentos sobre a fisiologia do caju, além da excelente orientação sobre a colheita dos mesmos;

À Dra. Maria Raquel Alcântara de Miranda, por ter me apresentado o mundo científico e contribuído na construção do alicerce para a minha caminhada durante o doutorado;

Aos participantes da banca examinadora, Dra. Vânia Marilande Ceccatto, Dra. Mônica Maria Almeida Lopes, Dr. Mohibullhah Shah e Dr. Vinicius Augusto Carvalho de Abreu pelas valiosas colaborações e sugestões;

Ao Matheus Finger Ramos de Oliveira, pelo apoio constante e dedicação durante a execução de todo o experimento, principalmente, nas análises de bioinformática;

Ao Clesivan Pereira dos Santos, por todas as orientações, contribuições e reflexões desde os primórdios até a conclusão do trabalho;

Ao Antonio Edson Rocha Oliveira, por todos conselhos, conversas e conhecimento compartilhado sobre bioinformática e escrita científica, principalmente;

À minha família, pelo apoio emocional e motivação que sempre me proporcionaram, não só ao longo deste doutorado como ao longo de toda a minha vida, além de serem exemplos de determinação, persistência e integridade;

Ao meu namorado e amigo Magnum Maciel, por toda compreensão, cumplicidade, motivação e paciência em todos os momentos;

Aos amigos do Laboratório de Genômica Funcional da UFC (André Luiz, Antônio Netto, Beatriz Lima, Dayane Manfrine, Karine Thiers, Lyndefânia Melo, Mathias

Coelho, Moacária Lemos, Rachel Alves, Susan Karen e Talita Batista) pela ótima convivência, presteza e disposição para ajudar sempre. Em especial, agradeço ao Shahid Aziz, pelo empenho na revisão do artigo científico, e à Kátia Daniella da Cruz Saraiva, pela disponibilidade e essencial orientação nas análises de PCR em tempo real. A todos eles, meu sincero obrigada pelo carinho que sempre demonstraram;

Aos amigos, pela troca de ideias, experiências, incentivo e compreensão;

À Dra. Maria Izabel Gallão, pela ótima recepção e confiança, além de permitir a execução de testes envolvendo a microscopia óptica em pedúnculos de caju. Eu me sinto sempre bem acolhida em seu laboratório;

Ao Marcos Aurélio Nunes da Silva Filho, pelo auxílio com a documentação necessária para o envio de amostras para sequenciamento do transcriptoma;

Aos colaboradores do campo experimental da EMBRAPA em Pacajus, em especial, ao Justino, pela atenção, paciência e auxílio durante a colheita dos cajus;

Aos integrantes do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia da UFC coordenado pela Dra. Vânia Maria Maciel Melo, especialmente às Dra. Mirella Leite Pereira e a Dra. Francisca Andrea da Silva Oliveira pela disponibilidade e presteza;

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Vegetal e do Laboratório de Pós-colheita dos Frutos da UFC, pela boa vontade em colaborar com a realização do experimento;

À todos que contribuíram de forma direta ou indireta para o desenvolvimento desse trabalho.

“A sabedoria começa na reflexão.”

Sócrates

RESUMO

O pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale* L.) apresenta grande importância econômica e social mundialmente, devido ao seu alto valor nutricional, além de sabor e aroma peculiares. Durante o seu amadurecimento, o pedúnculo apresenta rápida redução na firmeza e desenvolvimento de diferentes colorações da película, impactando na qualidade e aceitação dos pseudofrutos pelos consumidores. Embora muitos estudos discorram sobre a firmeza e coloração dos pedúnculos de caju, ainda são desconhecidos os mecanismos moleculares envolvidos nas alterações dessas características durante o desenvolvimento do fruto. Portanto, o objetivo desse estudo foi analisar o transcriptoma de pedúnculos de dois genótipos de caju (CCP 76 e BRS 265) com diferentes firmeza e coloração em dois estádios de desenvolvimento (imaturo e maduro), utilizando a técnica de RNA-Seq (sequenciamento do RNA). A partir dos resultados foi possível observar que a firmeza e o conteúdo de antocianinas dos pedúnculos reduziram durante o desenvolvimento de ambos os genótipos. Entretanto, os caju BRS 265 imaturo e maduro apresentaram maior firmeza e maior conteúdo de antocianinas do que o CCP 76 nos mesmos estádios de maturação. A análise de expressão diferencial revelou um total de 3.266 genes diferencialmente expressos (GDEs) entre caju BRS 265 imaturo e maduro, enquanto entre CCP 76 imaturo e maduro foram identificados 4.374 GDEs. Posteriormente, as análises de enriquecimento funcional dos GDEs demonstraram que os genótipos apresentaram respostas, principalmente, aos processos de redução de firmeza (catabolismo e biogênese de macromoléculas da parede celular) e desenvolvimento de coloração da película (biossíntese de flavonóides e fenilalanina) dos pedúnculos. Um total de 71 e 34 GDEs envolvidos no processo de amaciamento e na biossíntese de flavonóides foram identificados em caju, respectivamente. No geral, a diferença de firmeza entre os genótipos estudados poderia ser justificada pela regulação negativa de genes codificantes de expansina (EXP), bem como pela regulação positiva de genes codificantes de enzimas envolvidas na degradação da pectina [poligalacturonase (PG), pectatoliase (PL) e pectina acetiltransferase (PAE)] e na biossíntese da parede celular em caju CCP 76 (genótipo de pedúnculo mais macio). Já a coloração vermelha da película e o alto conteúdo de antocianinas em caju BRS 265 ainda imaturos poderiam ser associados a regulação positiva de genes codificantes de enzimas envolvidas na biossíntese de flavonóides [fenilalanina amônia liase (PAL), cinamato 4-hidroxilase (C4H) e chalcona sintase (CHS)] em relação aos caju CCP 76 no mesmo estágio de maturação. Por fim, seis GDEs envolvidos nos metabolismos de interesse desse estudo (firmeza e flavonóides) tiveram o seu padrão

transcricional validado pela reação em cadeia da polimerase via transcrição reversa quantitativa em tempo real (RT-qPCR). As informações oriundas desse estudo poderão fornecer subsídios para pesquisas futuras, visando a extensão da vida pós-colheita, bem como a qualidade de caju, agregando valor econômico a esse fruto.

Palavras-chave: Pedúnculo. Antocianinas. Ontologia gênica. Expressão diferencial. Poligalacturonase.

ABSTRACT

The cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) has great economic and social importance worldwide, due to its high nutritional value, in addition to its peculiar flavor and aroma. During its maturation, the peduncle shows a fast firmness reduction and development of different peel coloration, impacting the quality and acceptance of pseudofruit by consumers. Although many studies discuss about the firmness and color of the peduncles, the molecular mechanisms involved in the alterations of these characteristics during cashew development are still unknown. Therefore, the aim of this study was to analyze the peduncle transcriptome of two cashew apple genotypes (CCP 76 and BRS 265) with different firmness and color in two developmental stages (immature and mature), using the RNA-Seq technique (RNA sequencing). From the results, it was possible to observe reduced firmness and anthocyanin content in the peduncles during the development of both genotypes. However, the immature and mature BRS 265 cashew apples showed greater firmness and higher anthocyanin content than CCP 76 cashew apples at the same maturation stages. Differential expression analysis revealed a total of 3,266 differentially expressed genes (DEGs) between immature and mature BRS 265 cashew apples, while between immature and mature CCP 76 cashew apples, 4,374 DEGs were identified. Subsequently, the functional enrichment analysis of DEGs showed that the genotypes showed responses, mainly, to the softening process (catabolism and biogenesis of cell wall macromolecules) and development peel coloration (flavonoids and phenylalanine biosynthesis) of the peduncles. A total of 71 and 34 DEGs involved in the softening process and flavonoid biosynthesis were identified in cashew apple peduncle, respectively. In general, firmness difference between the studied genotypes could be justified by the down regulation of genes encoding expansin (EXP), as well as by the up regulation of genes encoding enzymes involved in the pectin degradation [polygalacturonase (PG), pectatoliase (PL) and pectin acetyltransferase (PAE)] and cell wall biosynthesis in CCP 76 cashew apple (softer peduncle). The red coloration peel and high anthocyanin content in immature BRS 265 cashew apple could be associated with the up regulation of genes encoding enzymes involved in the flavonoid biosynthesis [phenylalanine ammonia lyase (PAL), cinnamate-4-hydroxylase (C4H) and chalcone synthase (CHS)] compared to CCP 76 cashew apple at the same developmental stage. Finally, six DEGs involved in the metabolisms of interest in this study (firmness and flavonoids) had their transcriptional pattern validated by real time polymerase chain reaction (RT-qPCR). The information from this study may provide subsidies for future research, aiming at extending post-harvest life, as well as the quality of cashew apple

peduncle, adding economic value to this fruit.

Keywords: Peduncle. Anthocyanin. Gene ontology. Differential expression. Polygalacturonase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do caju	16
Figura 2 - Fases do desenvolvimento dos frutos: início da formação da polpa (1); término do crescimento em tamanho (2); início do período de consumo (3); período ótimo de consumo (4); predominância de reações catabólicas (5) e não utilizável para consumo (6)	19
Figura 3 - Escala subjetiva baseada na coloração externa do pedúnculo e da castanha para classificar os estádios de desenvolvimento do caju. Estádios: 1- castanha e pedúnculos verdes; 2- castanha madura e seca/ pedúnculo verde; 3- castanha madura e seca/ pedúnculo verde-claro; 4- castanha madura e seca, pedúnculo com início de coloração amarela (CCP 76) e laranja avermelhado (BRS 265); 5- castanha madura e seca/ pedúnculo amarelo com início de cor laranja (CCP 76) e laranja avermelhado com início de cor vermelha (BRS 265); 6- castanha madura e seca/pedúnculo laranja-claro (CCP 76) e vermelho-claro (BRS 265); 7- castanha madura e seca/ pedúnculo laranja-escuro (CCP 76) e vermelho-escuro (BRS 265)	22
Figura 4 - Estrutura da parede celular vegetal.....	23
Figura 5 - Mecanismo de ação das principais enzimas que atuam na degradação da pectina da parede celular. Pectinametilesterase (PME), pectina acetiltransferase (PAE), poligalacturonase (PG), pectatoliase (PL) ramnogalacturonanoliase (RGL) e β -galactosidase (β Gal)	24
Figura 6 - Estrutura química e representação das cores das principais antocianinas presentes na natureza.....	27
Figura 7 - Representação esquemática da via de biossíntese dos flavonóides	28
Figura 8 - Modelo da estrutura química do tanino condensado e de suas subunidades formadoras.....	30
Figura 9 - Número de sequências gênicas depositadas no <i>GenBank</i> e no <i>Whole Genome Sequencing</i> (WGS) desde 1982 até 2020.....	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	A cultura do cajueiro	16
2.1.1	<i>Importância socioeconômica</i>	16
2.1.2	<i>Desenvolvimento do pseudofruto</i>	18
2.1.2.1	<i>Firmeza</i>	22
2.1.2.2	<i>Coloração</i>	26
2.2	Abordagem transcriptômica aplicada a frutos	31
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo geral	34
3.2	Objetivos específicos	34
4	ARTIGO: TRANSCRIPTOME PROFILING OF CASHEW APPLES (<i>Anacardium occidentale</i> L.) GENOTYPES REVEALS SPECIFIC GENES LINKED TO FIRMNESS AND COLOR DURING PSEUDOFRUIT DEVELOPMENT	35
5	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS	78

1. INTRODUÇÃO

Fruto do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), o caju é constituído pela castanha (fruto verdadeiro) e pelo pseudofruto que é originado a partir do pedúnculo floral (MICHODJEHOUN-MESTRES *et al.*, 2009). A cultura do caju tem grande importância econômica e social para muitos países, principalmente, para o Brasil, mais especificamente para a região Nordeste, onde a cajucultura tornou-se atrativa e promissora devido às condições de clima e solo favoráveis do local (VIDAL, 2017; ICB, 2020). Além da importância comercial, o caju também tem se destacado devido aos avanços nas descobertas sobre as suas propriedades farmacológicas (CAVALCANTE *et al.*, 2003; KUBO *et al.*, 2003; BEEJMOHUN *et al.*, 2015; VASCONCELOS *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2020). Tal atividade biológica deve-se, principalmente, à capacidade antioxidante exercida pelos compostos bioativos presentes no mesmo, tais como vitamina C, polifenóis totais, flavonóides amarelos, carotenóides totais e antocianinas (LOPES *et al.*, 2012; SCHWEIGGERT *et al.*, 2016).

Os pedúnculos do caju podem ser utilizados na indústria, onde são processados para a fabricação de polpas, geléias, entre outros produtos; na alimentação animal e no consumo *in natura* (PROMMAJAK *et al.*, 2014). Embora, a maior parte da produção total de cajus seja destinada à comercialização *in natura*, os produtores de caju enfrentam grandes dificuldades ao enviar o pedúnculo a centros consumidores mais distantes (ASSUNÇÃO; MERCADANTE, 2003; MOURA *et al.*, 2010). A vida útil extremamente curta do pedúnculo, associada à rápida redução da firmeza resultam em perda da atratividade e da viabilidade para comercialização dos cajus.

Além da firmeza, a coloração da película possui fundamental importância na preferência do consumidor (CARIOCA *et al.*, 2003). Sua cor em cajus maduros pode variar do vermelho ao amarelo quando o caju está completamente desenvolvido. Recentemente SCHWEIGGERT *et al.* (2016) verificou que a coloração vermelha e alaranjada da película de alguns cajus tem sido atribuída, principalmente, ao conteúdo de antocianinas e carotenóides, respectivamente.

Durante o amadurecimento do caju, ocorre redução da firmeza e de adstringência, desenvolvimento de aroma e sabor típicos dos pedúnculos, além de mudança na cor da película (FIGUEIREDO *et al.*, 2002). Entretanto, o amaciamento do pedúnculo assim como o desenvolvimento da cor da película são processos influenciados pelo genótipo de caju. Pedúnculos do genótipo de caju BRS 265 apresentam película vermelha e polpa firme quando

maduros ao passo que pedúnculos de CCP 76 tornam-se mais macios e desenvolvem cor alaranjada na película (LOPES *et al.*, 2012).

No geral, a degradação da parede celular é considerada o principal fator responsável pelo amaciamento dos frutos (BRUMMELL, 2006). A despolimerização da matriz glicana e as modificações na pectina (solubilização e remoção de açúcares neutros das cadeias laterais) resultam na degradação da lamela média e, conseqüentemente, na reduzida adesão entre as células (PANIAGUA *et al.*, 2016). Já o acúmulo de antocianinas ocorre pela via de biossíntese dos flavonóides (JAAKOLA, 2013; LI, 2014). Além de cor, essa via produz alta quantidade de compostos antioxidantes (flavonóis) e relacionados com o sabor adstringente de caju (taninos condensados). Por fim, todas essas alterações decorrentes do amadurecimento envolvem a expressão coordenada de um grande conjunto de genes, justificando a necessidade de usar a abordagem transcriptômica para uma melhor compreensão desses metabolismos durante o desenvolvimento dos pedúnculos.

Apesar da importância socioeconômica e nutricional do caju, estudos moleculares com essa espécie ainda são escassos. E, embora muitos estudos discorram sobre a firmeza e o conteúdo de antocianinas em cajus (FIGUEIREDO *et al.*, 2001; LOPES *et al.*, 2011; SCHWEIGGERT *et al.*, 2016), ainda são desconhecidos os mecanismos moleculares que desencadeiam a redução da firmeza, além da transição para a coloração vermelha durante o amadurecimento desses frutos.

Portanto, neste estudo, a análise do transcriptoma associada à quantificação de antocianinas e firmeza objetiva fornecer a relação entre genótipo e fenótipo, destacando genes regulatórios envolvidos na cor e firmeza em pedúnculos durante o amadurecimento de caju. As informações oriundas desse estudo fornecerão uma base para estudos no campo da genômica funcional. Além disso, os genes selecionados serão importantes alvos de estudos posteriores para esclarecer sua real significância no controle dos metabolismos supracitados, resultando ao longo prazo, na melhoria da qualidade e na agregação de valor econômico aos frutos.

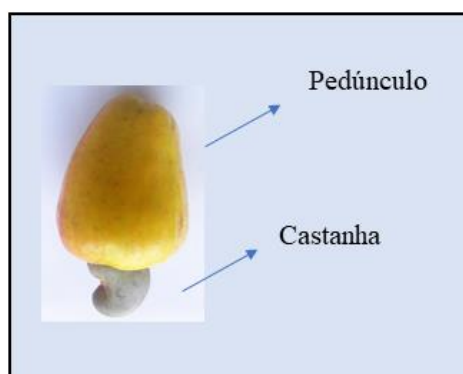
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura do cajueiro

2.1.1. Importância socioeconômica

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), planta nativa do Nordeste brasileiro, foi introduzido pelos portugueses na América (Central e Sul), no leste da África e mais tardiamente (século XV) na Índia, o que contribuiu para a dispersão dessa cultura (SAROJ *et al.*, 2014). O cajueiro pertence à ordem Sapindales e mais especificamente à família Anacardiaceae, a qual inclui a mangueira e o pistacheiro (SAVADI *et al.*, 2020). Seu verdadeiro fruto é a castanha, um aquênio seco e indeiscente, enquanto o pseudofruto é oriundo do desenvolvimento do pedúnculo floral, tecido fibroso coberto por uma fina epiderme que sustenta o fruto verdadeiro (figura 1) (MICHODJEHOUN-MESTRES *et al.*, 2009).

Figura 1 – Estrutura do caju.



Fonte: autor.

A cultura do cajueiro é a segunda mais importante na produção de castanhas mundialmente, apresentando crescente interesse econômico (SAVADI *et al.*, 2020). Em 2018, o Vietnã, a Índia e a Costa do Marfim foram os maiores produtores de castanha de caju, totalizando 4 milhões de toneladas. Atualmente, o Brasil é nono maior produtor de castanha com produção de 141 mil toneladas por ano (FAOSTAT, 2018). Esse fato pode ser justificado pela ocorrência da seca que castigou o semiárido brasileiro de 2012 a 2017, causando a redução no total de área colhida de cajus no país (VIDAL, 2017).

No entanto, a cajucultura tem grande importância econômica para o Brasil. Em 2019, foram produzidas 139 mil toneladas de castanha em 428 mil hectares de área colhida no país (IBGE, 2019). Ainda em 2019, o Nordeste, somente, foi o responsável por 99,1 % da produção nacional, sendo os estados Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte os principais produtores, ocupando 99,7 % da área cultivada com caju no país (IBGE, 2019). Além disso, essa cultura possui alta importância socioeconômica, pois é uma fonte de renda e gera empregos diretos e indiretos principalmente no Nordeste brasileiro (VIDAL, 2017).

Apesar da castanha representar apenas 10 % do peso total do caju, ela é o principal produto explorado por esse cultivo, enquanto muitos pedúnculos são desperdiçados (ALBUQUERQUE, 2011). No campo, a maioria dos produtores considera o pedúnculo um subproduto da castanha, sendo grande quantidade descartada ou deixada no próprio solo depois da remoção da castanha. Estima-se que 10 a 15 toneladas de pedúnculos de caju são produzidas como coproduto para cada tonelada de castanha de caju (TALASILIA; SHAIK, 2015).

Mesmo com grandes perdas no aproveitamento do pedúnculo de caju, ele apresenta alto valor comercial, sendo vastamente utilizado na indústria e no consumo *in natura*. Na indústria, estima-se que 10 % da produção total de pedúnculos são processados para a fabricação de polpas, geleias, doces, sucos, cajuínas e outros alimentos, bem como aproveitados para a alimentação animal (PROMMAJAK *et al.*, 2014). Entretanto, a maior parte da produção total de pedúnculos (90 %) são destinados à comercialização *in natura* em feiras e supermercados, principalmente, aqueles próximos à região produtora (ASSUNÇÃO; MERCADANTE, 2003).

O consumo do pedúnculo de caju é bastante apreciado devido ao seu aroma e sabor peculiares, sendo vastamente aceito pelos consumidores. Além disso, o caju tem se destacado devido aos avanços nas descobertas sobre as propriedades farmacológicas, como atividade antimicrobiana e antimutagênica, ação anti-inflamatória e prevenção da obesidade e diabetes (CAVALCANTE *et al.*, 2003; KUBO *et al.*, 2003; BEEJMOHUN *et al.*, 2015; VASCONCELOS *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2020). Tal atividade biológica deve-se, principalmente, pela capacidade antioxidante exercida pelos compostos bioativos presentes no caju. Quando maduro, o pedúnculo é rico em vitamina C (279,37 mg.100 g⁻¹ de massa fresca - MF), polifenóis totais (69,51 mg.100 g⁻¹ MF) e flavonóides amarelos (50,75 mg.100 g⁻¹ MF), e em menor quantidade, carotenóides totais e antocianinas (5,27 e 21,16 mg.100 g⁻¹ MF, respectivamente) (LOPES *et al.*, 2012; SCHWEIGGERT *et al.*, 2016).

Entretanto, uma das grandes dificuldades enfrentadas pelos produtores de caju que

visam o envio do pedúnculo a centros consumidores mais distantes é a vida útil extremamente curta do mesmo (MOURA *et al.*, 2010). Após o período de 48 horas armazenado em temperatura ambiente, o pedúnculo do caju apresenta-se enrugado, fermenta e, conseqüentemente, perde sua atratividade e viabilidade para o comércio (FIGUEIREDO *et al.*, 2002). Essa curta vida útil deve-se, principalmente, à estrutura delicada associada à rápida perda de firmeza do pedúnculo (MOURA *et al.*, 2010). A película frágil e a reduzida firmeza fazem com que o pseudofruto seja sensível a danos mecânicos, exigindo estratégias especiais durante o transporte do mesmo (BARRETO *et al.*, 2007). Além disso, a ocorrência de injúrias físicas na película atrelada à umidade favorável (85 – 90 %) e ao alto conteúdo de açúcar (55 – 65 %) torna os pedúnculos propensos à rápida deterioração microbiana (SIVAGURUNATHAN *et al.*, 2010). Apesar dos cuidados, substanciais perdas econômicas têm ocorrido durante o transporte dos pseudofrutos, elevando os custos para os consumidores.

Tendo em vista que o pedúnculo de caju é rico em fitoquímicos e nutrientes essenciais para a saúde humana e possui um grande potencial na indústria de alimentos, faz-se necessária uma compreensão acerca do desenvolvimento desse fruto. Portanto, estudos sobre a regulação transcricional no caju poderão auxiliar no melhoramento genético de pedúnculos com maior vida útil e atratividade para consumo.

2.1.2. Desenvolvimento do pseudofruto

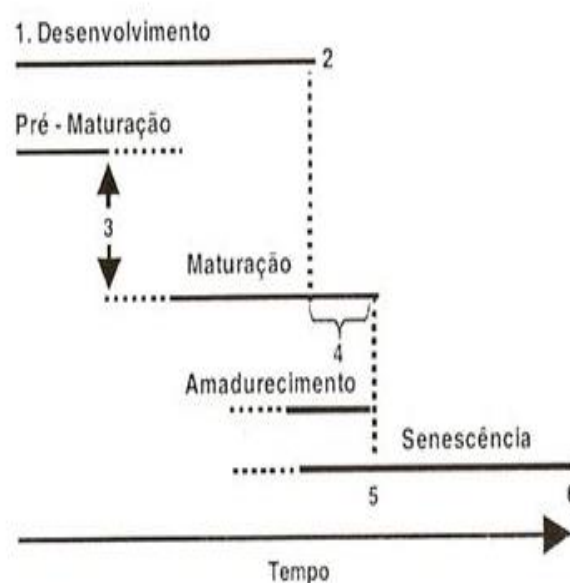
O cajueiro (genoma diploide $2n = 42$) é uma planta perene, de porte médio e ramificação baixa, sendo classificada como andromonóica, ou seja, o sistema reprodutivo é constituído por flores masculinas (estaminadas) e hermafroditas (ALIYU; AWOPETU, 2007; SOUSA *et al.*, 2007). Essa classificação somada a estrutura diferenciada da flor hermafrodita (com o estigma situando-se em posição superior aos estames) consistem em características que podem explicar muito do comportamento produtivo dessa planta (BARROS, 2011). Como o cajueiro é uma espécie de fecundação cruzada (alógama), os pomares apresentam alta heterogeneidade, tanto em relação aos aspectos vegetativos (altura, copa e folhas) quanto aos aspectos produtivos (características dos frutos e produção) (VIDAL *et al.*, 2013). A diversidade de plantas do cajueiro tem sido agrupada em dois tipos: o comum e o anão precoce, os quais diferem em estatura da planta, início do florescimento e produtividade de frutos.

O melhoramento genético do cajueiro na década de 1950 é considerado um marco na cajucultura, principalmente para pesquisas visando o aproveitamento do pedúnculo

(QUEIROZ *et al.*, 2012). Como um resultado do melhoramento, várias cultivares de cajueiro com maiores níveis de produção frutífera têm sido desenvolvidas (SAVADI *et al.*, 2020). Além disso, a baixa estatura dessa planta permite que o caju seja colhido manualmente, resultando em pedúnculos íntegros e de boa qualidade sanitária. Outro fator essencial para a obtenção de pedúnculos de qualidade é realizar a colheita dos caju no correto estágio de maturação/desenvolvimento dos mesmos.

No geral, o desenvolvimento de um fruto é dado por eventos que ocorrem desde o estabelecimento do mesmo até o amadurecimento, o qual é seguido pela senescência, processo predominantemente degradativo e irreversível que resulta na morte dos tecidos (figura 2) (RYALL; LIPTON, 1979). Durante o crescimento do fruto, ocorre a divisão e o alongamento/expansão celular, além da diferenciação dos tecidos. Quando o fruto atinge o seu tamanho máximo, ativa-se o processo de amadurecimento, caracterizado por uma sequência de mudanças bioquímicas, fisiológicas e estruturais dos frutos, conduzindo a um estado que os torna comestíveis (CHITARRA; CHITARRA, 2005). A senescência corresponde a um processo predominantemente degradativo e irreversível, resultando na morte dos tecidos (WATADA *et al.*, 1984).

Figura 2 – Fases do desenvolvimento dos frutos: início da formação da polpa (1); término do crescimento em tamanho (2); início do período de consumo (3); período ótimo de consumo (4); predominância de reações catabólicas (5) e não utilizável para consumo (6).



Fonte: Ryall; Lipton, 1979.

Em caju, o desenvolvimento da castanha e do pedúnculo começa após a fecundação da flor. Inicialmente, observa-se o crescimento rápido e uniforme do aquênio, até atingir seu tamanho máximo entre 30 e 36 dias após a antese (DAA). A partir desse ponto, a massa da castanha decresce (aproximadamente 15 %) e a casca endurece, ocorrendo simultaneamente ao processo de desenvolvimento e amadurecimento do pedúnculo que se encerra entre 56 e 60 DAA, sendo 52 DAA para o cajueiro do tipo anão precoce (BARROS, 2011). Inversamente a castanha, o crescimento do pedúnculo é muito lento nos estádios iniciais e rápido depois que a castanha atinge de 73 a 77 % do seu tamanho máximo. Nessa etapa, ocorre a obstrução do hilo (feixe vascular que conecta o aquênio ao pedicelo) e, conseqüentemente, os fotoassimilados produzidos, posteriormente, pela planta ficam retidos no pedúnculo, havendo o acúmulo dessas substâncias e o conseqüente aumento da massa do pedúnculo (MICHODJEHOUN-MESTRES *et al.*, 2009). É interessante observar que até a quarta semana de desenvolvimento do caju, a castanha torna-se maior do que o pseudofruto. Após a maturação, não obstante a grande variação da relação peso da castanha/pedúnculo, a castanha representa de 8 a 12 % do peso total do caju.

O processo de amadurecimento dos frutos é controlado por vários hormônios vegetais. Dentre eles, destaca-se o etileno, que desempenha papel central nas mudanças fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante o amadurecimento dos frutos climatéricos (PORAT *et al.*, 2009). Com base na biossíntese desse hormônio e no comportamento respiratório, os frutos são classificados como climatéricos ou não-climatéricos (TUCKER, 1993). Os frutos climatéricos apresentam um pico na produção de CO₂ e de etileno na fase climatérica, o que ativa o processo de amadurecimento (BIALE, 1964). De modo inverso, os frutos não-climatéricos apresentam um declínio gradual da respiração e baixa produção de etileno, permanecendo em níveis basais durante o amadurecimento (PORAT *et al.*, 2009). Em outras palavras, frutos climatéricos são capazes de amadurecer depois de colhidos ao passo que os não-climatéricos somente amadurecem na planta.

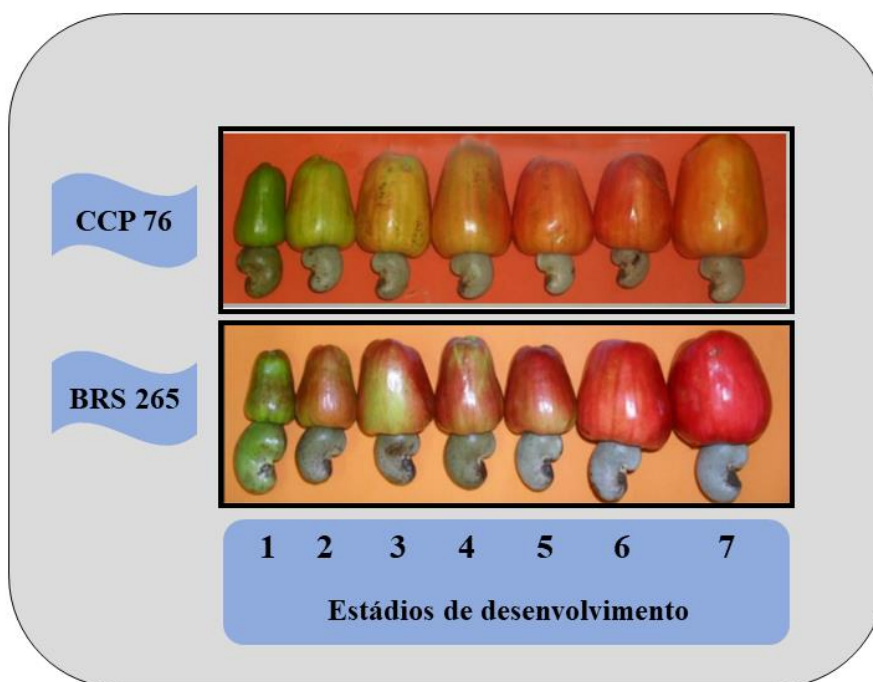
Apesar do caju apresentar uma alta taxa respiratória (62 a 72 mL Kg⁻¹ h⁻¹) a 20 °C, ele não é considerado um fruto climatérico (BIALE; BARCUS, 1967). De acordo com Pratt e Mendoza (1980), a produção de etileno é muito baixa e estável durante o amadurecimento desse fruto (200 a 400 ηL Kg⁻¹ h⁻¹). Por esse motivo, o caju necessita permanecer na planta até atingir completo amadurecimento, sendo a colheita realizada obrigatoriamente quando o pedúnculo estiver maduro, fase em que alcança a máxima qualidade para consumo (YAHIA, 2011).

No início do desenvolvimento, o pedúnculo do cajueiro apresenta coloração verde, muito adstringente (travo) e bastante firme, não atendendo às características organolépticas desejadas pelo consumidor. À medida que o pseudofruto amadurece, ocorre perda de firmeza e de adstringência; desenvolvimento de aroma e sabor típicos; aumento de peso e tamanho; além de mudança na coloração da película para vermelha, laranja ou amarela dependendo do genótipo (FILGUEIRAS *et al.*, 1999; YAHIA, 2011). Somado a essas alterações, o aumento gradual no teor de sólidos solúveis associado à redução da acidez no pedúnculo ao longo do seu desenvolvimento resulta em frutos com maior grau de doçura (FIGUEIREDO *et al.*, 2002).

O desenvolvimento do caju (usando os genótipos CCP 76 e o BRS 265) foi classificado em sete estádios de maturação de acordo com a coloração externa do pedúnculo e da castanha (figura 3) (LOPES *et al.*, 2012). No estágio 1, a castanha e o pedúnculo apresentam coloração verde. A partir do estágio 2, a castanha permanece madura e seca, apresentando pouca alteração, até o último estágio de maturação. Enquanto nesse mesmo período, as mudanças mais perceptíveis ocorrem com o pseudofruto, o qual sofre alterações físicas no seu tamanho e cor. O desenvolvimento da coloração do pedúnculo depende do genótipo, onde o caju CCP 76 e o BRS 265 apresentam cores laranja e vermelho quando maduros, respectivamente. Embora não descrito na escala, o pedúnculo do caju BRS 265 já apresenta traços de cor laranja avermelhado ainda no estágio 2 de maturação (figura 3). Tendo em vista esses fatores, o estudo comparando os pedúnculos colhidos nos estádios 2 e 7 (possuem características contrastantes) e de caju com diferentes cores de película (laranja e vermelho) fornecerá uma melhor visão sobre o desenvolvimento de cada genótipo.

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 (KNAPP; LITT, 2013). Além disso, todo esse complexo processo requer a síntese de novas proteínas e RNAs mensageiros (mRNAs) para atuarem nos diferentes metabolismos necessários à maturação dos frutos. Portanto, além de fornecer importantes informações sobre o desenvolvimento de pedúnculos de caju, o estudo transcriptômico desse pseudofruto pode auxiliar na compreensão acerca da regulação transcricional tanto em frutos não-verdadeiros como em frutos não-climatéricos durante o amadurecimento.

Figura 3 – Escala subjetiva baseada na coloração externa do pedúnculo e da castanha para classificar os estádios de desenvolvimento do caju. Estádios: 1- castanha e pedúnculos verdes; 2- castanha madura e seca/ pedúnculo verde; 3- castanha madura e seca/ pedúnculo verde-claro; 4- castanha madura e seca, pedúnculo com início de coloração amarela (CCP 76) e laranja avermelhado (BRS 265); 5- castanha madura e seca/ pedúnculo amarelo com início de cor laranja (CCP 76) e laranja avermelhado com início de cor vermelha (BRS 265); 6- castanha madura e seca/pedúnculo laranja-claro (CCP 76) e vermelho-claro (BRS 265); 7- castanha madura e seca/ pedúnculo laranja-escuro (CCP 76) e vermelho-escuro (BRS 265).



Fonte: [Lopes et al., 2012](#).

2.1.2.1. Firmeza

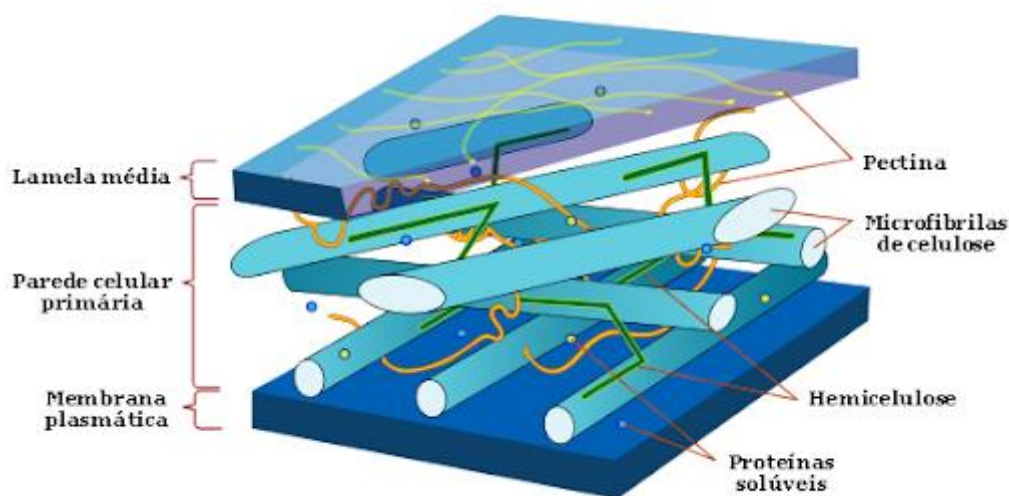
Entre todos os parâmetros de qualidade, a firmeza é o mais importante atributo, pois é utilizada como critério para determinação do valor comercial de frutos *in natura*, de maneira que ela se relaciona a qualidade nutritiva e sensorial, além de propiciar maior período de vida útil pós-colheita ([FIGUEIREDO et al., 2002](#)). A firmeza também influencia a transportabilidade do fruto e a taxa de infecção por microrganismos ([WANG et al., 2019](#)). Apesar de ser imprescindível que o fruto sofra redução na firmeza ao longo do amadurecimento para tornar-se mais palatável, o amaciamento excessivo traz prejuízo à qualidade.

Em caju, o amaciamento do pedúnculo ao longo do amadurecimento difere entre os genótipos. No caju CCP 76, foi verificada uma redução de aproximadamente 65 % na

firmeza dos pedúnculos (22,98 a 7,78 N) entre os estádios de maturação 2 (pseudofruto verde) e 7 (pseudofruto laranja) (LOPES *et al.*, 2011). Por outro lado, o caju BRS 265 apresenta um dos pedúnculos mais firmes ainda no estágio 2 (38,96 N) mantendo alta firmeza em pedúnculo maduro (14,48 N) quando comparado a outros genótipos (LOPES *et al.*, 2011).

No geral, a perda de firmeza durante o amadurecimento dos frutos tem sido atribuída, principalmente, às alterações nos componentes da parede celular que levam ao declínio da integridade do fruto (SEYMOUR *et al.*, 2013). Essa parede celular primária consiste em mistura complexa de polissacarídeos e derivados (celulose, hemicelulose e pectinas) e uma pequena quantidade de proteínas, secretados pela célula e reunidos em uma rede organizada por meio de ligações covalentes e não covalentes (figura 4) (TAIZ; ZEIGER, 2017). A lamela média é responsável pela adesão entre as células vegetais, e juntamente com a parede celular primária são ricas em substâncias pécicas (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Figura 4 – Estrutura da parede celular vegetal.



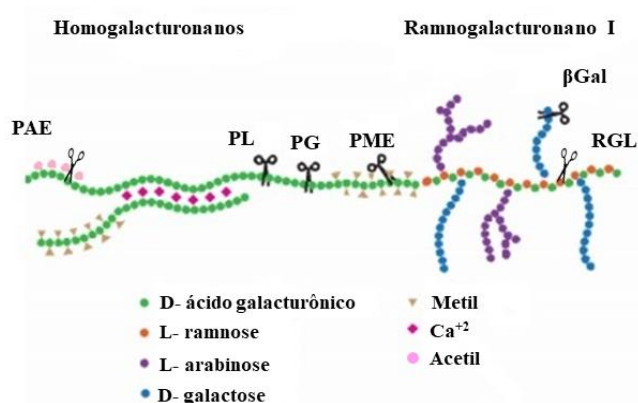
Fonte: Sticklen *et al.*, 2008.

A pectina é um polissacarídeo constituído, em grande parte, por unidades do ácido D-galacturônico, sendo classificada em três principais classes: homogalacturonano (HG), ramnogalacturonano I (RGI), ramnogalacturonano II (RGII) (WANG *et al.*, 2019). As pectinas podem apresentar cadeias laterais formadas por radicais metil e acetil, além de unidades de galactose, arabinose e outros monossacarídeos. Recentemente, pectinas de caju foram caracterizadas quimicamente como HG altamente metilada (76 %) e como RGI ramificada com arabinogalactanas do tipo II (TAMIELLO-ROSA *et al.*, 2019).

A perda da firmeza durante o amadurecimento dos frutos tem sido relacionada, principalmente, ao aumento na solubilidade da pectina (YANG *et al.*, 2017). Durante o desenvolvimento do caju, a redução no conteúdo de pectina total ocasionada devido ao aumento na solubilização de pectinas foi concomitante à redução na firmeza dos pedúnculos (FIGUEIREDO *et al.*, 2001). Além da solubilização da pectina, a perda de açúcares neutros presentes em suas cadeias laterais e a despolimerização da matriz glicana contribuem para o afrouxamento da parede celular e diminuição da interação célula-célula, reduzindo a firmeza do tecido (BRUMMELL, 2006; GOULAO; OLIVEIRA, 2008; MERCADO *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2018).

A degradação da pectina é o resultado da ação coletiva de várias enzimas hidrolíticas da parede celular (figura 5). A pectinametilesterase (PME) e a pectina acetiltransferase (PAE) hidrolisam os grupos metil e acetil, respectivamente, da cadeia de HG, produzindo uma pectina com baixo grau de metilação e acetilação (PRASANNA *et al.*, 2007). Desse modo, a cadeia principal de HG torna-se mais susceptível ao ataque enzimático da poligalacturonase (PG) e pectatoliase (PL), enzimas responsáveis pela hidrólise (WANG *et al.*, 2018). Já a cadeia de RGI é hidrolisada pela ramnogalacturonanoliase (RGL), liberando um grupo de ácido poligalacturônico insaturado, enquanto a β -galactosidase (β Gal) atua na remoção da galactose de suas cadeias laterais (VORAGEN *et al.*, 2009).

Figura 5 – Mecanismo de ação das principais enzimas que atuam na degradação da pectina da parede celular. Pectinametilesterase (PME), pectina acetiltransferase (PAE), poligalacturonase (PG), pectatoliase (PL), ramnogalacturonanoliase (RGL) e β -galactosidase (β Gal).



Fonte: Wang *et al.*, 2018.

Em caju, foi observado um pico na atividade da PME seguido pela elevação da atividade da PG, sugerindo que essas enzimas e a associação entre elas são as principais responsáveis pelo amaciamento de pedúnculos durante o seu amadurecimento (FIGUEIREDO

et al., 2001). De modo análogo, o gene *PGI* revelou ser crucial para o retardo da perda de firmeza em maçã (*Malus x domestica*) e morango (*Fragaria × ananassa* Duch.) (ATKINSON *et al.*, 2012; POSÉ *et al.*, 2013). Recentemente, Xue *et al.* (2020) verificaram que o silenciamento de *FvPME38* ou *FvPME39* resultou em morangos mais firmes, enquanto a superexpressão desses genes produziu frutos mais macios.

Embora a PME e a PG sejam as enzimas mais completamente caracterizadas que modificam pectina, elas são incapazes de afetar significativamente a textura dos frutos (YANG *et al.*, 2017). Em tomate (*Solanum lycopersicum*), a inibição da atividade da PG não preveniu a solubilização da pectina (LANGLEY *et al.*, 1994; SMITH *et al.*, 1990), enquanto PME ou PG silenciados tiveram relativamente pouco efeito no amaciamento desse fruto (WEN *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2019). Por outro lado, o silenciamento de *SPL* em tomate e dos *FaβGal4* ou *FaRGL* em morango acarretou o aumento da firmeza desses frutos, destacando a importância de uma visão geral dos genes envolvidos nesse processo (MOLINA-HIDALGO *et al.*, 2013; PANIAGUA *et al.*, 2016; ULUISIK *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2019).

Os demais polissacarídeos que compõem a parede celular também sofrem alterações, impactando na estrutura da parede e, conseqüentemente, na firmeza dos frutos. A celulose consiste em longas cadeias com unidades de β-(1,4)-D-glicose que associadas formam as microfibrilas (SEYMOUR *et al.*, 2013). O xiloglucano, um tipo de hemicelulose, consiste em uma cadeia principal com unidades de β-(1,4)-D-glicose unidas com ramificações de α-(1,6)-D-xilose (LAMPUGNANI *et al.*, 2018). Esses polissacarídeos formam ligações de hidrogênio entre si, proporcionando resistência mecânica e garantindo manutenção da estrutura durante a extensão da parede celular (AQUILA *et al.*, 2012).

Durante o amadurecimento em frutos, a expansina (EXP) e a xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase (XTH) promovem o relaxamento e a expansão da parede celular usando mecanismos diferentes. A EXP realiza a quebra das ligações de hidrogênio entre as microfibrilas (celulose) e a matriz glicana de hemicelulose, enquanto a XTH é responsável pela hidrólise e pela religação das cadeias de xiloglucano (SEYMOUR *et al.*, 2013). Além dessas enzimas, a xilosidase age removendo os resíduos de xilose da cadeia principal de xiloglucano, enquanto a celulase (endoglucanase; EG) catalisa a clivagem das ligações glicosídicas β-1,4 presentes na cadeia de celulose, contribuindo para a perda de firmeza dos frutos (JARA *et al.*, 2019).

Desse modo, o silenciamento do *SLExp1* resultou em tomates mais firmes sem alterar a cor, o peso e o conteúdo de sólidos solúveis nesses frutos, sugerindo ser um gene

essencialmente envolvido na firmeza desses frutos (MINOIA *et al.*, 2016). Recentemente, Jara *et al.* (2019) verificaram que o gene *FaEGI* foi mais expresso em morangos macios do que em morangos firmes. Da mesma maneira, Dotto *et al.* (2005) identificaram maior expressão de *FaEXP* em morangos macios do que em firmes, ressaltando a importância de estudos com genótipos que apresentam firmezas contrastantes para a identificação de potenciais genes relacionados ao amaciamento de frutos.

Algumas dessas enzimas são codificadas por grandes famílias multigênicas. Por exemplo, a XTH é representada por 25 membros em tomate e 33 em *Arabidopsis thaliana* (YOKOYAMA; NISHITANI, 2000; SALADIÉ *et al.*, 2006). No entanto, cada membro desempenha uma função específica durante o amadurecimento do fruto, podendo o processo de amaciamento ser influenciado pela expressão de vários membros da mesma família multigênica. A superexpressão de *FvXTH9* ou *FvXTH6* foram capazes de acelerar o amadurecimento de morangos e, conseqüentemente, a produção de frutos mais macios (WITASARI *et al.*, 2019). Assim como a XTH, os níveis de expressão de três membros gênicos (*FcEXP1*, *FcEXP2* e *FcEXP5*) foram associados à redução da firmeza em morangos (FIGUEROA *et al.*, 2009). Portanto, um estudo transcriptômico pode auxiliar na identificação de membros associados com a perda de firmeza durante o amadurecimento.

O processo de amaciamento dos frutos é mediado pela expressão temporal de vários membros da mesma e de diferentes famílias multigênicas durante o amadurecimento, além de apresentar regulação altamente coordenada. Com isso, estudos moleculares são necessários para avançar na compreensão da regulação a nível transcricional envolvida na perda de firmeza de pedúnculos durante o amadurecimento de genótipos de cajus contrastantes. O uso de cajus contrastantes auxiliará na busca por genes-chaves relacionados a firmeza específica de cada genótipo.

2.1.2.2. Coloração

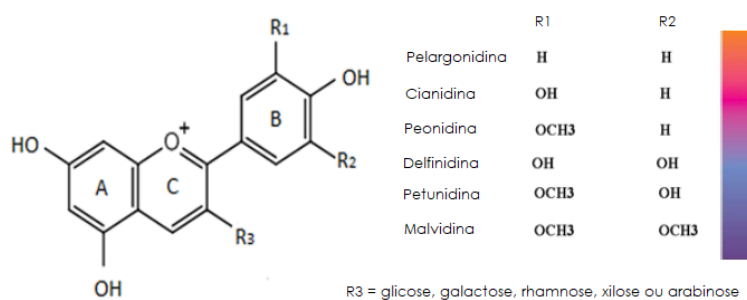
A coloração é um importante indício da maturidade e qualidade dos frutos de algumas espécies frutíferas. No caju, a escolha do consumidor depende do mercado importador, de modo que no mercado europeu, o consumidor francês prefere frutos vermelhos, enquanto, em outros países, a preferência é por frutos de cor amarela. O mercado brasileiro, por exemplo, prefere o caju de cor avermelhada, devido à associação com um fruto maduro, que alcançam os melhores preços no mercado (FILGUEIRAS; ALVES, 2002; CARIOCA *et al.*, 2003). A coloração vermelha de alguns genótipos de cajus tem sido atribuída,

principalmente, ao acúmulo de antocianinas, visto que esses compostos não foram detectados em caju amarelos ao longo desenvolvimento desses frutos (SCHWEIGGERT *et al.*, 2016).

As antocianinas pertencem a classe dos flavonóides, compostos que possuem uma estrutura básica, consistindo em dois anéis aromáticos ligados por um anel heterocíclico com três átomos de carbono (PANDEY *et al.*, 2016). Os flavonóides desempenham diversas e importantes funções na biologia das plantas: antioxidantes, sinalizadores na interação planta-bactéria, sinalização hormonal, absorção de raios UV, fertilização e germinação do pólen, além de pigmentar tecidos (STRACKE *et al.*, 2007).

Entre os flavonóides pigmentados mais abundantes nas plantas vasculares estão as antocianinas (WINKEL-SHIRLEY, 2001). As antocianinas, compostos resultantes a partir da glicosilação das antocianidinas, são as principais responsáveis pelas diferentes cores dos tecidos vegetais, variando entre vermelho e azul (figura 6). No mais, a cor final dos tecidos é determinada, principalmente, pela combinação da estrutura química das antocianinas e do pH do vacúolo, local no qual esses compostos estão localizados (WINKEL-SHIRLEY, 2001). Durante o amadurecimento, ocorre o aumento no conteúdo de antocianinas na película, principalmente, de caju vermelho (SCHWEIGGERT *et al.*, 2016).

Figura 6 – Estrutura química e representação das cores das principais antocianinas presentes na natureza.



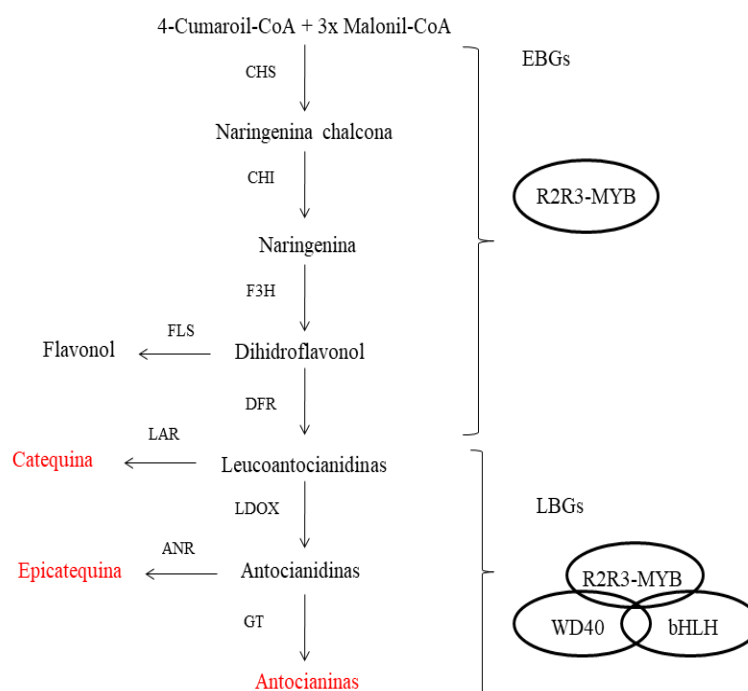
Fonte: adaptado de Su *et al.*, 2016 e Ananga *et al.*, 2013.

A via de biossíntese dos flavonóides tem sido muito estudada, sendo bioquimicamente e molecularmente caracterizada em várias espécies incluindo *Arabidopsis thaliana* e uva (*Vitis vinifera*) (SHIRLEY *et al.*, 1992; BOSS *et al.*, 1996; WINKEL-SHIRLEY, 2001). Inicialmente, os flavonóides são sintetizados pela rota dos fenilpropanóides, onde ocorre a conversão de fenilalanina em 4-cumaroil-CoA pela enzima fenilalanina amônia

liase (TANAKA *et al.*, 2010).

Entretanto, a via dos flavonóides, de fato, começa com a ação da chalcona sintase (CHS) produzindo chalconas (figura 7). Estas são isomerizadas espontaneamente ou pela ação da chalcona isomerase (CHI), resultando em flavonona (naringenina). No passo seguinte, a flavonona 3-hidroxilase (F3H) produz dihidroflavonol, podendo este ser catalisado pela dihidroflavonóide redutase (DFR) ou pela flavonol sintase (FLS) e resultar em leucoantocianidina (flavan-3,4-dióis) e flavonol, respectivamente (LI, 2014). A partir desse ponto, a leucoantocianidina pode ser convertida a catequina (2,3-*trans*-flavan-3-ol) pela enzima leucoantocianidina redutase (LAR) ou a antocianidina pela leucoantocianidina dioxigenase (LDOX) (figura 8). Por fim, as antocianidinas, então, servem como substrato para a síntese de epicatequina (2,3-*cis*-flavan-3-ol) pela antocianidina redutase (ANR) ou serem glicosiladas pela UDP flavonóide 3-*o*-glicosil transferase (GT), resultando em antocianinas (JAAKOLA, 2013).

Figura 7 – Representação esquemática da via de biossíntese dos flavonóides. Genes estruturais: chalcona sintase (CHS), chalcona isomerase (CHI), flavonona 3-hidroxilase (F3H), dihidroflavonóide redutase (DFR), flavonol sintase (FLS), leucoantocianidina redutase (LAR), leucoantocianidina dioxigenase (LDOX), antocianidina redutase (ANR) e UDP flavonóide 3-*o*-glicosil transferase (GT). Eles têm sido classificados em genes iniciais (EBGs) e tardios (LBGs), sendo regulados por fatores de transcrição da família R2R3-MYB e por proteínas basic helix–loop-helix (bHLH) e WD40 juntamente com os R2R3-MYB, respectivamente.



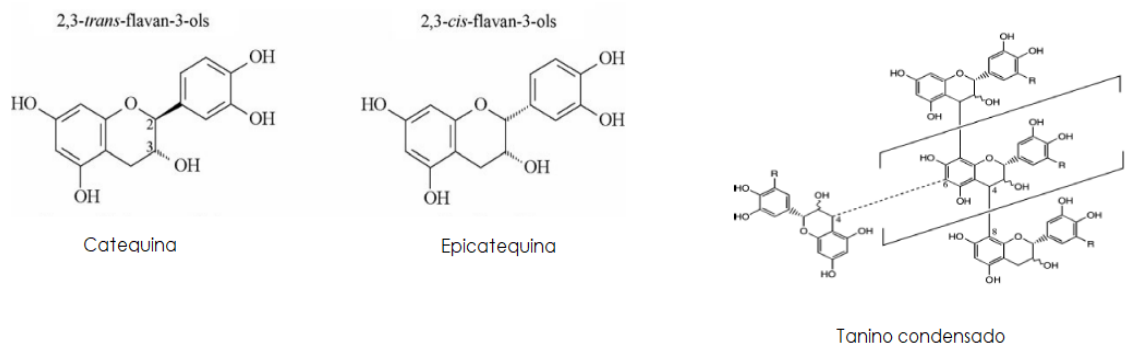
Fonte: adaptado de Liu *et al.* (2013).

Cada espécie apresenta uma expressão de genes estruturais específicos envolvidos na via dos flavonóides. A ausência de níveis detectáveis de transcritos para *MdGT* em maçã branca foi a responsável pela perda de antocianinas e conseqüentemente não-pigmentação (KOTEPONG *et al.* 2011). De maneira distinta, a ausência de antocianinas em romã branca (*Punica granatum*) foi relacionada com a supressão ou expressão limitada de *PgANS* (ZHAO *et al.*, 2015). Já em ameixas (*Prunus salicina* L.), o gene *PsLDOX* demonstrou um papel central para o acúmulo de pigmentos vermelhos em películas, apresentando correlação positiva entre sua expressão e o conteúdo de antocianinas (GONZÁLEZ *et al.*, 2016). Entretanto, um estudo comparativo entre genótipos de maçã vermelha e não-vermelha mostrou diferenças apenas na intensidade do nível de expressão de alguns genes (*MdCHS*, *MdF3H*, *MdDFR*, *MdANS* e *MdGT*), sendo estes mais expressos em maçã avermelhada (TAKOS *et al.*, 2006).

No geral, os taninos podem ser classificados como hidrolisáveis ou condensados, com base nas unidades que o compõem (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2003). Catequina e epicatequina têm sido apontados como as principais unidades monoméricas que compõem os taninos condensados (também chamados proantocianidinas) (figura 8), enquanto os taninos hidrolisáveis são compostos por ácidos fenólicos. Os taninos são compostos relacionados à adstringência em frutos devido a interação entre eles e as proteínas salivares, resultando na formação de um grande complexo precipitado que causa uma sensação de travo para o consumidor (QUEIROZ *et al.*, 2011; DAS; ARORA, 2017, BRITO *et al.*, 2020).

Durante o amadurecimento, ocorre redução no conteúdo de taninos (60-66%), minimizando a chance de interação com as proteínas da saliva do consumidor e, conseqüentemente, a sensação de adstringência dos pedúnculos (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2003). Entretanto, há uma grande controvérsia na literatura acerca do tipo de tanino predominante em cajus. Agostini-Costa *et al.* (2003) verificaram a relação entre taninos condensados e a propriedade adstringente de caju. Posteriormente, Michodjehoun-Mestres *et al.* (2009) e Brito *et al.* (2007) não identificaram a presença de proantocianidinas em caju. Por fim, Cunha *et al.* (2017) observaram que a enzima LAR (responsável pela síntese de catequina) não apresentou atividade durante o amadurecimento de caju, sugerindo que os principais responsáveis pela adstringência desse fruto são os taninos hidrolisáveis.

Figura 8 – Modelo da estrutura química do tanino condensado e de suas subunidades formadoras.



Fonte: adaptado de Vital *et al.*, 2004.

Como visto anteriormente, as últimas reações da via dos flavonóides parecem ser decisivas para o acúmulo de taninos condensados e antocianinas em vegetais. Em morango, o silenciamento de *FaGT* resultou no redirecionamento da biossíntese de antocianinas para taninos em frutos maduros (GRIESSER *et al.*, 2008). Do mesmo modo, a alta expressão de *PcANR* e *PcLAR* em pêra verde (*Pyrus communis* L.) promoveu um maior conteúdo de taninos em relação às antocianinas, sugerindo que esses genes são essenciais para a definição da cor de pêras (YANG *et al.*, 2015). Inclusive, recentemente, Robinson *et al.* (2020) silenciaram *VvANR* em uvas e observaram frutos com menor concentração de taninos, reforçando a importância desse gene no acúmulo desses compostos.

Os genes estruturais envolvidos na biossíntese de flavonóides têm sido classificados em dois grupos: genes iniciais (*early biosynthetic genes* - EBGs) e tardios (*late biosynthetic genes* - LBGs) (PELLETIER *et al.*, 1997). Na família Rosaceae, os genes iniciais são assim chamados porque atingem seu pico de expressão ainda no primeiro estágio de desenvolvimento do fruto. Entre os genes iniciais têm-se aqueles que codificam as proteínas CHS, CHI, F3H e DFR. Já os genes tardios apresentam um pico de expressão no estágio de maturação, codificando as proteínas LDOX e GT (ESPLEY *et al.*, 2007; RAVAGLIA *et al.*, 2013; GONZÁLEZ *et al.*, 2016).

Além dos estruturais, os genes regulatórios desempenham função crucial na biossíntese de flavonóides. Estes genes codificam os fatores de transcrição da família R2R3-MYB, responsáveis por regular a expressão dos EBGs; e das famílias das proteínas *basic helix-loop-helix* (bHLH) e WD40, que através da formação de um complexo (denominado

MBW) com os R2R3-MYB, regula a expressão dos LBGs (XU *et al.*, 2015; GONZÁLEZ *et al.*, 2016). A expressão dos genes que codificam esses fatores de transcrição geralmente, é relacionada ao estágio de desenvolvimento do fruto (XU *et al.*, 2015; GONZÁLEZ *et al.*, 2016). Em pêra, o gene *MYB10* foi mais expresso no estágio inicial, enquanto os níveis de expressão dos genes *bHLH* e *WD40* foram mais altos no estágio final de desenvolvimento do fruto corroborando com o acúmulo de antocianinas (YANG *et al.*, 2013).

Os genes que codificam os fatores de transcrição pertencem a grandes famílias multigênicas, apresentando membros envolvidos tanto no metabolismo de antocianinas, quanto no das subunidades dos taninos. Em uva, os genes *VvMYBA1* e *VvMYBA2* funcionam como reguladores do conteúdo de antocianinas (KOBAYASHI *et al.*, 2002; KOBAYASHI *et al.*, 2004; WALKER *et al.*, 2007), enquanto os genes *VvMYBPA1*, *VvMYBPA2* e *VvMYBPAR* são responsáveis pelo acúmulo de taninos (BOGS *et al.*, 2007; TERRIER *et al.*, 2009; KOYAMA *et al.*, 2014). Em particular, *VvMYBPA1* e *VvMYBPA2* são capazes de ativar a região promotora de *VvLAR* e *VvANR* (genes envolvidos na biossíntese de taninos), além de outros genes estruturais da via dos flavonóides (TERRIER *et al.*, 2009; BOGS *et al.*, 2007).

Em vista do acúmulo de antocianinas e taninos depender da regulação da expressão de genes estruturais envolvidos na biossíntese de flavonóides, bem como de fatores de transcrição que atuam na modulação desses genes, estudos moleculares são necessários para melhor compreensão desse processo durante o amadurecimento de cajus.

2.2. Abordagem transcriptômica aplicada a frutos

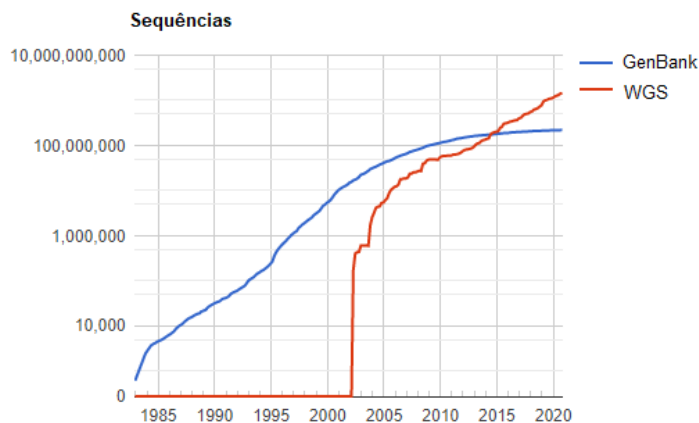
A domesticação e o melhoramento genético do cajueiro tiveram início por volta de 1950 no Brasil e na Índia (BHAT *et al.* 2010; QUEIROZ *et al.* 2012). Embora as técnicas convencionais de melhoramento vegetal tenham feito progressos consideráveis no desenvolvimento de espécies melhoradas, elas não têm sido capazes de acompanhar a crescente demanda por hortaliças e frutos nos países em desenvolvimento (SIMSEK *et al.*, 2017). Além disso, como em outras espécies de árvores perenes, o melhoramento genético do caju pela reprodução tradicional é lento e imprevisível devido à longa fase juvenil, alto grau de heterozigosidade, falta de correlações de traços juvenil-maduros e grande tamanho da planta madura (SAVADI *et al.*, 2020). Portanto, tecnologias moleculares devem acelerar os processos de seleção e melhoramento dos frutos.

Em 2005, o surgimento das tecnologias de sequenciamento de DNA conhecidas

como *Next Generation Sequencing* (NGS) revolucionou a pesquisa na área genômica (OZSOLAK; MILOS, 2011). Isso porque as tecnologias NGS permitem o sequenciamento de vários genes ao mesmo tempo, possibilitando uma larga escala produtiva de informações. O uso dessas tecnologias está evoluindo rapidamente (fato que pode ser observado pela quantidade crescente de publicações e sequencias depositadas em bancos de dados públicos) devido ao custo financeiro para a realização de sequenciamento em larga escala está cada vez mais acessível (figura 9).

Recentemente, o genoma do cajueiro genótipo BRS 226 foi sequenciado por meio das tecnologias NGS, mais especificamente, através da plataforma PacBio RS II (capaz de sequenciar fragmentos com >10.000 pares de bases) e depositado no banco de dados público Phytozome (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Aoccidentale_er). No geral, o genoma do cajueiro apresenta 41.197 genes anotados e agrupados em 581 *scaffolds* e 1.150 *contigs*.

Figura 9 – Número de seqüências gênicas depositadas no *GenBank* e no *Whole Genome Sequencing* (WGS) desde 1982 até 2020.



Fonte: NCBI (2020).

Entre as tecnologias NGS, a técnica de sequenciamento de cDNA (RNA-Seq) tem sido amplamente utilizada com o intuito de quantificar e identificar os transcritos expressos em um organismo em determinado estágio de desenvolvimento ou condição de estresse (OZSOLAK; MILOS, 2011). Segundo Korpelainen et al. (2015), a técnica de RNA-seq integra as estratégias de extração, checagem da qualidade e integridade do RNA total, seguidas pela seleção do mRNA, preparação e sequenciamento da biblioteca de cDNA e, por fim, análises de bioinformática. Diferentemente de métodos baseados em hibridização

(microarranjo e *northern-blot*), a técnica de RNA-Seq não necessita de conhecimento prévio do transcriptoma (possibilita o estudo de organismos não-modelo) e não se limita a avaliação apenas de genes para os quais existam sondas. Desta forma, novos transcritos e variantes de *splicing* podem ser identificados. Além disso, é possível determinar polimorfismos em regiões transcritas com resolução de um nucleotídeo (WANG *et al.*, 2009).

A técnica de RNA-Seq ainda apresenta vantagens em relação aos métodos utilizados anteriormente para análise de expressão gênica devido a sua alta sensibilidade, rendimento e menor quantidade de RNA inicial requerido para análise. Com essa técnica também é possível realizar o sequenciamento massivo e paralelo de milhões a bilhões de moléculas de cDNA (HEATHER; CHAIN, 2016). Então, as sequências resultantes são alinhadas a um genoma de referência ou montadas (quando a espécie não tem genoma sequenciado), fornecendo a estrutura dos transcritos e o nível de expressão de cada gene (SIMSEK *et al.*, 2017).

Como os eventos decorrentes do amadurecimento dos frutos são mediados pela expressão de um grande conjunto de genes, o RNA-seq é capaz de permitir-nos entender melhor acerca dessa complexa regulação transcricional em diferentes frutíferas. Além disso, a técnica de RNA-Seq tem sido muito utilizada para fornecer a base para compreensão sobre os mecanismos moleculares e os principais genes controlando mudanças na qualidade dos frutos durante o amadurecimento (SIMSEK *et al.*, 2017). Recentemente, muitos artigos relacionados com a aplicação de RNA-seq em frutos têm sido publicados (SRIVASTAVA *et al.*, 2016; DESHPANDE *et al.*, 2017; SIMSEK *et al.*, 2017; PEI *et al.*, 2019). Por meio da análise comparativa de transcriptomas e de expressão diferencial é possível ter uma visão geral dos principais processos ativos durante o amadurecimento de frutos, bem como os genes envolvidos nesses processos. Além disso, a análise comparativa usando genótipos de uma mesma espécie revela prováveis genes associados com características específicas de cada genótipo.

Em vista da escassez de estudos moleculares em cajus, e das modificações desses metabolismos envolverem a expressão coordenada de diversos fatores de transcrição, genes envolvidos na biossíntese (flavonóides), assim como na degradação (parede celular), justifica-se a necessidade de usar a abordagem transcriptômica para uma investigação detalhada desses metabolismos em pedúnculos de caju durante o amadurecimento.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Relacionar o perfil transcriptômico de pedúnculos de cajus CCP 76 e BRS 265 com as alterações na firmeza e no conteúdo de antocianinas.

3.2. Específicos

- Mensurar a firmeza e o conteúdo de antocianinas presentes em pedúnculos de caju;
- Identificar os genes diferencialmente expressos (GDEs), via análise transcriptômica (RNAseq), entre os estádios de desenvolvimento (imaturo e maduro) e os genótipos (CCP 76 e BRS 265) dos pedúnculos de caju;
- Realizar a anotação funcional do componente celular, processo biológico e função molecular por meio de ontologia gênica (GO) dos GDEs;
- Identificar as vias metabólicas atribuídas aos GDEs entre os estádios de desenvolvimento (imaturo e maduro) e os genótipos (CCP 76 e BRS 265) dos pedúnculos a fim de ajudar na identificação dos genes envolvidos nos metabolismos de interesse;
- Validar os resultados de expressão obtidos na análise transcriptômica, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR).

4. ARTIGO

Article submitted to **Plant Molecular Biology**

**TRANSCRIPTOME PROFILING OF CASHEW APPLES (*Anacardium occidentale* L.) GENOTYPES
REVEALS SPECIFIC GENES LINKED TO FIRMNESS AND COLOR DURING PSEUDOFRUIT
DEVELOPMENT**

Transcriptome profiling of cashew apples (*Anacardium occidentale*) genotypes reveals specific genes linked to firmness and color during pseudofruit development

Thais Andrade Germano^a, Matheus Finger Ramos de Oliveira^a, Shahid Aziz^a, Antonio Edson Rocha Oliveira^b, Kátia Daniella da Cruz Saraiva^c, Clesivan Pereira dos Santos^d, Carlos Farley Herbster Moura^e, José Hélio Costa^{a*}.

^a Universidade Federal do Ceará, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Campus do Pici, CEP 60440-554, Fortaleza, CE, Brazil; tandradeg@gmail.com; matheusfingerramos@gmail.com; shahidaziz.cl@gmail.com.

^b Universidade de São Paulo, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brazil; ant.edsonoliveira@outlook.com.

^c Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba, Campus Princesa Isabel, CEP 58755-000, Princesa Isabel, PB, Brazil; katiadaniellasaraiva@gmail.com.

^d Universidade Estadual de Ponta Grossa, Departamento de Química, Campus Uvaranas, CEP 84030-900, Ponta Grossa, PR, Brazil; clesivanpereira@gmail.com.

^e Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Dra. Sara Mesquita, CEP 60511-110, Fortaleza, CE, Brazil; farley.moura@embrapa.br.

*Corresponding author: Tel.: +55 85 33669825. E-mail address: helio.costa@ufc.br

Acknowledgments

TGA and SA are grateful to CAPES for the Doctoral fellowship. AERO is grateful to FAPESP for the Postdoctoral fellowship (grant numbers 2019/22579-7 and 2013/08216-2). JHC is thankful to CNPq for the Researcher fellowship (grant number 309795/2017-6). The authors are grateful to Embrapa Agroindústria Tropical for providing the cashew apples. Genome sequence data of cashew trees used in this article was produced by the US Department of Energy Joint Genome Institute <http://www.jgi.doe.gov/> in collaboration with the user community.

Abstract:

Cashew apple (*Anacardium occidentale*) has a great economic worldwide due to its high nutritional value, peculiar flavor and aroma. During ripening, the peduncle develops different peel color and becomes quickly fragile due to its oversoftening, impacting its consumers' acceptance. In view of this, the understanding about its transcriptional dynamics throughout ripening is imperative. In this study, we performed a transcriptome sequencing of two cashew apple genotypes (CCP 76 and BRS 265), presenting different firmness and color peel, in the immature and ripe stages. Comparative transcriptome analysis between immature and ripe cashew apple revealed 4,374 and 3,266 differentially expressed genes (DEGs) to CCP 76 and BRS 265 genotypes, respectively. These genes included 71 and 34 GDEs involved in the cell wall disassembly and flavonoid biosynthesis, respectively, which could be associated with firmness loss and anthocyanin accumulation during cashew apple development. Then, softer peduncle of CCP 76 could be justified by down-regulated *EXP* and up-regulated of genes involved in pectin degradation (*PG*, *PL* and *PAE*) and in cell wall biosynthesis. Moreover, genes related to flavonoid biosynthesis (*PAL*, *C4H* and *CHS*) could be associated with early high accumulation of anthocyanin in red-peel peduncle of BRS 265. Finally, expression patterns of the selected genes were tested by real-time quantitative PCR (qRT-PCR), and the qRT-PCR results were consistent with transcriptome data. The information generated in this work will provide insights into transcriptome responses to cashew apple ripening and hence, it will be helpful for cashew breeding programs aimed at developing genotypes with improved quality traits.

Key-words: peduncle, flavonoid, anthocyanin, gene ontology, differential expression.

1. Introduction

Cashew (*Anacardium occidentale L*) is a tropical evergreen tree that belongs to the *Anacardiaceae* family (Savadi et al. 2020). Its fruit, popularly known as the cashew, consists in two parts: nut and peduncle. Cashew nut, potentially used as source of foods and CNSL (cashew nut shell liquid), is the second most important nut after almonds in worldwide (Oliveira et al. 2020). Vietnam, India and Cote d'Ivoire were the major producers of cashew nut in 2018 with production of 4 million tons (FAOSTAT 2018). The peduncle, also called cashew apple, represents more than 90 % of cashew, being widely consumed all over the world not only for its taste but also for its health benefits (Vasconcelos et al. 2015; Carvalho et al. 2018; Oliveira et al. 2020). However, the commercialization of cashew apple is extremely challenging and has been limited due to its high perishability, astringent flavor and intense softening, which affects fruit quality and marketability. Its postharvest life is less than two days when stored at room temperature (Moura et al. 2010; Queiroz et al. 2011). Thus, the proper understanding of pseudofruit development using scientific methods might increase postharvest life, reducing losses.

In cashew apple, some genotypes are better at retaining firmness than others, in addition to promoting specific peel color. Cashew apple genotype CCP 76 is largely commercialized fruit due to attractive peel coloration (orange), sweetness, size and fresh mass of peduncle but is not commerce-friendly due to reduced firmness. On the other hand, genotype BRS 265 (red color) presents desirable traits for marketing such as greater firmness, which probably promotes longer postharvest life (Lopes et al. 2011). The differences in the traits of agronomic interest between these genotypes makes them attractive models for transcriptional studies. Advances in knowledge regarding cashew apples transcriptome enables the manipulation of desirable characteristics with economic interest to meet specific demands such as genotypes with higher nutritional quality and reduced firmness loss.

In cashew, classical breeding programs have been widely exploited to select superior genotypes based on traditional traits as, size and weight of nuts or yield of a cashew tree, also to prospect genotypes with enhanced fruit quality and resistance to pests and diseases (Filho et al. 2019). However, these programs are long and time-consuming, therefore expensive with high production costs. The development of next-generation sequencing (NGS), and hence RNA sequencing (transcriptome sequencing), has revolutionized genomic research and provided unprecedented insight into transcriptome level studies, mainly regarding transcriptional regulation during fruit development (Yu et al. 2012; Srivastava et al. 2016; Deshpande et al 2017; Pei et al. 2019). So far, no transcriptome-based information of cashew apple was available and availability of such data will accelerate

genomics-assisted breeding for recognition of novel genes of quality characters for sustainable fruit production (Afzal et al. 2020).

Considering the economic importance of the cashew crop and its commercial exploitation, it is necessary to find better ways to retain firmness and add nutritional value to peduncles during cashew nut processing, making them more attractive for consumers. In view of this, transcriptomic studies involving different genotypes can be interesting to understand about specific transcriptional regulation that results in specific characteristics of each genotype. In the present work, transcriptomic changes of two cashew apple genotypes (CCP 76 and BRS 265) contrasting in color and firmness during pseudofruit development were investigated. Furthermore, this is the first report using transcriptomic analysis to characterize the cashew apple development.

2. Material and methods

2.1. Plant material

In this study, cashew tree clones were cultivated in the same orchard at Experimental Station of Embrapa Tropical Agroindustry in Pacajus-CE, Brazil (lat.4°11'26,62"S, lon. 38°29'50,78"W), with the same climatic conditions. Cashew apples (*Anacardium occidentale* L.) from orange-colored peel, CCP 76 (Clone Cashew Tree Pacajus), and red-colored peel, BRS 265 (Clone Brazil), were harvested at developmental stage 2 (green peduncle and mature nut) and at stage 7 (fully colored ripe peduncle with mature nut), based on the peduncle peel color (Lopes et al. 2012). Pseudofruit were manually harvested from August to November 2018 and at the same time (9:00 to 10:00 a.m). From each CCP 76 and BRS 265 samples, three biological replicates were prepared, where each replicate consisted of six cashew apples collected from three trees. After determination of fruit firmness, the nuts were removed, and the peduncles were frozen, ground to a fine powder in the presence of liquid nitrogen and stored at -80 °C for posterior analyses.

2.3. Firmness and anthocyanin content quantification

Fruit firmness was evaluated three times on opposite sides of each peduncle with a penetrometer (Magness-Taylor model FT-011) used to measure the maximum force required to penetrate tissue to a depth of 5 mm using an 8 mm diameter cylindrical. Results were expressed in Newton (N). Total anthocyanins content was extracted as described by Liu et al. (2012) and determined using the differential pH method described by Giusti and Wrolstad (2001). The absorbance of extracts was measured at 510 and 700 nm, and the results were

expressed as mg kg⁻¹ on a fresh weight basis.

2.4. Total RNA extraction

Total RNA was extracted and purified from 0.1 g of ground samples using the ConcertSMPlant RNA Reagent (Invitrogen, Darmstadt, Germany) and NucleoSpin[®] RNA Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), respectively. DNase digestion step was applied to remove genomic DNA contamination using RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden, Germany). Concentration and purity (260/280 ratio) of the isolated RNA was determined with a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, USA). Then, the RNA integrity was verified on a 1.5 % agarose gel stained with ethidium bromide under UV light and confirmed with Bioanalyzer 2100 system (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) through the RNA integrity number (RIN).

2.5. Construction and sequencing of cDNA library

Library construction and high-throughput sequencing of samples were performed by a sequencing facility (Macrogen, Inc. Seoul, South Korea). A total of 12 cDNA libraries were constructed and sequenced by using three biological replicates for immature (CI and BI) and ripe (CR and BR) peduncle of CCP 76 and BRS 265 genotypes, which immature and ripe refers to developmental stage 2 and 7, respectively. A total amount of 1 µg of RNA (with RIN > 9) per sample was applied for strand-specific RNA-Seq libraries preparation using Truseq Stranded mRNA library kit (Illumina, San Diego, CA, USA). Then, the libraries were sequenced on an Illumina Hiseq2500 platform (Illumina, San Diego, CA, USA) in paired-end mode with a read length of 101 bp using TruSeq SBS v.4 kit (Illumina, San Diego, CA, USA). The raw sequencing reads were deposited in the NCBI Sequence Read Archive (SRA) under the following bioproject accession number PRJNA657300.

2.6. Reads quality check and mapping to the reference genome

The raw reads quality was evaluated using the FastQC v.0.11.7 software (Andrews 2010). The raw reads containing adapter, low-quality bases (< Q20) and short size sequences (≤ 50 bp) were trimmed by Trimmomatic v.0.36 tool (Bolger et al. 2014) and re-evaluated the data quality. After trimming, filter reads were mapped to cashew tree genome BRS 226 available in Phytozome database (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Aoccidentale_er) using default parameters of TopHat2 (Kim et al. 2013) and Bowtie2 (Langmead and Salzberg 2012) softwares (Supplementary Table S1).

2.7. Differential expression analysis and functional annotation

The number of filter reads that mapped to each gene was calculated using HTSeq v. 0.9.1 (Anders et al. 2015) under the guidance of annotated genes from a GFF file (General Feature Format) available in the Phytozome database. Then, the counts were normalized using edgeR package (Robinson et al. 2010). Only the genes that presented count-per-million (CPM) ≥ 2 in n of the samples, where n is the size of the smallest group of replicates (here $n = 2$) were selected for differential expression analysis. Differentially expressed genes (DEGs) and principal component analysis (PCA) were performed from normalized filter reads using DESeq2 package v. 1.30.0 (Love et al. 2014). Only genes presenting a corrected p-value threshold of 0.05 and $|\log_2 \text{fold-change}| \geq 1$ were considered as DEGs (Benjamini and Hochberg 1995). DEGs were inferred from the following comparisons: BR vs BI; CR vs CI; CI vs BI; CR vs BR. The annotation for DEGs related to color and firmness was obtained by access a GFF file, while the transcription factors were identified using PlantTFDB v.5 (planttfdb.cbi.pku.edu.cn/prediction.php) with default parameters. Then, functional enrichment analysis of the DEGs were performed using Goseq R package v. 1.30.0 (Young et al. 2010) and KOBAS software v. 3 (Xie et al. 2011).

2.8. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis

Six genes related to flavonoids biosynthesis and cell-wall disassembling, besides of highly stable genes were selected for validation of the transcriptomic data generated by RNA-seq analysis. Specific primer pairs were designed, whenever possible, in the exon/exon junctions, using Perl primer v. 1.1.21 (Marshall 2004) (Supplementary Table S2). The cDNA was transcribed from 0.5 μg of total RNA and oligo dT18 using the Improm II kit (Promega, Madison, USA). The PCR reaction was performed using a RealPlex 4S thermocycler (Eppendorf, Germany) in 96-well optical reaction plates. Each PCR reaction was set up in total 20 μL volume containing 4 μL of cDNA (25 ng/ μL), 1 μL of each primer (300 nM), 10 μL of GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, USA) and 4 μL of ultrapure water. All reactions were carried out in biological and technical triplicates, including a no cDNA template as negative control. The PCR cycling conditions were as follows: 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, the optimal annealing temperature for each primer pair for 15 s and 60 °C for 20 s. Primer-product specificity was verified by melt-curve analyses after each experiment. The qBase^{PLUS} software v. 3.1 was used to measure the relative expression level of each gene and to confirm the stability of candidate reference genes through GeNorm tool (Vandesompele et al. 2002; Hellemans et al. 2007). Pearson's coefficient (r) between RNA-seq (FPKM - Fragments Per Kilobase Million) (Supplementary

Table S3) and qRT-PCR (relative expression) results was calculated.

2.9. Statistical analysis for firmness and metabolites

The data obtained for firmness and metabolites quantification were subjected to two-way analysis of variance (ANOVA) using GraphPad Prism 9.0 software and averages were compared by Tukey test at 5 % probability. The results were expressed as the mean \pm standard deviation (SD) of three biological replicates.

3. Results and discussion

3.1. Firmness and anthocyanin content in peduncles vary during developmental stages and between genotypes

Firmness and color peel are important attributes which determine the quality, besides of influence consumers' attractiveness and acceptance of in natura cashew apples commercialization (Minoia et al. 2016). Firmness and anthocyanin content for CCP 76 and BRS 265 cashew apples at two developmental stages are presented in Fig. 1. The firmness of both genotypes decreased significantly during fruit development (Fig. 1B), while the total anthocyanin content increased in the same period (Fig. 1C). Although the anthocyanin values in mature CCP 76 was lower compared with mature BRS 265, the increase in anthocyanin content was more accentuated (4.3 times) in orange-colored (CCP 76) than red-colored (BRS 265) cashew apple (1.9 times) throughout fruit development. Overall, firmness and anthocyanins content were significantly higher in BRS 265 than in CCP 76 cashew apple at the same developmental stage. These differences result in cashew apple genotypes with distinct visible characteristics, as shown in Fig. 1A.

3.2. Sequencing and mapping data of peduncles cashew apple

RNA-Seq libraries of peduncles cashew apple CCP 76 and BRS 265 harvested at two development stage (green and mature) with three biological replicates generated approximately 541 million raw reads, showing an average Q30 value and GC content of 92.61 and 44.67 %, respectively (Supplementary Table S4). The removal of low quality sequences, adapters, and short reads resulted in a final number of approximately 485 million of filter reads (89.58 %) among which 418 million (~ 91 %) reads mapped to the high-quality cashew tree reference genome, which contains 41,197 predicted genes (Supplementary Table S4). According to Pie et al. (2019), when the reference genome is representative and the experiments are not contaminated, the percentage of mapped reads is expected to be higher than 70 %. In the current study, the high rate of mapped reads evidences the quality of so far results for further analyses.

The principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering of the 12 samples analyzed were performed to verify the uniformity of the replicates in each sample and genotype (Fig. 2). In PCA plot was observed the expected clustering of replicates of each sample (Fig. 2A). The first two principal components (PC1 and PC2) explained 94 % of the total transcriptional variance, with PC1 explaining 56 % and PC2 the remaining 38 %. PC1 discriminated the fruit at ripe stage (located on the left side) from those at immature stage (located on the right side). Whereas PC2 distinguished both BRS 265 samples (located on the underside) from those of CCP 76 genotype (located on the top side). This indicates that the variance in gene expression is higher among samples during development (stage 2 to 7) than between genotypes in the same maturation stage. The observed PCA results, the hierarchical clustering (represented by heatmap graph) also showed the grouping of replicates of each sample (Fig. 2B).

3.3. Analysis of differentially expressed genes (DEGs)

To reveal the related genes to cashew apple development and that responsible for specific trait of each genotype, analysis of DEGs was carried out. From 41,197 predicted genes in the cashew apple genome, only 18,110 genes presenting $\text{CPM} \geq 2$ in at least two cDNA libraries were subjected to differential expression analysis. Among these, 7,024 genes involved in different fruit ripening processes were inferred as DEGs ($|\log_2 \text{fold-change}| \geq 1$ and adjusted $p\text{-value} < 0.05$) (Supplementary Table S5). As shown in Fig. 3A, a total of 1,859 and 1,835 DEGs were detected in CI vs BI and CR vs BR, respectively. In addition, the comparative analysis between CR and CI have been shown that 1,976 genes highly expressed in the CCP 76 ripe, while the expression of 2,398 genes was down-regulated. Similarly, the comparison BR vs BI presented 1,337 and 1,929 up and down-regulated genes to BRS 265 ripe, respectively (Fig. 3A).

The Venn diagram was constructed to summarize commonly and uniquely genes expressed between established comparisons (CR vs CI and BR vs BI) (Fig. 3B). A total of 1,749 and 641 genes were exclusively differentially expressed in CR vs CI and BR vs BI, respectively. Additionally, 2,625 DEGs were common during fruit development of both genotypes. The comparison of transcriptional changes allowed us to observe that two cashew apple genotypes share similar transcriptional dynamics (common DEGs) during development. Undoubtedly, exclusive DEGs underlie the specific differences found in each studied genotype. Detailed information on these common and exclusive DEGs are listed in Supplementary Table S6.

3.4. Functional enrichment analysis

Gene Ontology (GO) enrichment analysis of identified DEGs assigned to main biological process involved in cashew apple development. Overall, DEGs were assigned to 73 and 74 functional groups

significantly enriched (p-value of < 0.05) in CR vs CI and BR vs BI, respectively (Supplementary Table S7). As shown in Fig. 4, several significantly enriched DEGs could be associated to firmness-related processes, corroborating with alterations in this trait. Likewise, many DEGs were mainly involved in biological processes related to sugar and cell wall metabolism in watermelon (*Citrullus lanatus*) (Zhu et al. 2017). Interestingly, several DEGs were assigned to the category of L-phenylalanine biosynthetic process (GO: 0009094) in CCP 76 genotype. It is an important highlight that phenylalanine is a precursor compound to anthocyanin biosynthesis (Wu et al. 2018).

Additionally, to further explore the functions of DEGs, these were subjected to KEGG pathway enrichment analysis. A total of 37 and 35 KEGG pathways were significantly enriched with a p-value of < 0.05 in CR vs CI and BR vs BI comparisons, respectively (Supplementary Table S8). The majority of metabolic pathways were equally enriched during fruit development of both genotypes (Fig. 5). Notably, many firmness-related pathways and flavonoid biosynthesis (ko00941) were significantly enriched in DEGs during cashew apple ripening. Enrichment of related pathways such as “phenylalanine metabolism”, “galactose metabolism” and “pentose and glucuronate interconversion” have been also described in previous studies of the fruit ripening (Ma et al. 2020, Sun et al. 2020). In this study, we focused on cited metabolisms because they are important pathways associated with fruit quality traits. The other metabolisms will be analyzed in more detail in the further studies.

3.5. Genes related to cell wall disassembly in cashew apple

The cell wall disassembly is considered the main factor responsible for fruit softening. Pectin, the main component present in the middle lamella, consists of polysaccharides enriched in galacturonic acid, classified in three major groups: homogalacturonan (HG), rhamnogalacturonan-I (RG-I), and rhamnogalacturonan-II (RG-II) (Wang et al. 2019). Pectin solubilization, depolymerization of matrix glycans and loss of natural sugar from pectin side-chain promote middle lamella degradation and, hence the reduction of cell-to-cell adhesion, contributing to fruit firmness loss (Brummell 2006; Goulao and Oliveira 2008; Mercado et al. 2011). Recently, pectins from cashew apple fruit were characterized, where were found that about 76 % of its HG chain is methyl esterified, the presence of few quantities of RG-I backbones and some arabinogalactan substitutions in its main chain (Tamiello-Rosa et al. 2019). In the present study, a larger number of DEGs (71 genes) were importantly linked to fruit softening in cashew apple (Fig 6).

Pectin methylesterase (PME) and pectin acetylerase (PAE) selectively remove the methyl-ester and acetyl groups from homogalactouronic acids, respectively, making this polymer accessible to other cell wall

hydrolytic enzymes activities (Prasanna et al. 2007). Curiously, we found many *PME* and *PAE* more expressed in immature than ripe cashew apple with exception of the one *PAE* (Anaoc.0635s0009), which was exclusively up-regulated in CCP 76 ripe (Fig. 6A). Previous study also reported that many immature fruit are rich in *PME*, while ripe fruit are rich in hydrolase enzymes (Prasanna et al. 2007). Additionally, we identified two pectin methylsterase inhibitor (*PMEI*; Anaoc.0006s1481 and Anaoc.0020s0385) were highly more expressed in immature than ripe cashew apple. Likewise, dos Santos et al. (2019) noticed the up-regulation of *PMEI* in immature acerola (*Malpighia emarginata*), suggesting that the inhibition of pectin degradation by *PMEI* is one of the attempts to maintain cell wall integrity of this fruit.

Among the cell wall hydrolases coding genes, we identified many polygalacturonase (*PG*) and pectate lyase (*PL*) were up-regulated from immature to ripe in both genotypes (Fig. 1B). Notably, one *PG* (Anaoc.0010s0426) showed the most up-regulation in these comparisons CR vs CI (12-fold), CR vs BR (18-fold) and CI vs BI (10-fold). Moreover, two *PG* (Anaoc.0003s0794 and Anaoc.0005s1122) were exclusively up-regulated in CR vs CI, corroborating with the high firmness loss (60 %) during CCP 76 development (Fig. 1B). Interestingly, other two *PL* (Anaoc.0015s0315 and Anaoc.0004s1735) showed a 9-fold increase in BRS 265 ripe, while in CCP 76 ripe was observed 6 and 5-fold increase, respectively, suggesting it could imply their role in pulp softening.

PL and *PG* have different responses to fruit ripening because the degradation of HG chain by *PL* occurs by a β -elimination reaction in contrast to the hydrolytic mechanism of *PG* (Jimenez-Bermúdez et al. 2002). Although silencing of *PG* had no apparent effect on tomato fruit softening, the antisense downregulation of the *FaPGI* in strawberry resulted in firmer ripe fruit (Garcia-Gago et al. 2009; Wang et al. 2019). However, the silencing of *PL* has been successfully applied for the modulation of fruit firmness in tomato and strawberry without altering color, mass and soluble solids content (Jimenez-Bermúdez et al. 2002; Uluisik et al. 2016; Yang et al. 2017; Wang et al. 2019). In cashew apple, *PG* and *PME* activities have received attention due to their direct relation to fruit firmness (Figueiredo et al. 2001; Souza et al. 2016).

Thus, our results suggested that genes coding enzymes involved in the metabolism of pectins are expressed in a coordinated way during cashew apple development. In immature cashew apple, the *PME* and *PAE* presented higher gene expression level, while the expression of *PG* and *PL* genes was prevalent in ripe cashew apple. Besides this, the *PME* activity precedes the *PG* and *PL* activities, consequently, it might be required during the early phase of fruit development and once that *PL* and *PG* become active, the *PME* expression goes down (Srivastava et al. 2016). Furthermore, these data suggest that in CCP 76 cashew apple, *PG* and *PL* might be

the major pectin solubilizing enzymes, while in BRS 265 cashew apple, only PL could be associated with this process.

In the current study, one rhamnogalacturonan lyase (RGL; Anaoc.0012s0556) was up-regulated in ripe stage to both CCP 76 and BRS 265 cashew apples, showing 3.6 and 3.2-fold changes, respectively (Fig. 6B). For many fruit, the RGL can contribute strongly to cell wall disassembly during ripening. For example, the silencing of *FaRGL* resulted in firmer strawberry due to the maintenance of cell wall middle lamella, supporting the idea that this gene plays a vital role in fruit softening (Molina-Hidalgo et al. 2013).

The loss of neutral sugars from side chains of pectins also seems to contribute for the cell wall disassembly process and consequently fruit softening because neutral chains might anchor pectins to the wall through binding to matrix glycans or cellulose (Popper and Fry 2005; Zykwiniska et al. 2005). Therefore, the loss of arabinan and galactan side chains from RG-I could induce pectin solubilization indirectly, by increasing wall porosity, allowing access of other hydrolase enzymes to their substrate (Paniagua et al. 2014). Overall, the galactosidase genes were down-regulated during cashew apple development, except one β -galactosidase gene (Anaoc.0007s0563) showed relation to peduncle softening of BRS 265 (Fig. 6A). Supporting this idea, the silencing of *Fa β Gal4* increased the galactose content in the cell wall of transgenic strawberry fruit, resulting in fruit firmer (Paniagua et al. 2016). Similarly, Smith et al. (2002) observed an increase in firmness of transgenic tomato fruit with a silenced β -galactosidase gene.

The hemicellulose is a common component of the cell wall. Its xyloglucan backbone is composed of β (1,4)-linked glucose residues that have α (1,6)-linked xylosyl side chains (Lampugnani et al. 2018). In our study, few hemicellulose related genes were differentially expressed during cashew apple development (Fig. 6C). Only one β -xylosidase gene (XYL; Anaoc.0006s1525) showed higher expression in ripe genotypes, while other β -xylosidase gene (Anaoc.0642s0001) was specifically up-regulated in CCP 76 ripe. Our data suggest these genes may be associated with removal of xylosyl groups present in branching chains of hemicellulose, contributing to softening of cashew apple. Figueiredo et al. (2002) found no significant reduction in hemicellulose content during development of CCP 76 cashew apple.

The activity of some enzymes such as expansins (EXP) and xyloglucosyltransferase/endohydrolase (XTH) allow the access of the cell wall hydrolases to the wall matrix glycan, playing important role in the fruit softening. In general, a total of six *EXP* was more expressed in the immature than ripe CCP 76 (Fig. 6D). On the other hand, the gene expression increase was noticed to two *EXP* (Anaoc.0011s0309 and Anaoc.0011s0308) during cashew apple development, which may be closely related to firmness loss in this fruit. With regard to

XTH, two genes (Anaoc.0019s0860 and Anaoc.0013s1113) expression increased dramatically (> 8-fold) at the ripe cashew apples (Fig. 6D). Additionally, the increased expression of two *XTH* (Anaoc.0008s1378 and Anaoc.1311s0001) and one *XTH* (Anaoc.0003s1889) in ripe cashew apple was noticed in BR vs BI and CR vs CI, respectively.

These enzymes work to fine-tune wall expansion and cell growth, while at the same time providing structural support and mechanical stability (Lampugnani et al. 2018). The high expression of *EXP* in immature fruit has been associated with the lignification process, suggesting there is a flux of water and nutrients from the tree through immature cashew apple to the nut (Yang et al. 2008; Carvajal et al. 2015). Notably, the highest number of up-regulated *EXP* in immature peduncle may be related to increased growth of CCP 76 in relation to BRS 265 cashew apple during fruit development (Choi et al. 2006). Besides, the later ripening process requires the presence of *EXP* and *XTH* to loosen the cell walls (Yu et al. 2012). The importance of these enzymes is due to *EXP* modifying the interactions between hemicellulose and cellulose, resulting in wall relaxation. Whereas *XTH* can cleave and re-ligate xyloglucan backbones, possibly incorporating new xyloglucan fragments into the cell wall (Cosgrove 2005; Eklof and Brumer 2010).

In tomato, the down-regulation of *SIEXPI* delayed fruit softening (Minoia et al. 2016). Likewise, the *EXP* seems to play an important role in mango softening since three *EXP* showed higher expression values (> 10-fold) from immature to ripe fruit (Srivastava et al. 2016). Moreover, the overexpression of the *FvXTH6* or *FvXTH9* in strawberry resulted in accelerated color change, faster ripening and decreased firmness compared to the control fruit (Witasari et al. 2019). On the other hand, the overexpression of the *SIXTH1* in tomato reduced fruit softening, suggesting that this gene could be involved in the maintenance of cell wall structure rather than cell wall disassembly (Miedes et al. 2010).

Cellulase is a complex enzyme formed by three different proteins: endoglucanase (*GH9*), exoglucanase and β -glucosidase. *GH9* and exoglucanase transform cellulose into small cellooligosaccharides and then β -glucosidase hydrolyzes the cellooligosaccharides into glucose (Sathya and Khan 2014; Sindhu et al. 2016). In our study were identified two up-regulated *GH9* (Anaoc.0002s0304 and Anaoc.0004s2299), highlighting the Anaoc.0004s2299 that showed approximately 12-fold increase in ripe cashew apples of both genotypes (Fig. 6E). In view of this, we speculate that above gene might be the main responsive to the cellulose degradation in cashew apples.

Besides cell wall disassembly, its biosynthesis also seems to affect its structure and then fruit softening. In cashew apple, genes related to cell wall biosynthesis were up-regulated exclusively during CCP 76 ripening

(Supplementary Table S5). Among them, we observed cellulose synthase genes and pectin matrix biosynthesis related genes (UDP-glucuronate 4-epimerase and polygalacturonate 4- α galacturonosyltransferase).

Simultaneous up-regulation of multiple genes of the same family during softening suggests the complexity of the softening process. In addition, although the two genotypes evaluated here share many DEGs in common, each genotype showed a specific firmness loss rate. BRS 265 cashew apples are firmer when immature and maintain more firmness than CCP 76 during all development (Fig. 1). According to our results, this behavior may be explained by some reasons. The high amount of *EXP* expressed in immature CCP 76 genotype can have contributed to higher size expansion due to intense intercellular relaxation accompanied by the water accumulation, resulting in lower firmness of this pseudofruit (Fig. 1 and 6). Throughout the development, continuous cell wall loosening is observed together with up-regulation (*PG*, *PL* and *PAE*) and down-regulation (*PMEI*) of many genes involved in the alteration in HG may contribute to softening of ripe CCP 76 cashew apple (Fig. 6). Besides this, the positive regulation of many genes involved in cell wall biosynthesis could signal an attempt to stop the excessive firmness loss in ripe CCP 76 (Fig. 6). Therefore, the differential expression changes in various cell wall modifying enzymes-coding genes in CCP 76 and BRS 265 cashew apple suggest differences in cell wall composition of these two genotypes.

3.6. Genes involved in the biosynthesis of anthocyanins in cashew apple

The mechanism of anthocyanins accumulation in cashew apple was estimated evaluating expression patterns of structural genes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. Overall, 34 DEGs encoding proteins related to these pathways were mainly more expressed in ripe cashew apples (Fig. 7).

Anthocyanins are generally synthesized via phenylpropanoid pathway, which constitutes the biosynthetic route most studied in detail among others that integrates the secondary metabolism in plants (Jaakola 2013). In this pathway, phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*), cinnamate-4-hydroxylase (*C4H*) and 4-coumaroyl-CoA ligase (*4CL*) catalyze the conversion of phenylalanine to 4-coumaroyl-CoA. In the present study, we identified that *PAL* was most expressed in ripe cashew apple, while *C4H* and *4CL* showed higher expression level in immature peduncles (Fig. 7). The *PAL* up-regulation can be related to anthocyanin content augmented in peduncles (Fig. 1C). Besides this, trans-cinnamic acid product of the *PAL* activity seems to be a precursor of flavor volatiles of Brazilian cashew apples (Talasila and Shaik 2015).

On the other hand, the up-regulation of *C4H* and *4CL* in immature fruit can be associated with lignin biosynthesis. Despite the lignin is not generally found in the pulp of fruit, pear (*Pyrus communis* L) and cashew

apple are exceptions because they are botanically considered as accessory being originated from floral receptacle and peduncle, respectively (Seymour et al. 2013). Consistent with this, some genes involved in monolignol biosynthesis were differentially expressed during cashew apple development (Supplementary Table S5).

The flavonoid pathway begins with the action of chalcone synthase (CHS), which is responsible by the condensation of one molecule of 4-coumaroyl-CoA and three molecules of malonyl-CoA, producing a chalcone (Jaakola 2013). Then, chalcone isomerase (CHI) subsequently catalyzes the stereo-specific cyclization of chalcones into flavanones. Regarding the *CHS*, five genes were more expressed in ripe cashew apple (Fig. 7). Interestingly, two *CHS* (Anaoc.0620s0006 and Anaoc.0620s0008) were abundantly expressed in BRS 265 compared to CCP 76 cashew apple, showing high log₂FC values between immature and ripe fruit, respectively. On the other hand, one *CHS* (Anaoc.0008s0742) and three *CHI* (Anaoc.0019s0714, Anaoc.0909s0007 and Anaoc.0011s0700) exhibited up-regulation only during CCP 76 development. Therefore, the results presented here suggest that *CHS* is associated with anthocyanin accumulation in BRS 265 genotype, while *CHS* and *CHI* could be related to increased anthocyanin in CCP 76 cashew apple. (Fig. 7).

In this point, the flavonoid pathway gain branches, where flavanones can be converted to isoflavones, flavones and dihydroflavonols due to the action of enzymes: isoflavone synthase (IFS), flavone synthase (FNS) and flavonoid 3'-monooxygenase (F3'H) or flavanone 3-hydroxylase (F3H), respectively (Grotewold 2006). In our study, four *F3'H* were up-regulated in ripe cashew apples, while *FNS* (Anaoc.0012s0035) showed a sharply increase (24-fold) mainly during CCP 76 development. In particular, F3H converts flavanone into the dihydrokaempferol (precursor of orange pelargonidin), which can be used by F3'H to produce dihydroquercetin (precursor of red cyanidin) (Chaves-Silva et al. 2018). These results suggest that flavones and dihydroflavonones biosynthesis are more active pathways inside flavonoids metabolism in cashew apples.

Dihydroflavonols can be oxidized either by flavonol synthase (FLS) to form flavonols or reduced by dihydroflavonol 4-reductase (DFR) to produce leucoanthocyanidins in the first dedicated step for anthocyanin biosynthesis (Li 2014). In our study, many *FLS* and *DFR* were more expressed in ripe cashew apple (Fig. 7). Interestingly, high *DFR* (Anaoc.0009s0342) expression was associated to high anthocyanin content in immature and ripe BRS 265 (red-peel genotype). In addition, one *FLS* (Anaoc.0017s0663) increased considerably in BR vs BI (12-fold) and CR vs CI (12.2-fold). Consistent with this, the FLS activity increased abruptly from immature to ripe cashew apple of CCP 76 genotype (Cunha et al. 2017). Cashew apples are known due to their high flavonol levels, which the flavonol myricetin was found as the main phenolic constituent, followed by quercetin and kaempferol (Bataglion et al. 2015). The increase in *FLS* expression correlated with flavonol accumulation

was reported in satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.), species that belong to Sapindales (the same order of cashew apple) (Moriguchia et al. 2002).

The expression imbalance of *DFR* and *FLS* may represent a key mechanism for regulating color tissue in plants. In this context, transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) overexpressing *PtDFR* displayed down-regulation of the endogenous *FLS*, and hence the anthocyanin synthesis, resulting in red flowers (Luo et al. 2016). Conversely, the abundance of flavonols increased when *FLS* was overexpressed or *DFR* was silenced in transgenic crabapple leaves (*Malus* spp.) (Tian et al. 2015). Thus, it is probable that the overexpression of *DFR* and *FLS* could repress each other (Luo et al. 2016).

Alternatively, leucoanthocyanidins, the products of *DFR* action, can follow two different pathways: (1) they can be converted into catechin (2,3-trans-flavan-3-ol) due to activity of the leucoanthocyanidin reductase (*LAR*) or (2) generate anthocyanidin by leucoanthocyanidin dioxygenase (*LDOX*) (Grotewold 2006). Curiously, we observed high *LAR* (Anaoc.0002s0626) and low *LDOX* (Anaoc.0015s0462) expression in ripe cashew apples (Fig. 7). In other words, the flow of leucoanthocyanidins seems to be more active to the production of catechin than anthocyanidin in ripe fruit. Similarly, transgenic tobacco overexpressing *TcLAR* had decreased anthocyanidin levels and increased catechin content, build unit of proanthocyanidin (PAs; also called condensed tannins) (Liu et al. 2013). Meanwhile, *LAR* was more highly expressed in green than red peel pear, which promoted the process of PAs pathway and contributed to the formation of green peel pear (Yang et al. 2015).

PAs have been of considerable interest in cashew apple because of their importance for the astringent flavor of this fruit (Das and Arora 2017). In cashew apple, a trace amount of delphinidin (type of anthocyanidin) was detected, whereas it was found the 927 mg kg⁻¹ of PAs constituted mainly of epigallocatechin associated with epicatechin units (Michodjehoun-Mestres et al. 2009b; Queiroz et al. 2011). Intriguingly, Cunha et al. (2017) did not detect *LAR* activity in cashew apples, while we observed the *LAR* up-regulation. This could be because increase in transcription were not being translated into proteins. Besides this, many authors did not notice leucoanthocyanidins, catechin or PAs in cashew apples, suggesting that characteristic bitter and astringent flavor of this fruit can be related to presence of the hydrolysable tannins as monogalloyl diglucoside and digalloyl glucoside (Brito et al. 2007; Marc et al. 2012).

Regarding flavonoid glucosylation, flavonols are almost exclusively glycosylated preferentially in 3-position of the hydroxyl group in fruit (Seymour et al. 2013). For instance, peduncles of cashew apple exhibited the tendency to having relatively high amounts of the glycosylated flavonols such as myricetin 3-o-glucoside, myricetin 3-o-rhamnoside, quercetin 3-o-rhamnoside and quercetin 3-o-galactoside (Gordon et al. 2012; Filho et

al. 2019). Meanwhile, anthocyanins are produced from anthocyanidin glucosylation, reaction that plays an important role in their stability and water solubility (Fang et al. 2019). In this study, we observed that flavonol 3-O-glucosyltransferase (UGT71C4; Anaoc.0001s1795) was down-regulated from immature to ripe cashew apple (Fig. 7). On the other hand, the up-regulation of anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase (UGT78D2; Anaoc.0008s1150) can be associated to increased anthocyanin content noticed during cashew apple development.

Overall, we attributed the limited number of DEGs related to anthocyanin biosynthesis found in this study to the sample composition since it consisted of a mixture of peel and pulp (made up mainly of pulp) of cashew apple. This might have mitigated the observation of genes related to color expressed mainly in the peel. Undoubtedly, peel is the richest tissue in pigments, since during fruit ripening occurs the alteration of its color due probably to an increase in the expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis (Schweiggert et al. 2016). For instance, the *LDOX* and *UGT* expressions were positively correlated with anthocyanin content in peel of pear and pulp of blood orange, both exhibit red tissues (Cotroneo et al. 2006; Yang et al. 2015). In accordance with this, the low expression of *UGT* in ripe strawberry was associated with the redirection of anthocyanin to PAs (Griesser et al. 2008).

Flavonoid biosynthesis is modulated mainly at the transcriptional level by transcription factors such as MYB, basic helix–loop–helix (bHLH) and WD40 families (Xu et al. 2015). Hence, MYB regulates flavonol biosynthesis, while MYB-bHLH-WD40 (MBW) ternary transcriptional complex activates the production of anthocyanin and PAs plants (Li 2014; Xu et al. 2015; Gonzalez et al. 2016). In our study, numerous *MYB* and *bHLH* transcription factors genes were identified as differentially expressed during cashew apple development (Supplementary Table S9). Interestingly, only one predicted *WD40* transcription factor (Anaoc.0002s2092) displayed increased expression in both ripe cashew apple genotypes.

It is known that different MYB family members can control separately the biosynthesis of different flavonoids. For instance, *MYB4* and *MYB32* were discovered by inducing lignin biosynthesis, acting as repressors of the anthocyanin pathway. Whereas *MYB7* and *MYB4* were found to repress the flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* (Preston et al. 2004; Fornalé et al. 2014). However, a recent study revealed that *MYB10* is a primary MYB candidate that activates anthocyanin accumulation in the peel pear, probably forming a functional complex with bHLH (Qian et al. 2017). Indeed, the *PgWD40* was induced up to 60-fold in black peel compared to acyanic peel of pomegranate fruit (*Punica granatum*), thus considered the main factor responsible for activating the expression of *PgDFR* and anthocyanin accumulation (Rouholamin et al. 2015).

The greatest transcriptomic differences related to flavonoid biosynthesis occurred during cashew apple

development. Supporting this idea, the up-regulation of the PAL, CHS, CHI, F3H/F3'H, DFR and UGT genes might be the reason for the anthocyanin accumulation in ripe fruit, while C4H and 4CL genes may be responsible by lignin biosynthesis in immature fruit (Fig. 1 and 7). Additionally, the differential expression of different genes involved in the flavonoid pathway suggests that cashew apples have different flavonoids accumulation (flavone, flavonol, flavanone and chalcone) during ripening. For instance, the lower expression of *LDOX* and the higher expression of *LAR* suggest that ripe cashew apple has more condensed tannins than anthocyanins.

Curiously, major transcriptomic differences between the orange-peel and red-peel cashew apple genotypes were not clearly shown for the anthocyanin accumulation. Although the BRS 265 cashew apple showed higher anthocyanin content than CCP 76 cashew apple, it was possible to observe genes related to this process just when comparing these fruit in immature stage (Fig. 1 and 7). Therefore, the differential expression of PAL, C4H and CHS genes can be associated with higher anthocyanin in immature BRS 265 cashew apple compared to immature CCP 76 cashew apple. Hence, these genes may be responsible for early high accumulation of anthocyanin in BRS 265 genotype. Regarding ripe stage, few anthocyanin related DEGs in pericarp of cashew apple happened because the pigment biosynthesis occurs mainly in peel of fruit, tissue where probably have a high gene expression of these genes. It could be interesting to study using just the peel of cashew apple to know more about the pigmentation process at its molecular level.

3.7. qRT-PCR and RNA-seq results show good correlation

The reliability of our RNA-seq data was validated by qRT-PCR (Fig. 8). In this regard, six candidate reference genes selected from RNA-seq results (*ACT*, *EIF*, *FBOX*, *RPOL*, *SAND* and *URK*) revealed average expression stability (M) value of 0.69 calculated by geNorm (Supplementary Figure S1). Thus, genes presenting M-values lower than the default limit of 1.5 were considered stable, as proposed by Vandesompele et al. (2002) suggesting that these six candidate genes are stable in both stages and genotypes. GeNorm also calculated the optimal number of genes suitable for normalization and returned the V_n/V_{n+1} value of sequential combinations (Hellemans et al. 2007). Among the six stable genes, just three reference genes were enough to data normalization, since $V_{3/4}$ value was 0.13, below the adopted threshold value of 0.15 (Vandesompele et al. 2002). The best combination of genes for total samples of cashew apple development was *RPOL*, *SAND* and *ACT* (Supplementary Figure S1).

After, the expression of six genes related to flavonoids biosynthesis (*FLS*, *LAR* and *PAL*) and cell-wall

disassembling (*PG*, *PL* and *XTH*) during cashew apple development were evaluated using qRT-PCR (Fig. 8). Five target genes revealed positive and high Pearson's correlation coefficient ($r > 0.975$) between RNA-seq and qRT-PCR results, with exception of *XTH* that showed lower correlation ($r = 0.369$). Anyway, the *XTH* presented a positive correlation coefficient, indicating that the expression of this gene in both techniques showed the same direction. Thus, these results corroborate the reliability of results originated with RNA-seq technique.

4. Conclusion

In summary, the present study shows a comparative transcriptome analysis of two contrasting cashew apple genotypes (CCP 76 and BRS 265) in order to explore key genes involved in specific traits (firmness and flavonoid content). To our best knowledge, the present study is the first to report the transcriptomic sequencing of peduncle of cashew apples. Through transcriptome analyses, we provided a comprehensive understanding of the major pathway involved in development of cashew apple, and hence responsible by fruit changes. In flavonoid biosynthesis and cell wall disassembly specifically, we identified genes that can potentially contribute to improvement of these metabolisms during cashew apple ripening. In addition, our results contribute to the elucidation of molecular mechanisms involved in the regulation of these metabolisms in fruit. Furthermore, we showed key genes that can be interesting to highlight the uniqueness of each studied genotype and can provide a knowledge guide for improving quality traits. Therefore, our findings provide a handout in developing genotypes by genetic manipulation of the desired trait, reducing the risk of sharp softening and valorization in commercial cashew production.

Data availability

The sequencing project has been deposited at the SRA database under the accession number PRJNA657300.

Declarations of interest

All authors read the manuscript and declare no conflict of interest.

Funding

This research was supported by INCT, CNPq, FAPESP and CAPES.

References

- Afzal M, Alghamdi SS, Migdadi HH, Khan MA, Mirza SB, El-Harty E (2020) Legume genomics and transcriptomics: From classic breeding to modern technologies. *Saudi J Biol Sci* 27:543-555.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402.
- Anders S, Pyl PT, Huber W (2015) HTSeq: a Python framework to work with high throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31:166-169.
- Andrews S (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available in: <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>>.
- Bataglioni GA, Silva FM, Eberlin MN, Koolen HH (2015) Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC–MS/MS. *Food Chem* 180: 280-287.
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc* 57:289–300.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* 30: 2114–2120.
- Brito ES, Araújo MCP, Lin L, Harnly J (2007) Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) by LC-DAD-ESI/MS. *Food Chem* 105:1112-1118.
- Brummell DA (2006) Cell wall disassembly in ripening fruit. *Funct Plant Biol* 33:103–119.
- Carvajal F, Palma F, Jamilena M, Garrido D (2015) Cell wall metabolism and chilling injury during postharvest cold storage in zucchini fruit. *Postharvest Biol Technol* 108:68-77.
- Carvalho DV, Santos FA, Lima RP, Viana AFSC, Fonseca SGC, Nunes PIG, Melo TS, Gallão MI, Brito ES (2018) Influence of low molecular weight compounds associated to cashew (*Anacardium occidentale* L.) fiber on lipid metabolism, glycemia and insulinemia of normal mice. *Bioact Carbohydr Diet Fibre* 13:1-6.
- Chaves-Silva S, Santos AL, Chalfun-Júnior A, Zhao J, Peres LEP, Benedito VA (2018) Understanding the genetic regulation of anthocyanin biosynthesis in plants – Tools for breeding purple varieties of fruits and vegetables. *Phytochemistry* 153:11-27.
- Choi D, Cho H, Lee Y (2006) Expansins: expanding importance in plant growth and development. *Physiol Plant* 126:511-518.
- Cosgrove DJ (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:850-861.
- Cotroneo PS, Russo MP, Ciuni M, Recupero GR, Piero ARL (2006) Quantitative real-time reverse transcriptase-

- PCR profiling of anthocyanin biosynthetic genes during orange fruit ripening. *J Am Soc Hortic Sci* 131:537-543.
- Cunha AG, Brito ES, Moura CFH, Ribeiro PRV, Miranda MRA (2017) UPLC-qTOF-MS/MS-based phenolic profile and their biosynthetic enzyme activity used to discriminate between cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) maturation stages. *J Chromatogr B* 1051:24-32.
- Das I, Arora A (2017) Post-harvest processing technology for cashew apple – A review. *J Food Eng* 194:87-98.
- Deshpande AB, Anamika K, Jha V, Chidley HG, Oak PS, Kadoo NY, Pujari KH, Giri AP, Gupta VS. (2017) Transcriptional transitions in Alphonso mango (*Mangifera indica* L.) during fruit development and ripening explain its distinct aroma and shelf life characteristics. *Sci Rep* 7:1-19.
- Dos Santos CP, Batista MC, da Cruz Saraiva KD, Roque ALM, Miranda, RS, Silva LMA, Moura CFH, Filho EGA, Canuto KM, Costa JH (2019) Transcriptome analysis of acerola fruit ripening: insights into ascorbate, ethylene, respiration, and softening metabolisms. *Plant Mol Biol* 101: 269-296.
- Eklof JM, Brumer H (2010) The XTH gene family: an update on enzyme structure, function, and phylogeny in xyloglucan remodeling. *Plant Physiol* 153:456-466.
- Fang Z, Hou Z, Wang S, Liu Z, Wei S, Zhang Y, Song J, Yin J (2019) Transcriptome analysis reveals the accumulation mechanism of anthocyanins in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) cotyledons and flowers. *Int J Mol Sci* 20:1493, 2019.
- FAOSTAT (2018) Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome, Italy.
- Figueiredo RW, Lajolo FM, Alves RE, Filgueiras HAC, Araújo NCC (2001) Alterações de firmeza, pectinas e enzimas pectinolíticas durante o desenvolvimento e maturação de pedúnculos de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L. var *nanum*) CCP 76. *Proc Am Soc Hortic Sci Trop* 43:82-86.
- Filho EA, Silva LM, Lima Y, Ribeiro P, Silva E, Zocolo G, Canuto K, Morais S, Castro AC, Brito E (2019) Metabolomic Variability of Different Genotypes of Cashew by LC-MS and Correlation with Near-Infrared Spectroscopy as a Tool for Fast Phenotyping. *Metabolites*, 9:121.
- Fornalé S, Lopez E, Salazar-Henao JE, Fernández-Nohales P, Rigau J, Caparros-Ruiz D (2014) AtMYB7, a new player in the regulation of UV-sunscreens in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 55:507-516.
- Garcia-Gago JA, Posé S, Muñoz-Blanco J, Quesada MA, Mercado JA (2009) The polygalacturonase FaPG1 gene plays a key role in strawberry fruit softening. *Plant Signal Behav* 4:766-768.
- Giusti MM, Wrolstad RE (2001) Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* 1:F1. 2.1-F1. 2.13.
- Gonzalez M, Salazar E, Cabrera S, Olea P, Carrasco B (2016) Analysis of anthocyanin biosynthesis genes expression profiles in contrasting cultivars of Japanese plum (*Prunus salicina* L.) during fruit development.

Gene Expr Patterns 21:54-62.

Gordon A, Friedrich M, Matta VM, Moura CFH, Marx F (2012) Changes in phenolic composition, ascorbic acid and antioxidant capacity in cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) during ripening. *Fruits* 67:267-276.

Goulao LF, Oliveira CM (2008) Cell wall modification during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends Food Sci Technol* 19:4–25.

Griesser M, Vitzthum F, Fink B, Bellido ML, Raasch C, Munoz-Blanco J, Schwab W (2008) Multi-substrate flavonol O-glucosyltransferases from strawberry (*Fragaria x ananassa*) achene and receptacle. *J Exp Bot* 59:2611-2625.

Grotewold E (2006) *The science of flavonoids*. New York: Springer, 274 p.

Hellemans J, Mortier G, Paeppe A, Speleman F, Vandesompele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 8:R19.

Ibrahim RK, Muzac I (2000) The methyltransferase gene superfamily: a tree with multiple branches. *Recent Adv Phytochem* 34:349-384.

Jaakola L (2013) New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trends Plant Sci* 18:477-483.

Jiménez-Bermúdez S, Redondo-Nevado J, Muñoz-Blanco J, Caballero JL, López-Aranda JM, Valpuesta V, Pliego-Alfaro F, Quesada MA, Mercado JA (2002) Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiol* 128:751–759.

Kanehisa M, Goto S (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 28:27-30.

Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL (2013) TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* 14:R36.

Lampugnani ER, Khan GA, Somssich M, Persson S (2018) Building a plant cell wall at a glance. *J Cell Sci* 131:jcs207373.

Langmead B, Salzberg SL (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9:357-359.

Li S (2014) Transcriptional control of flavonoid biosynthesis. Fine-tuning of the MYB-bHLH-WD40 (MBW) complex. *Plant Signal Behav* 9:e27522.

Liu GL, Guo HH, Sun YM (2012) Optimization of the Extraction of Anthocyanins from the Fruit Skin of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk and Identification of Anthocyanins in the Extract Using High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (HPLC-ESI-MS). *Int J Mol Sci* 13:6292-6302.

- Liu Y, Shi Z, Maximova S, Payne MJ, Gultinan MJ (2013) Proanthocyanidin synthesis in *Theobroma cacao*: genes encoding anthocyanidin synthase, anthocyanidin reductase and leucoanthocyanidin reductase. *BMC Plant Biol* 13:202.
- Lopes MMA, Moura CFH, Aragão FAZ, Cardoso TG, Filho JE (2011) Caracterização física de pedúnculos de clones de cajueiro anão precoce em diferentes estádios de maturação. *Rev Ciênc Agron* 42.
- Lopes MMA, Miranda MRA, Moura CFH, Filho JE (2012) Bioactive compounds and total antioxidant capacity of cashew apples (*Anacardium occidentale* L.) during the ripening of early dwarf cashew clones. *Cienc Agrot* 36.
- Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15:550.
- Luo P, Ning G, Wang Z, Shen Y, Jin H, Li P, Huang S, Zhao J, Bao M (2016) Disequilibrium of Flavonol Synthase and Dihydroflavonol-4-Reductase Expression Associated Tightly to White vs. Red Color Flower Formation in Plants. *Front Plant Sci* 13:1257.
- Ma L, Sun L, Guo Y, Lin H, Liu Z, Li K, Guo X (2020) Transcriptome analysis of table grapes (*Vitis vinifera* L.) identified a gene network module associated with berry firmness. *PLoS one* 15:e0237526.
- Marc A, Ange KD, Achille TF, Georges AN (2012) Phenolic profile of cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.) from Yamoussoukro and Korhogo (Côte d'Ivoire). *J Appl Biosci* 49:3331-3338.
- Marshall OJ (2004) PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* 20:2471-2472.
- Mercado JA, Pliego-Alfaro F, Quesada MA (2011) Fruit shelf life and potential for its genetic improvement. *Breeding for Fruit Quality*, p. 81–104.
- Michodjehoun-Mestres L, Amraoui W, Brillouet JM (2009a) Isolation, characterization, and determination of 1-O-trans-cinnamoyl- β -D-glucopyranose in the epidermis and flesh of developing cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) and four of its genotypes. *J Agric Food Chem* 57:1377-1382.
- Michodjehoun-Mestres L, Souquet J, Fulcrand H, Bouchut C, Reynes M, Brillouet J (2009b) Monomeric phenols of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). *Food Chem* 112:851-857.
- Miedes E, Herbers K, Sonnewald U, Lorences EP (2010) Overexpression of a cell wall enzyme reduces xyloglucan depolymerization and softening of transgenic tomato fruits. *J Agric Food Chem* 58:5708-5713.
- Minoia S, Boualem A, Marcel F, Troadec C, Quemener B, Cellini F, Petrozza A, Vigouroux J, Lahaye M, Carriero F, Bendahmane A (2016) Induced mutations in tomato *SlExp1* alter cell wall metabolism and delay fruit softening. *Plant Sci* 242:195-202.
- Molina-Hidalgo FJ, Franco AR, Villatoro C, Medina-Puche L, Mercado JA, Hidalgo MA, Monfort A, Caballero

- JL, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R (2013) The strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) fruit-specific rhamnogalacturonate lyase 1 (*FaRGLyase1*) gene encodes an enzyme involved in the degradation of cell-wall middle lamellae. *J Exp Bot* 64:1471-1483.
- Moo-Huchin VM, Estrada-Mota I, Estrada-Léon R, Cuevas-Glory L, Ortiz-Vázquez E, Vargas MLV, Betancur-Ancona D, Sauri-Duch E (2014) Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chem* 152:508-515.
- Moriguchia T, Kita M, Ogawa K, Tomono Y, Endo T, Omura M (2002) Flavonol synthase gene expression during citrus fruit development. *Physiol Plant* 114:251-258.
- Moura CFH, Figueiredo RW, Alves RE, Silva ED, Araujo PGL, Maciel VT (2010) Increasing shelf life of early dwarf cashew tree peduncle through reduction of storage temperature. *Cienc Agrotec* 34:140-145.
- Obanda M, Owuor PO, Taylor SJ (1997) Flavanol composition and caffeine content of green leaf as quality potential indicators of Kenyan black teas. *J Sci Food Agric* 74:209-215.
- Oliveira NN, Mothé CG, Mothé MG, Oliveira LG (2020) Cashew nut and cashew apple: a scientific and technological monitoring worldwide review. *J Food Sci Technol* 57:12-21.
- Paniagua C, Posé S, Morris VJ, Kirby AR, Quesada MA, Mercado JA (2014) Fruit softening and pectin disassembly: an overview of nanostructural pectin modifications assessed by atomic force microscopy. *Ann Bot* 114:1375–1383.
- Paniagua C, Blanco-Portales R, Barceló-Muñoz M, García-Gago JA, Waldron KW, Quesada MA, Muñoz-Blanco J, Mercado JÁ (2016) Antisense down-regulation of the strawberry β -galactosidase gene *Fa β Gal4* increases cell wall galactose levels and reduces fruit softening. *J Exp Bot* 67:619-631.
- Pei M, Gu C, Zhang S (2019) Genome-wide identification and expression analysis of genes associated with peach (*Prunus persica*) fruit ripening. *Sci Hortic* 246:317-327.
- Popper ZA, Fry SC (2005) Widespread occurrence of a covalent linkage between xyloglucan and acidic polysaccharides in suspension-cultured angiosperm cells. *Ann Bot* 96:91-99.
- Prasanna V, Prabha TN, Tharanathan RN (2007) Fruit ripening phenomena – an overview. *Crit Rev Food Sci* 47:1-19.
- Preston J, Wheeler J, Heazlewood J, Li SF, Parish RW (2004) *AtMYB32* is required for normal pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 40:979-995.
- Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR (2007) NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res* 35:501– 504.
- Qian M, Ni J, Niu Q, Bai S, Bao L, Li J, Sun Y, Zhang D, Teng Y (2017) Response of miR156-SPL module

during the red peel coloration of bagging-treated Chinese sand pear (*Pyrus pyrifolia Nakai*). *Front Physiol* 8:550.

Queiroz C, Silva AJR, Lopes MLM, Fialho E, Valente-Mesquita VL (2011) Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) after processing. *Food Chem* 125:128-132.

Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139-140.

Rouholamin S, Zahedi B, Nazarian-Firouzabadi F, Saei A (2015) Expression analysis of anthocyanin biosynthesis key regulatory genes involved in pomegranate (*Punica granatum* L.). *Sci Hortic* 186:84-88.

Sathya TA, Khan M (2014) Diversity of glycosyl hydrolase enzymes from metagenome and their application in food industry. *J. Food Sci* 79:2149-2156.

Savadi S, Muralidhara BM, Preethi P (2020) Advances in genomics of cashew tree: molecular tools and strategies for accelerated breeding. *Tree Genet* 16:1-15.

Schweiggert RM, Vargas E, Conrad J, Hempel J, Gras CC, Ziegler JU, Mayer A, Jiménez V, Esquivel P, Carle R (2016) Carotenoids, carotenoid esters, and anthocyanins of yellow-, orange-, and red-peeled cashew apples (*Anacardium occidentale* L.). *Food Chem* 200:274-282.

Seymour G, Tucker GA, Poole M, Giovannoni J (2013) The molecular biology and biochemistry of fruit ripening. John Wiley & Sons, 177-179.

Sindhu R, Binod P, Pandey A (2016) Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—An overview. *Bioresour Technol* 199:76-82.

Smith DL, Abbott JA, Gross KC (2002) Down-regulation of tomato β -galactosidase 4 results in decreased fruit softening. *Plant physiol* 129:1755-1762.

Souza KO, Viana RM, Oliveira LS, Moura CFH, Miranda MRA (2016) Preharvest treatment of growth regulators influences postharvest quality and storage life of cashew apples. *Sci Hortic* 209:53-60.

Srivastava S, Singh RK, Pathak G, Goel R, Asif MH, Sane AP, Sane VA (2016) Comparative transcriptome analysis of unripe and mid-ripe fruit of *Mangifera indica* (var. “Dashehari”) unravels ripening associated genes. *Sci Rep* 6:1-13.

Sun L, Zhang Y, Cui H, Zhang L, Sha T, Wang C, Fan C, Luan F, Wang X (2020) Linkage Mapping and Comparative Transcriptome Analysis of Firmness in Watermelon (*Citrullus lanatus*). *Front Plant Sci* 11:831.

Swain T, Hillis WE (1959) Phenolic constituents of *Prunus domestica* in quantitative analysis of phenolic constituents. *J Sci Food Agric* 10:63–68.

Talasila U, Shaik KB (2015) Quality, spoilage and preservation of cashew apple juice: A review. *J Food Sci*

Technol 52:54-62.

Tamiello-Rosa CS, Cantu-Jungles TM, Iacomini M, Cordeiro LM (2019) Pectins from cashew apple fruit (*Anacardium occidentale*): Extraction and chemical characterization. *Carbohydr Res* 483:107752.

Tian J, Han Z, Zhang J, Hu Y, Song T, Yao Y (2015) The Balance of Expression of Dihydroflavonol 4-reductase and Flavonol Synthase Regulates Flavonoid Biosynthesis and Red Foliage Coloration in Crabapples. *Sci Rep* 5:12228.

Ulusik S, Chapman NH, Smith R, Poole M, Adams G, Gillis RB, Besong TMD, Sheldon J, Stieglmeier S, Perez L et al. (2016) Genetic improvement of tomato by targeted control of fruit softening. *Nat. Biotechnol* 34:950-952.

Vandesompele J, Preter K, Pattyn F, Poppe B, Vanroy N, Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3.

Vasconcelos MS, Gomes-Rochette NF, Oliveira MLM, Nunes-Pinheiro DCS, Tomé AR, Sousa FYM, Pinheiro FGM, Moura CFH, Miranda MRA, Mota EF, Melo DF (2015) Anti-inflammatory and wound healing potential of cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.) in mice. *Exp Biol Med* 240:1648-1655.

Wang D, Samsulrizal NH, Yan C, Allcock NS, Craigon J, Blanco-Ulate B, Ortega-Salazar I, Marcus SE, Bagheri HM, Perez-Fons L, Fraser PD, Foster T, Fray R, Knox JP, Seymour GB (2019) Characterization of CRISPR mutants targeting genes modulating pectin degradation in ripening tomato. *Plant Physiol* 179:544-557.

Witasari LD, Huang F, Hoffmann T, Rozhon W, Fry SC, Schwab W (2019) Higher expression of the strawberry xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase genes Fv XTH 9 and Fv XTH 6 accelerates fruit ripening. *Plant J* 100:1237-1253.

Wu Y, Guo J, Zhou Q, Xin Y, Wang G, Xu L (2018) De novo transcriptome analysis revealed genes involved in flavonoid biosynthesis, transport and regulation in *Ginkgo biloba*. *Ind Crops Prod* 124:226-235.

Xie C, Mao X, Huang J, Ding Y, Wu J, Dong S, Kong L, Gao G, Li C, Wei L (2011) KOBAS 2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases. *Nucleic Acids Res* 39:W316–W322.

Xu W, Dubos C, Lepiniec L (2015) Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes. *Trends Plant Sci* 20:176-185.

Yang S, Sun C, Wang P, Shan L, Cai C, Zhang B, Zhang W, Li X, Ferguson I, Chen K (2008) Expression of expansin genes during postharvest lignification and softening of ‘Luoyangqing’ and ‘Baisha’ loquat fruit under different storage conditions. *Postharvest Biol Technol* 49:46-53.

Yang Y, Yao G, Yue W, Zhang S, Wu J (2015) Transcriptome profiling reveals differential gene expression in proanthocyanidin biosynthesis associated with red/green skin color mutant of pear (*Pyrus communis* L.). *Front Plant Sci* 6:795.

Yang L, Huang W, Xiong F, Xian Z, Su D, Ren M, Li Z (2017) Silencing of *S1PL*, which encodes a pectate lyase in tomato, confers enhanced fruit firmness, prolonged shelf-life and reduced susceptibility to grey mould. *Plant Biotechnol J* 15:1544-1555.

Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A (2010) Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biol* 11:R14.

Yu K, Xu Q, Da X, Guo F, Ding Y, Deng X (2012) Transcriptome changes during fruit development and ripening of sweet orange (*Citrus sinensis*). *BMC genomics* 13:10.

Zykwinska AW, Ralet MCJ, Garnier CD, Thibault JFJ (2005) Evidence for *in vitro* binding of pectin side chains to cellulose. *Plant Physiol* 139:397-407.

Figure caption:

Fig. 1 The morphology of fruit, firmness and anthocyanin content in two cashew apples genotypes. **(A)** BRS 265 and CCP 76 cashew apples at two development stages (2 and 7). Scale bar = 2 cm. **(B)** Firmness and **(C)** total anthocyanin contents of cashew apples. For each genotype and developmental stage, different capital letters indicate significant differences between developmental stages, while different lowercase letters indicate significant differences between genotypes, at $P < 0.05$. Vertical bars represent standard errors of the means ($n=3$).

Fig. 2 Principal component analysis (PCA) and heatmap of gene expression analysis. **(A)** PCA plot based on the normalized counts. Colored points inside the clusters represent biological replicates from different genotypes. Values indicated on the axis of the factor map correspond to the percentage of total variance explained by each axis (PC1 and PC2). **(B)** Heatmap showing the Euclidean distances between the samples calculated from the regularized log transformation. Color from white to dark blue indicates increasing similarity between biological replicates. BI: BRS 265 immature; BR: BRS 265 ripe; CI: CCP 76 immature; CR: CCP 76 ripe.

Fig. 3 The numbers of differentially expressed genes (DEGs) during the cashew apple development. **(A)** Numbers of DEGs in pairwise comparisons in immature and ripe of two different genotypes of cashew apple. Blue and red bars represent down and up-regulated DEGs, respectively. **(B)** Venn diagram showing the number of commonly and uniquely DEGs during CCP 76 and BRS 265 cashew apple development. Blue and red numbers into graph represent down and up-regulated DEGs, respectively. BI: BRS 265 immature; BR: BRS 265 ripe; CI: CCP 76 immature; CR: CCP 76 ripe.

Fig. 4 GO enrichment circle plots for the top 10 most significant GO categories for each comparison. **(A)** GO analysis of DEGs between BR vs BI. **(B)** GO analysis of DEGs between CR vs CI. **(C)** The associated tables present the GO term ID and function. Similar GO categories for two genotypes are bold. The outer circle shows the relative log₂ fold change values for each gene: red and blue points showing up and down-regulated genes. The inner quadrants are colored based on the z-score (relation between the number of up and down-regulated genes) and their size based on the enrichment p-value: larger surface, lower the p-value and vice versa.

Fig. 5 Top 19 metabolic pathways most represented during the cashew apple development according to the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Black and gray bars represent the percentage of DEGs

calculated in relation to the number of enzyme families of each pathway (indicated by the Enzyme Commission number) to BRS 265 ripe (BR) vs BRS 265 immature (BI) and CCP 76 ripe (CR) vs CCP 76 immature (CI) comparisons, respectively. Only those pathways with corrected $P < 0.05$ are shown.

Fig. 6 Modulation of genes related to cell wall disassembly during cashew apple development. These genes code enzymes responsible for (A) inhibition/degradation of side and (B) main chain of homogalacturonan; (C) degradation of hemicellulose chain, (D) cell wall relaxation and (E) degradation of cellulose chain. A color scale bar is shown at the top-right of the figure and corresponds to log₂ fold change values. Blue indicates the lowest expression and red indicates the highest expression. Asterisks indicate DEGs (genes that present $|\log_2 \text{fold-change}| > 1$ and corrected p-value threshold of 0.05) between stages and genotypes. Log₂ fold change values were used to compare libraries: BI (BRS 265 immature), BR (BRS 265 ripe), CI (CCP 76 immature) and CR (CCP 76 ripe).

Fig. 7 Modulation of flavonoid pathway during cashew apple development. A color scale bar is shown at the top-right of the figure and corresponds to log₂ fold change values. Blue indicates the lowest expression and red indicates the highest expression. Asterisks indicate DEGs (genes that present $|\log_2 \text{fold-change}| > 1$ and corrected p-value threshold of 0.05) between stages and genotypes. Log₂ fold change values were used to compare libraries: BI (BRS 265 immature), BR (BRS 265 ripe), CI (CCP 76 immature) and CR (CCP 76 ripe). PAL: phenylalanine ammonia-lyase; C4H: cinnamate-4-hydroxylase; 4CL: 4-coumaroyl-CoA ligase; CHS: chalcone synthase; CHI: chalcone isomerase; IFS: isoflavone synthase; FNS: flavone synthase; F3'H: flavonoid 3'-monooxygenase; F3H: flavanone 3-hydroxylase; DFR: dihydroflavonol 4-reductase; FLS: flavonol synthase; FLG: flavonol 3-o-glucosyltransferase; LDOX: leucoanthocyanidin dioxygenase; GT: anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase; ANR: anthocyanidin reductase; LAR: leucoanthocyanidin reductase.

Fig. 8 Expression of genes related to anthocyanin biosynthesis and cell wall disassembling quantified by RNA-seq (RNA sequencing) and qRT-PCR (Quantitative real-time PCR) analysis. The left y axis represents the relative gene expression levels analyzed by qRT-PCR (black columns) and the right y axis indicates the FPKM value from RNA sequencing (RNA-seq) data (white columns). The results were represented as mean \pm standard deviation (n=3). The r letter indicates the Pearson's correlation coefficient. FLS: flavonol synthase; LAR: leucoanthocyanidin reductase; PAL: phenylalanine ammonia-lyase; PG: polygalacturonase; PL: pectate lyase;

XTH: xyloglucosyltransferase/endohydrolase.

Supplementary Figure 1 Supplementary. geNorm analyses. **(A)** Average expression stability values of candidate reference genes and **(B)** determination of the optimal number of candidate reference genes for normalization.

Supplementary Table 1 Number of filters reads mapped to cashew tree genome.

Supplementary Table 2 Primer sequence, optimal annealing temperature and amplicon size of each evaluated gene in this study.

Supplementary Table 3 Normalized counts in Fragments Per Kilobase Million (FPKM).

Supplementary Table 4 Summary of sequencing and data mapping. Total raw reads; total filter reads; Q30 percentage: proportion of nucleotides with quality value > 30; GC content percentage: GC content of total nucleotides; Mapped reads (%).

Supplementary Table 5 Identified differentially expressed genes (DEGs) to each studied comparison in this study. The first column of table shows gene ID followed by its base mean, log₂ fold change value, *P*-value, adjusted *P*-value and differential expression (up or downregulated). BI: BRS 265 immature; BR: BRS 265 ripe; CI: CCP 76 immature; CR: CCP 76 ripe.

Supplementary Table 6 Common and exclusive differentially expressed genes (DEGs) during CCP 76 and BRS 265 cashew apple development. The table consists of gene ID and its identification in relation to *Arabidopsis thaliana* to each studied comparison. BI: BRS 265 immature; BR: BRS 265 ripe; CI: CCP 76 immature; CR: CCP 76 ripe.

Supplementary Table 7 GO enrichment analysis during the cashew apple development. The table consists of name and ID of GO term, besides its gene ontology classes: biological process (BP), cellular component (CC) and molecular function (MF). Over and under represented *P*-value calculated to each GO term based on

information present in fourth and fifth columns. Only those GO terms with over represented P -value < 0.05 are shown. The fourth column lists the number of up and downregulated genes to the studied comparisons assigned to each GO term. The fifth column lists the number of background genes mapped to each GO term. The last column shows the ID of DEGs enriched each GO term.

Supplementary Table 8 Enriched metabolic pathways represented during the cashew apple development according to the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). The first three columns show the name, database and ID of pathways. The fourth column lists the number of up or downregulated genes to the studied comparisons assigned to each pathway. The fifth column lists the number of background genes mapped to each pathway. The last columns list the P -value and corrected P -value of the statistical test, genes names and hyperlink to visualization of genes pathway in website. BI: BRS 265 immature; BR: BRS 265 ripe; CI: CCP 76 immature; CR: CCP 76 ripe.

Supplementary Table 9 Gene ID, transcription factor family, best hit in *Arabidopsis thaliana*, e-value and description for the best hit in each studied comparison in this study.

Fig1.

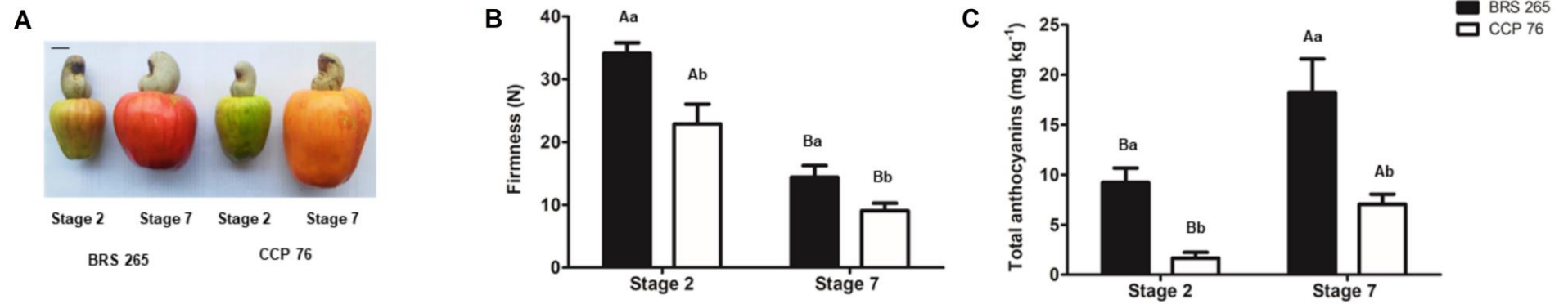
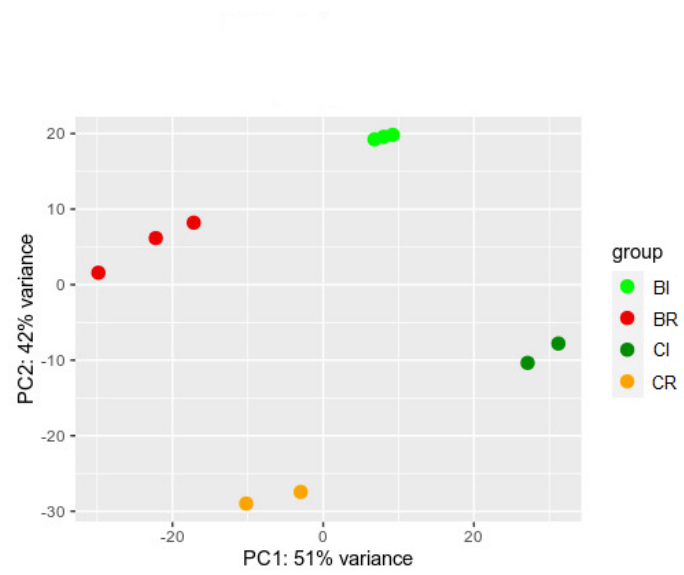


Fig2.

A



B

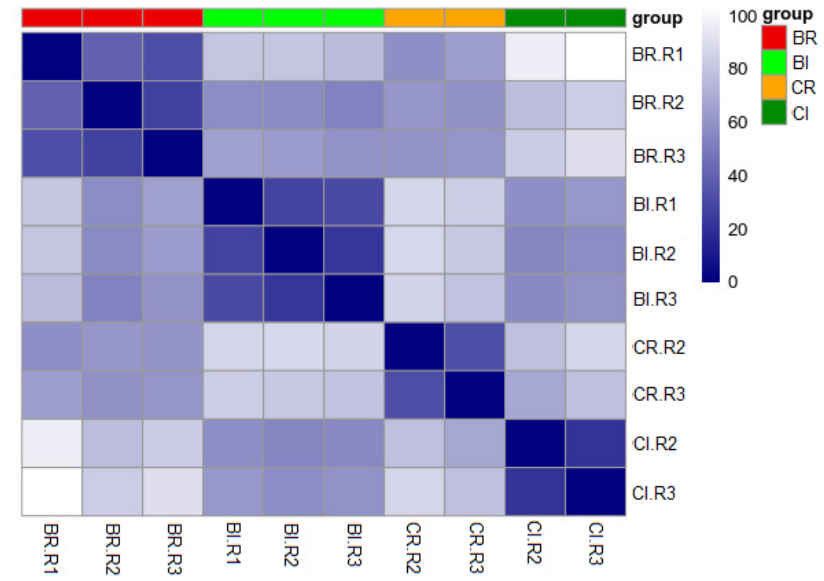


Fig3.

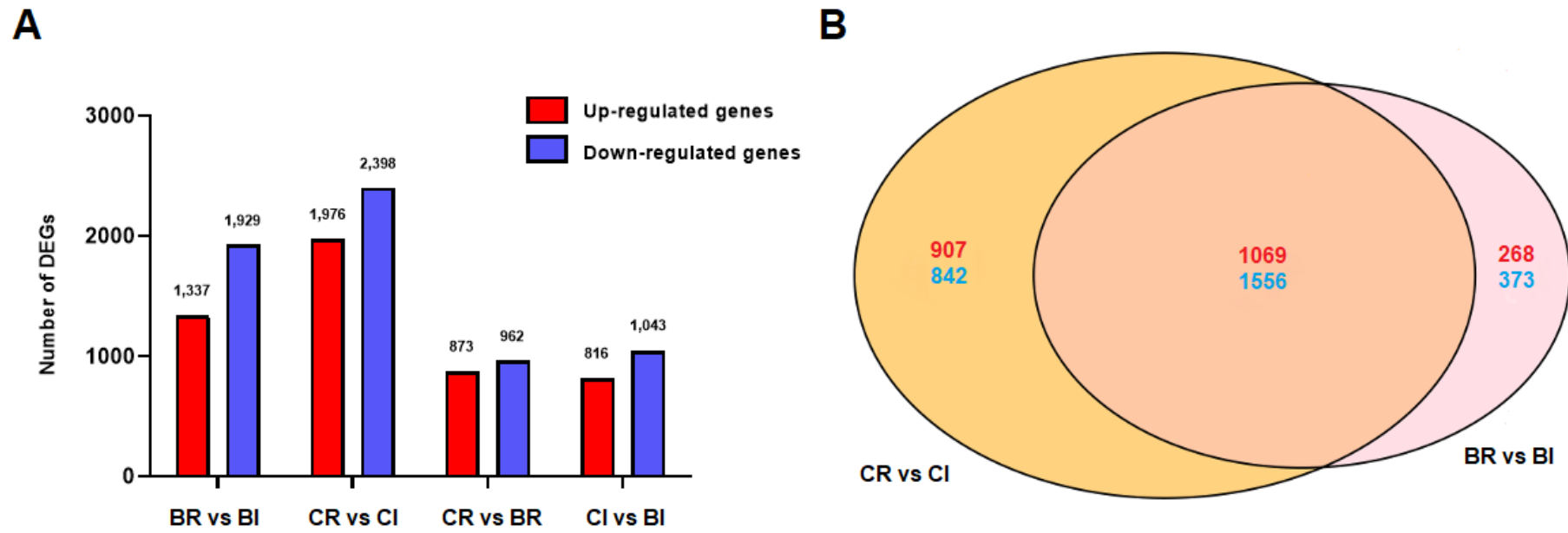


Fig4.

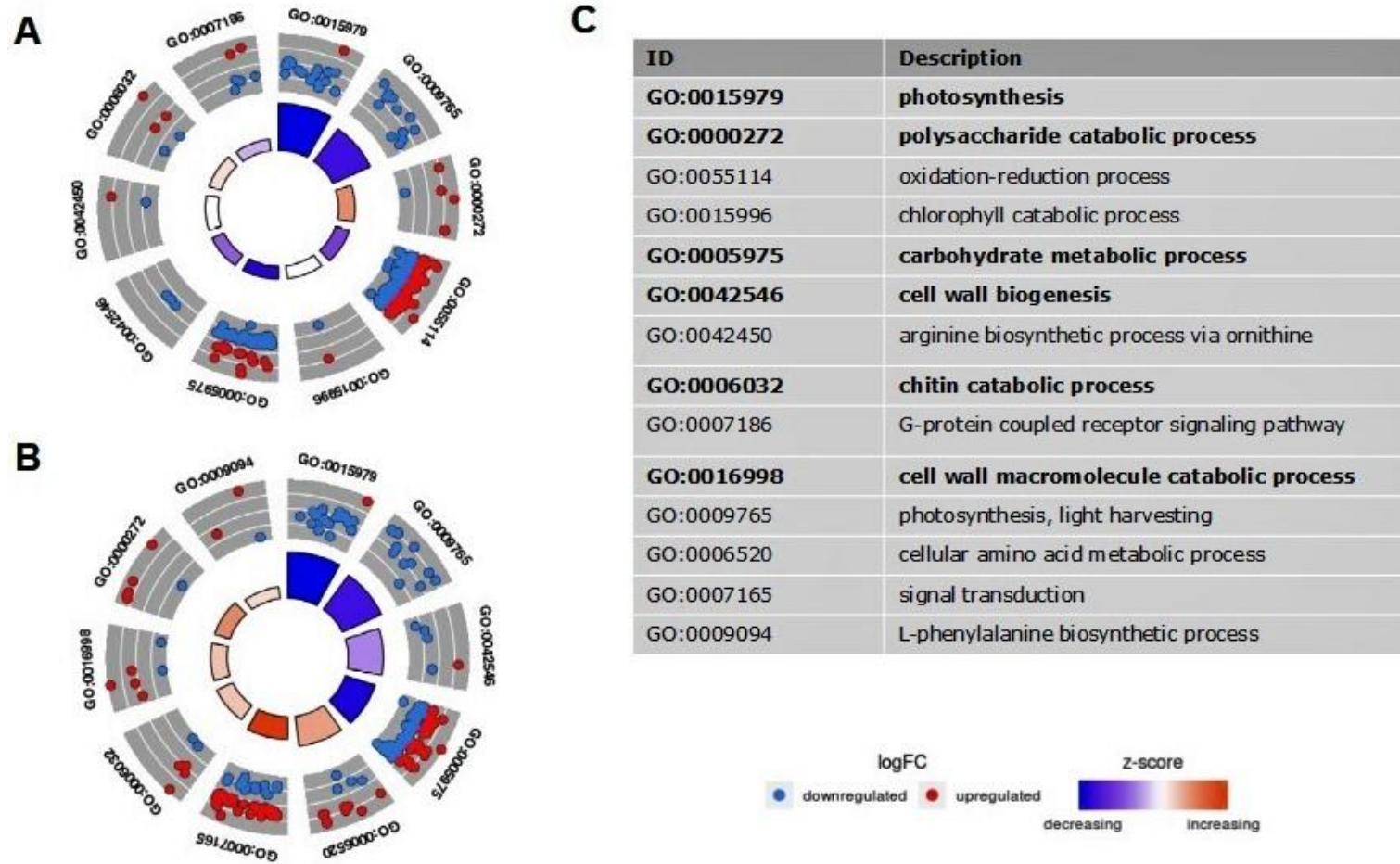


Fig5.

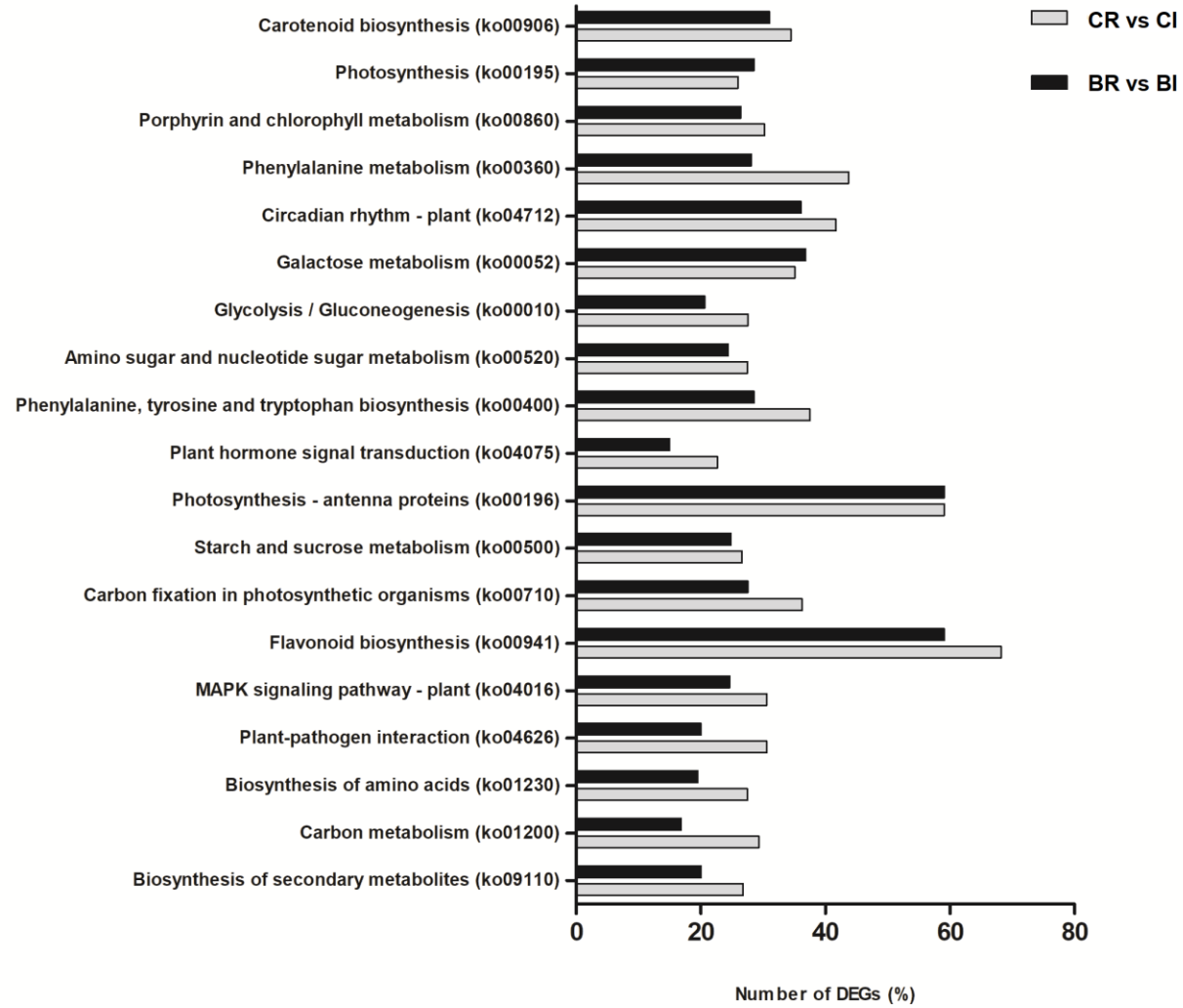


Fig6.

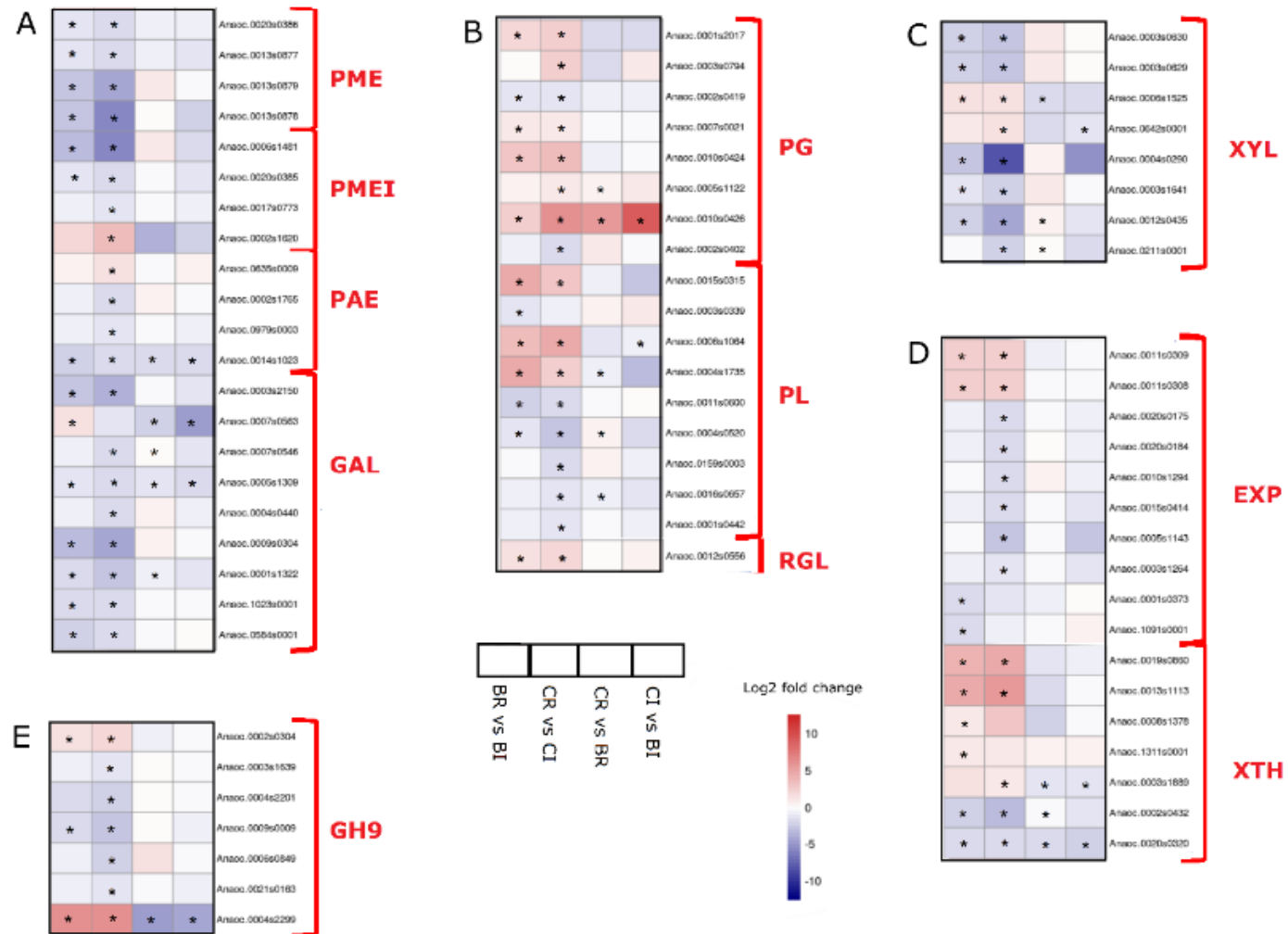


Fig7.

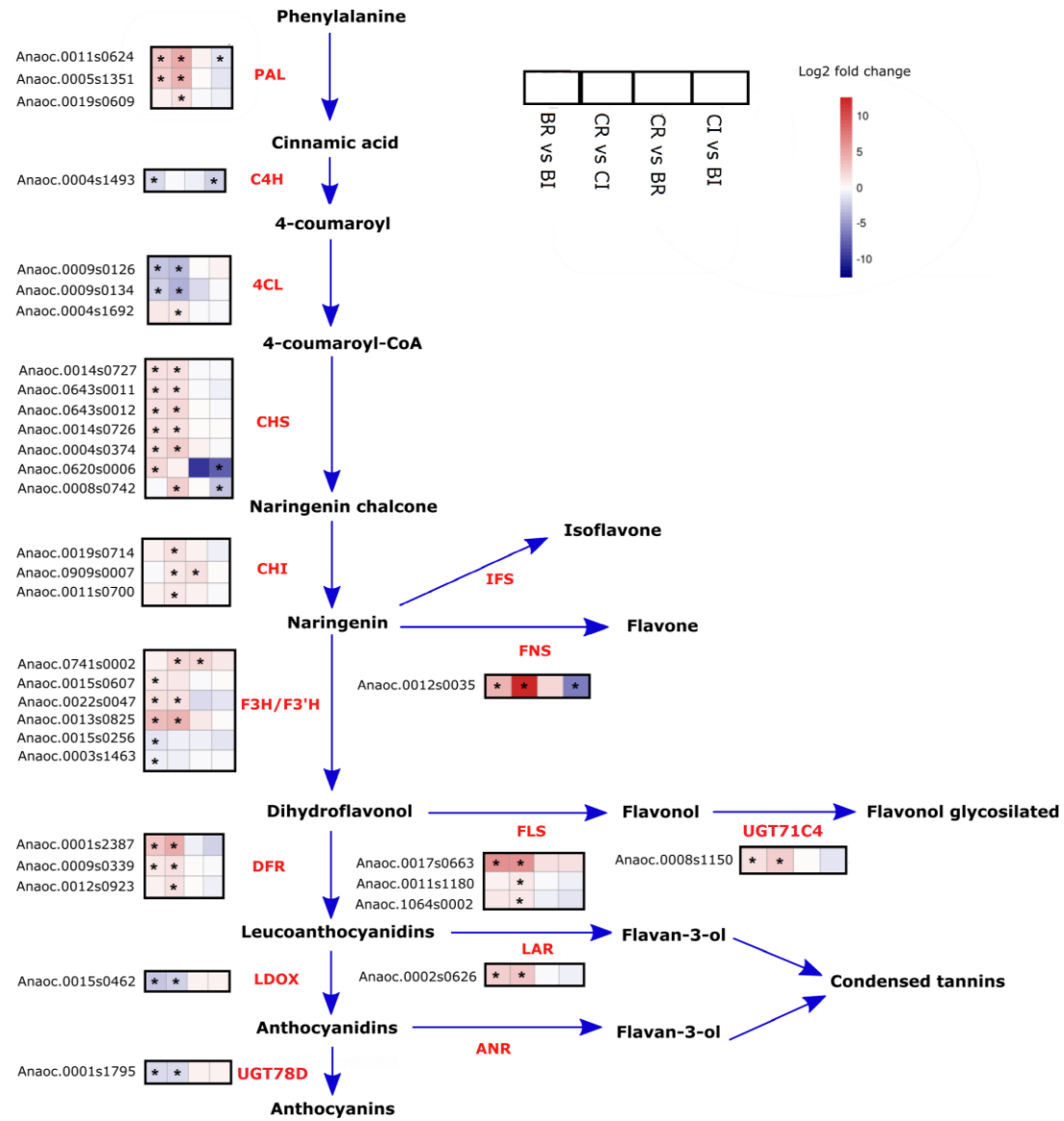
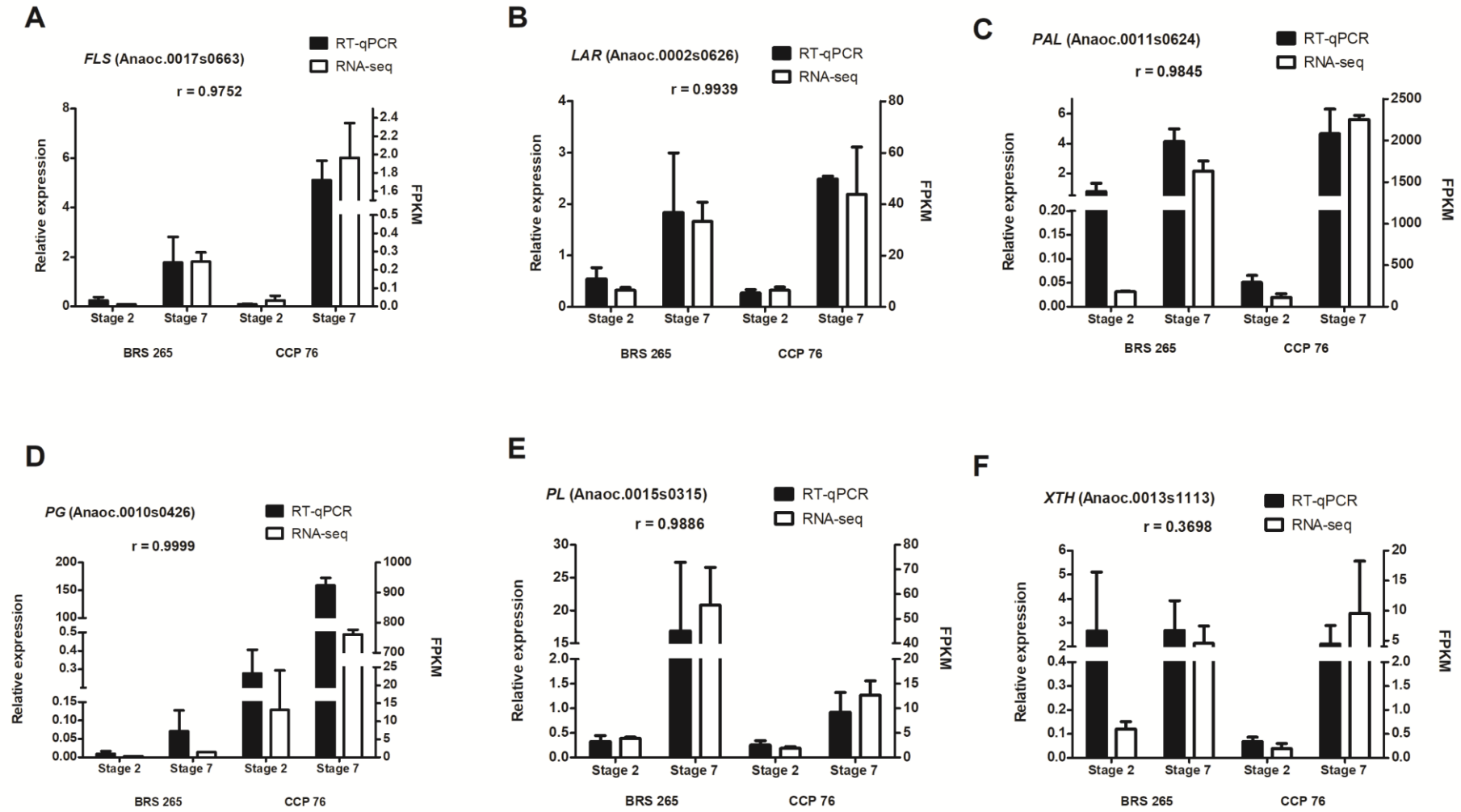
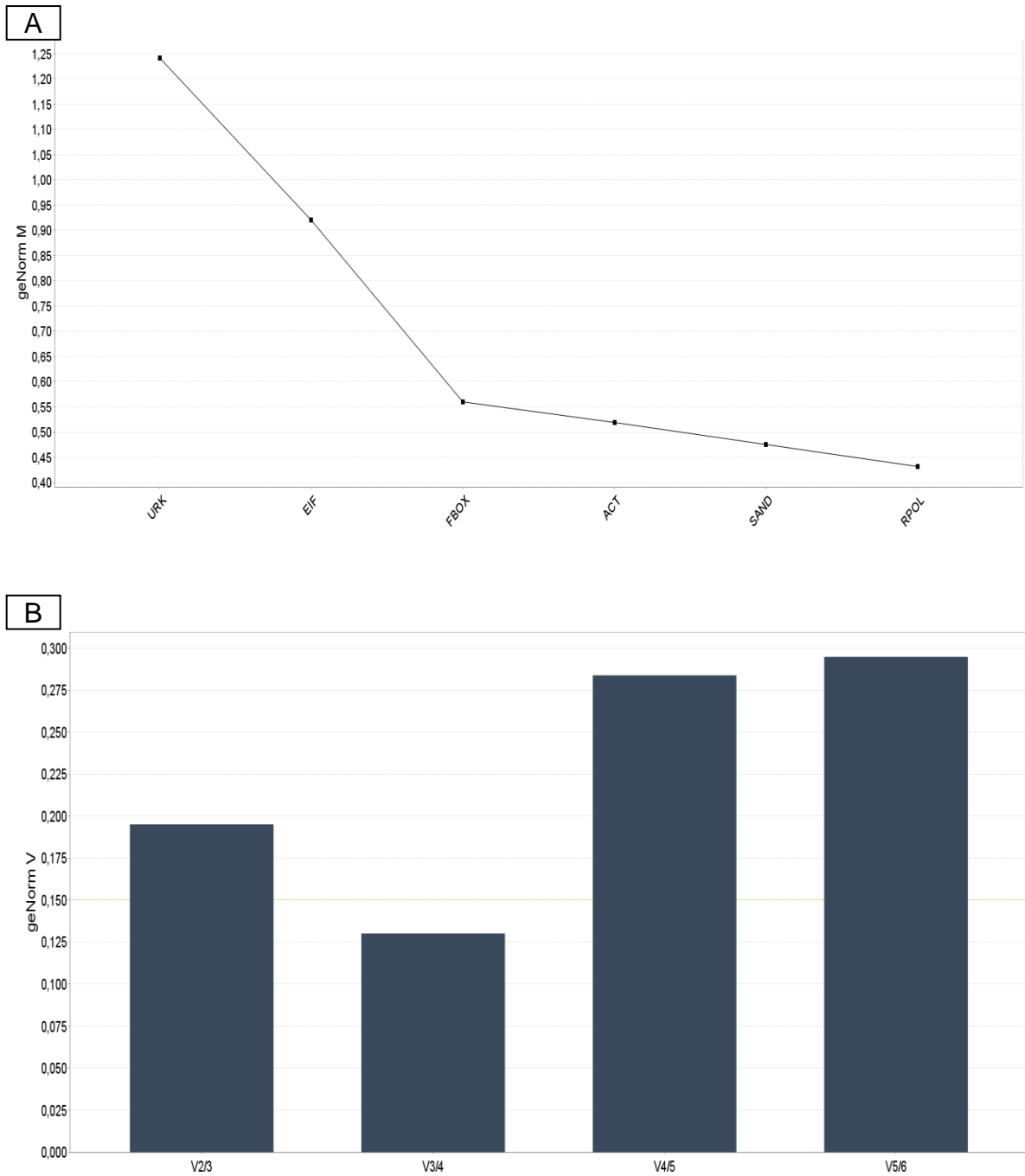


Fig8.



Supplementary Figure 2



Supplementary Table 2

Gene	Gene_ID	Gene name	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')	Anneling temperature (°C)	Amplicon size (bp)
ACT*	Anaoc.0006s0509	Actin	GACAACCGTATGATGTTATACC	CAATCGCAACTTCTTTAGCC	63.6	152
EIF*	Anaoc.0005s0957	Translation initiation factor	ATTGAGAGGAGAACTGGGCG	CACACCATGAGAACAGCACCG	63.6	190
FBOX*	Anaoc.0002s2076	F-box protein	GGTTCAGAGACAAGAAATAGATG	GCACTAGAGTTGACACAAGAAT	63.6	182
RPOL*	Anaoc.0019s0338	RNA polymerase II protein	CTGGAAATTGTGGTTCGTGG	TTTCTGATTGCTGGTGTGG	65	141
SAND*	Anaoc.0010s1075	SAND family protein	AAACTATGTTCTTCTCTGCTGG	TTCCACATCCTTCACCCAC	63.6	127
URK*	Anaoc.0001s0689	Protein uridylylate kinase	ATAATGTGAAGCCCAAGCC	ATTGCTACCTCTATTCCCAAG	59.8	162
PAL	Anaoc.0011s0624	Phenylalanine ammonia lyase	AGTATGAACAAAGGGACGGA	GATAGCAAACCTGATACCTGAG	65	236
PG	Anaoc.0010s0426	Polygalacturonase	CAATCGTAAGTGGTTCCCGAA	GCACCATTACAGTTACTCCT	65	129
PL	Anaoc.0015s0315	Pectate lyase	TCTCTTCTGTCTCCTCTTCTG	GGGTATTTGTCTTGC GGAAC	63.6	134
FLS	Anaoc.0017s0663	Flavonol synthase	ATGTCCTCGTCCTGATCTC	TGCTAAGAATCTCAATCTGGTC	63.6	181
LAR	Anaoc.0002s0626	Leucoanthocyanidin reductase	GTCACCTTGTGCGGATGCT	CATTTATTGATCCCGAGGTGAGAG	65	161
XTH	Anaoc.0013s1113	Xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase	TGCTTGCTTCTGCTAATTC	CGTTAGTGTGAAGAGTGTAG	59.8	299

* genes de referência

Supplementary Table 4

Genotypes	Developmental stages	cDNA libraries	Total raw reads	Total filter reads	Q30 percentage	GC content percentage	Mapped reads (%)
BRS 265	Green	BG-R1	35,475,960	31,212,424	91.51	44.88	27010883 (91.0)
		BG-R2	40,246,384	35,993,228	92.66	44.64	31105586 (91.3)
		BG-R3	46,360,900	41,200,480	92.30	44.84	35608226 (91.0)
	Mature	BM-R1	55,931,418	50,335,408	93.00	44.77	43487231 (91.1)
		BM-R2	46,257,628	41,672,446	93.11	44.87	35941632 (90.9)
		BM-R3	41,510,620	37,301,176	92.62	44.72	32180457 (91.1)
CCP 76	Green	CG-R1	52,234,814	41,200,480	92.73	44.43	40479663 (90.8)
		CG-R2	47,732,844	42,602,124	92.14	44.54	36657480 (91.0)
		CG-R3	44,064,846	39,912,154	93.49	44.65	34432885 (91.1)
	Mature	CM-R1	41,517,440	41,250,450	92.68	44.64	32528770 (91.2)
		CM-R2	43,962,712	38,823,036	91.95	44.57	33266884 (90.6)
		CM-R3	46,654,026	41,915,778	93.14	44.60	36021978 (90.8)

5. CONCLUSÃO

Em resumo, o presente estudo mostra uma análise transcriptômica comparativa de dois genótipos contrastantes de caju (CCP 76 e BRS 265) a fim de explorar genes-chave envolvidos em características específicas tais como a firmeza e a coloração. Além disso, este é o primeiro estudo a relatar o sequenciamento do transcriptoma de pedúnculos de caju. Por meio do sequenciamento dos transcritos, foi possível fornecer uma compreensão abrangente sobre os principais processos envolvidos no desenvolvimento dos pedúnculos de caju e, portanto, responsável pelas mudanças organolépticas nos frutos.

Em particular, foram identificados genes que podem potencialmente contribuir para a melhoria dos processos de biossíntese de flavonóides e degradação da parede celular durante o amadurecimento de caju. Além disso, os resultados obtidos contribuem para a elucidação de mecanismos moleculares envolvidos na regulação desses metabolismos em frutos. A expressão de alguns genes foi associada a singularidade de cada genótipo estudado, fornecendo conhecimento para posteriores estudos envolvendo o melhoramento das características de qualidade. Por fim, o presente estudo fornece suporte científico para estudos de manipulação genética da característica desejada, valorizando a produção comercial de caju.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI-COSTA, T. D. S.; LIMA, A.; LIMA, M. V. Determinação de tanino em pedúnculo de caju: método da vanilina versus método do butanol ácido. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 763-765, 2003.
- ALBUQUERQUE, D. P. L.; KHAN, A. S.; LIMA, P. V. P. S.; CARVALHO, E. B. S. A competitividade externa da amêndoa de castanha de caju brasileira no período de 1990 a 2007. **Economia do Ceará em Debate 2010 – IPEC**, Fortaleza, v. 1, p. 85-108, 2011.
- ALIYU, O. M.; AWOPETU, J. A. Chromosome studies in cashew (*Anacardium occidentale* L.). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.6, n. 2, p. 131-136, 2007.
- ANANGA, A.; GEORGIEV, V.; OCHIENG, J.; PHILLS, B.; TS OLOVA, V. Production of anthocyanins in grape cell cultures: A potential source of raw material for pharmaceutical, food, and cosmetic industries. In: **The Mediterranean Genetic Code - Grapevine and Olive**, p. 247-287, 2013.
- AQUILA, M. E. A. A.; BRAGA, M. R.; DIETRICH, S. M. C. The similarity of galactomannan in seeds and endocarp of pods during development in *Senna macranthera* var. *nervosa*. **South Africa Journal of Botany**, [s.l.], v. 83, p. 56-62, 2012.
- ASSUNÇÃO, R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 16, n. 6, p. 647-657, 2003.
- ATKINSON, R. G.; SUTHERLAND, P. W.; JOHNSTON, S. L.; GUNASEELAN, K.; HALLETT, I. C.; MITRA, D., et al. Down-regulation of POLYGALACTURONASE1 alters firmness, tensile strength and water loss in apple (*Malus x domestica*) fruit. **BMC plant biology**, London, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2012.
- BARRETO, G. P. M.; SOUZA, A. C. R.; AZEREDO, H. M. C.; MERCADANTE, A. Z. Compostos bioativos em sub-produtos da castanha de caju. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 207–213, 2007.
- BARROS, L. M. **Árvore do conhecimento caju: características da planta**. Agência Embrapa de Informação Tecnológica, 2011. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/caju/arvore/CONT000fi8wxjm202wyiv80z4s473zfkkt9.html>. Acesso em: 14 out 2020.
- BEEJMOHUN, V.; MIGNON, C.; MAZOLLIER, A.; PEYTAVY-IZARD, M.; PALLET, D.; DORNIER, M.; CHAPAL, N. Cashew apple extract inhibition of fat storage and insulin resistance in the diet-induced obesity mouse model. **Journal of nutritional science**, [s.l.], v. 4, 2015.
- BHAT, M. G.; NAGARAJA, K. V.; RUPA, T. R. Cashew research in India. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 5, n. 1, p.1–16, 2010.
- BIALE, J. B. Growth, maturation, and senescence in fruits. **Science**, [s.l.], v. 146, n. 3646,

p.880-888, 1964.

BIALE, J. B.; BARCUS, D. E. Respiratory pattern in tropical fruits of the Amazon Basin. **Tropical Science**, [s.l.], v. 12, n. 2, p. 93-104, 1967.

BOGS, J.; JAFFE, F. W.; TAKOS, A. M.; WALKER, A. R.; ROBINSON, S. P. The grapevine transcription factor *VvMYBPA1* regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. **Plant Physiology**, Varanasi, v. 143, p. 1347–1361, 2007.

BOSS, P. K.; DAVIES, C.; ROBINSON, S. P. Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. **Plant Physiology**, Varanasi, v. 111, p. 1059–1066, 1996.

BRITO, E.; MENDES, L.; GARRUTI, D.; ZOCOLO, G.; LIMA, M. Structure-Astringency Relationship of Anacardic Acids from Cashew Apple (*Anacardium Occidentale* L.). **ChemRxiv**, Washington, 2020. Preprint. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12336704.v1>

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

CAVALCANTE, A. A. M.; RUBENSAM, G.; PICADA, J. N.; GOMES DA SILVA, E.; MOREIRA, J. C. F.; HENRIQUES, J. A. Mutagenicity, antioxidant potencial and antimutagenic activity against hydrogen peroxide of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and cajuina. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 41, p. 360-369, 2003.

CARIOCA, J. O. B.; HILUY, J. J. F.; GAZELLI, F. Cadeia do Caju: Novas Possibilidades para o Ceará. **Revista de Ciência e Tecnologia**, Campinas, v. 2, p. 17- 21, 2003.

CARVALHO, D. V.; GALLÃO, M. I.; BRITO, E. S. OBESIDADE e fibra dietética: destaque para a fibra de caju. **Brazilian Journal of Development**, São Paulo, v. 6, n. 7, p. 43474-43488, 2020.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.

DAS, I.; ARORA, A. Post-harvest processing technology for cashew apple: A review. **Journal of Food Engineering**, London, v. 194, p. 87-98, 2017.

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**, London, v. 7, p. 1-19, 2017.

DOTTO, M. C.; MARTÍNEZ, G. A.; CIVELLO, P. M. Expression of expansin genes in strawberry varieties with contrasting fruit firmness. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 44, n. 5-6, p. 301-307, 2005.

ESPLEY, R. V.; HELLENS, R. P.; PUTTERILL, J.; STEVENSON, D. E.; KUTTY-AMMA, S.; ALLAN, A. C. Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB

transcription factor, MdMYB10. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 49, n. 3, p. 414-427, 2007.

FAOSTAT (2018). **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/CC>. Acesso em: 01 out 2020.

FIGUEIREDO, R. W.; LAJOLO, F. M.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C.; ARAÚJO, N. C. C. Alterações de firmeza, pectinas e enzimas pectinolíticas durante o desenvolvimento e maturação de pedúnculos de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L. var. nanum) CCP-76. **Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture**, p. 82-86, 2001.

FIGUEIREDO, R. W.; LAJOLO, F. M.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C. Physical-chemical changes in early dwarf cashew pseudofruits during development and maturation. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 77, n. 3, p. 343-347, 2002.

FIGUEROA, C. R.; PIMENTEL, P.; DOTTO, M. C.; CIVELLO, P. M.; MARTÍNEZ, G. A.; HERRERA, R; et al. Expression of five expansin genes during softening of *Fragaria chiloensis* fruit: effect of auxin treatment. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 53, p. 51-57, 2009.

FILGUEIRAS, H. A. C.; ALVES, R. E.; MOSCA, J. L.; MENEZES, J. B. Cashew apple for fresh consumption: research on harvest and postharvest handling technology in Brazil. **Acta Horticulturae**, [s.l.], v. 485, p. 155-160, 1999.

FILGUEIRAS, H. A. C.; ALVES, R. E. Características do pedúnculo para exportação. Caju: Pós-colheita. **Embrapa Agroindústria Tropical**, p. 14-21, 2002.

GONZÁLEZ, M.; SALAZAR, E.; CABRERA, S.; OLEA, P.; CARRASCO, B. Analysis of anthocyanin biosynthesis genes expression profiles in contrasting cultivars of Japanese plum (*Prunus salicina* L.) during fruit development. **Gene Expression Patterns**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 54-62, 2016.

GOULAO, L. F.; OLIVEIRA, C. M. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 19, n. 1, p. 4-25, 2008.

GRIESSER, M.; VITZTHUM, F.; FINK, B.; BELLIDO, M. L.; RAASCH, C.; MUNOZ-BLANCO, J.; et al. Multi-substrate flavonol O-glucosyltransferases from strawberry (*Fragaria xananassa*) achene and receptacle. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, p. 2611-2625, 2008.

HEATHER, J. M.; CHAIN, B. The sequence of sequencers: the history of sequencing DNA. **Genomics**, [s.l.], v. 107, n. 1, p. 1-8, 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção agrícola municipal**. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 01 out 2019.

INSTITUTO CAJU BRASIL. **O agronegócio caju em números**, Boletim ICB, n. 7, 2020. Disponível em: <https://issuu.com/institutocajubrasil/>. Acesso em: 01 out 2020.

- JAAKOLA, L. New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. **Trends in plant science**, Kidlington, v. 18, n. 9, p. 477-483, 2013.
- JARA, K.; CASTRO, R. I.; RAMOS, P.; PARRA-PALMA, C.; VALENZUELA-RIFFO, F.; MORALES-QUINTANA, L. Molecular Insights into FaEG1, a Strawberry Endoglucanase Enzyme Expressed during Strawberry Fruit Ripening. **Plants**, Basel, v. 8, n. 6, p. 140, 2019.
- 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**. Willey-Blackwell, p. 21–38, 2013.
- KOBAYASHI, S.; ISHIMARU, M.; HIRAOKA, K.; HONDA, C. Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. **Planta**, [s.l.], v. 215, p. 924–933, 2002.
- KOBAYASHI, S.; GOTO-YAMAMOTO, N.; HIROCHIKA, H. Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. **Science**, [s.l.], v. 304, p. 982, 2004.
- KORPELAINEN, E.; TUIMALA, J.; SOMERVUO, P.; HUSS, M.; WONG, G. RNA-seq data analysis: a practical approach. **CRC press**, [s.l.], 2015.
- KOTEPONG, P.; KETSA, S.; DOORN, W. G. A white mutant of Malay apple fruit (*Syzygium malaccense*) lacks transcript expression and activity for the last enzyme of anthocyanin synthesis, and the normal expression of a MYB transcription factor. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 38, p. 75–86, 2011.
- KOYAMA, K.; NUMATA, M.; NAKAJIMA, I.; GOTO-YAMAMOTO, N.; MATSUMURA, H.; TANAKA, N. Functional characterization of a new grapevine MYB transcription factor and regulation of proanthocyanidin biosynthesis in grapes. **Journal of experimental botany**, Oxford, v. 65, n. 15, p. 4433-4449, 2014.
- KUBO, I.; NIHEI, K.I.; TSUJIMOTO, K. Antibacterial action of anacardic acids against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal Agriculture and Food Chemistry**, Nitra, v. 51, p. 7624-7628, 2003.
- LAMPUGNANI, E. R.; KHAN, G. A.; SOMSSICH, M.; PERSSON, S. Building a plant cell wall at a glance. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 131, 2018.
- LANGLEY, K. R.; MARTIN, A.; STENNING, R.; MURRAY, A. J.; HOBSON, G. E.; SCHUCH, W. W.; BIRD, C. R. Mechanical and optical assessment of the ripening of tomato fruit with reduced polygalacturonase activity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 66, p. 547-554, 1994.
- LI, S. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: fine-tuning of the MYB-bHLH-WD40 (MBW) complex. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 9, n. 1, p. e27522, 2014.
- LOPES, M. M. A.; MOURA, C. F. H.; ARAGÃO, F. A. S.; CARDOSO, T. G.; FILHO, J. E. Caracterização física de pedúnculos de clones de cajueiro anão precoce em diferentes estádios

de maturação. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 4, p. 914-920, 2011.

LOPES, M. M. A.; MIRANDA, M. R. A.; MOURA, C. F. H.; FILHO, J. E. Bioactive compounds and total antioxidant capacity of cashew apples (*Anacardium Occidentale* L.) during the ripening of early dwarf cashew clones. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 3, p. 325-332, 2012.

MERCADO, J. A.; PLIEGO-ALFARO, F.; QUESADA, M. A. Fruit shelf life and potential for its genetic improvement. **Breeding for Fruit Quality**, p. 81–104, 2011.

MICHODJEHOUN-MESTRES, L.; AMRAOUI, W.; BRILLOUET, J. M. Isolation, characterization, and determination of 1-O-trans-cinnamoyl- β -D-glucopyranose in the epidermis and flesh of developing cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) and four of its genotypes. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 57, n. 4, p. 1377-1382, 2009.

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 SIExp1 alter cell wall metabolism and delay fruit softening. **Plant Science**, Beijing, v. 242, p. 195-202, 2016.

MOLINA-HIDALGO, F. J.; FRANCO, A.; VILLATORO, C.; MEDINA-PUCHE, L.; MERCADO, J. A.; HIDALGO, M. A.; MONFORT, A.; CABALLERO, J. L.; MUÑOZ-BLANCO, J.; BLANCO-PORTALES, R. The strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruit-specific rhamnogalacturonate lyase 1 (FaRGLyase1) gene encodes an enzyme involved in the degradation of cell-wall middle lamellae. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, p. 1471–1483, 2013.

MOURA, C. F. H.; ALVES, R. E.; INNECCO, R.; FILGUEIRAS, H. A. C.; MOSCA, J. L.; PINTO, S. A. A. Características físicas de pedúnculos de cajueiro para comercialização in natura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 23, n. 3, p. 537-540, 2001.

MOURA, C. F. H.; FIGUEIREDO, R.W.; ALVES, R. E.; SILVA, E. D.; ARAUJO, P. G. L.; MACIEL, V. T. Increasing shelf life of early dwarf cashew tree peduncle through reduction of storage temperature. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, p. 140-145, 2010.

NCBI. **GenBank Statistic**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/statistics/>. Acesso em: 01 nov 2020.

OLIVEIRA, V. H. D. Cashew crop. **Revista Brasileira De Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 30, n. 1, 2008.

OZSOLAK, F.; MILOS, P. M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. **Nature reviews genetics**, London, v. 12, n. 2, p. 87, 2011.

PANDEY, A.; ALOK, A.; LAKHWANI, D.; SINGH, J.; ASIF, M. H.; TRIVEDI, P. K. Genome-wide expression analysis and metabolite profiling elucidate transcriptional regulation of flavonoid biosynthesis and modulation under abiotic stresses in banana. **Scientific reports**, London, v. 6, p. 31361, 2016.

PANIAGUA, C.; BLANCO-PORTALES, R.; BARCELÓ-MUÑOZ, M.; GARCÍA-GAGO, J. A.; WALDRON, K. W.; QUESADA, M. A.; MUÑOZ-BLANCO, J.; MERCADO, J. A. Antisense down-regulation of the strawberry β -galactosidase gene Fa β Gal4 increases cell wall galactose levels and reduces fruit softening. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 67, n. 3, p. 619-631, 2016.

PEI, M.; GU, C.; ZHANG, S. Genome-wide identification and expression analysis of genes associated with peach (*Prunus persica*) fruit ripening. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 246, p. 317-327, 2019.

PELLETIER, M. K.; MURRELL, J. R.; SHIRLEY, B.W. Characterization of flavonol synthase and leucoanthocyanidin dioxygenase genes in *Arabidopsis* (further evidence for differential regulation of “early” and “late” genes). **Plant physiology**, Varanasi, v. 113, n. 4, p. 1437-1445, 1997.

PORAT, R.; WEISS, B.; ZIPORI, I.; DAG, A. Postharvest longevity and responsiveness of guava varieties with distinctive climacteric behaviors to 1-methylcyclopropane. **Horticulturae Technology**, Alexandria, v. 19, n. 3, p. 580-585, 2009.

POSÉ, S.; PANIAGUA, C.; CIFUENTES, M.; BLANCO-PORTALES, R.; QUESADA, M.A.; MERCADO, J. A. Insights into the effects of polygalacturonase FaPG1 gene silencing on pectin matrix disassembly, enhanced tissue integrity, and firmness in ripe strawberry fruits. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 12, p. 3803-3815, 2013.

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

PRATT, H. K.; MENDOZA JR, D. B. Influence of nut removal on growth and ripening of the cashew-apple. **Journal American Society for Horticultural Science**, United States, 1980.

PROMMAJAK, T.; LEKSAWASDI, N.; RATTANAPANONE, N. Biotechnological valorization of cashew apple: a review. **Chiang Mai University Journal of Natural Sciences**, [s.l.], v. 13, p.159-182, 2014.

QUEIROZ, C.; SILVA, A. J. R.; LOPES, M. L. M.; FIALHO, E.; VALENTE MESQUITA, V. L. Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) after processing. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 125, n. 1, p. 128-132, 2011.

QUEIROZ, M. A. D.; BARROS, L. D. M.; CARVALHO, L. P. D.; CANDEIA, J. D. A.; FERRAZ, E. Plant breeding in the semiarid region of Brazil: examples of success. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, p. 57–66, 2012.

RAVAGLIA, D.; ESPLEY, R. V.; HENRY-KIRK, R.; ANDREOTTI, C.; ZIOSI, V.; HELLENS, R. P.; COSTA, G.; ALLAN, A. C. Transcriptional regulation of flavonoid biosynthesis in nectarine (*Prunus persica*) by a set of R2R3 MYB transcription factors. **BMC plant biology**, London, v. 13, n. 1, p. 68, 2013.

ROBINSON, S. P.; BOGS, J.; MCDAVID, D. A. J.; HOOPER, L. C.; SPEIRS, J.; WALKER,

A. R. Transgenic grapevines with decreased expression of tannin synthesis genes have altered grape and wine flavonoid composition. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Australia, 2020. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12468>.

RYALL, A. L.; LIPTON, W. J. **Handling, transportation and storage of fruits and vegetables**. 2 ed. Westport: AVI, v. 1, p. 560, 1979.

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

SAROJ, P. L.; NAYAK, M. G.; MEENA, R. K. **Physiology of Flowering, Fruit and Nut Development in Cashew**. In Eds. Ravishankar, H.; Singh, V. K.; Misra, A. K.; Mishra, M. Souvenir, National Seminar-cum-workshop on physiology of flowering in perennial fruit crops, p. 105-114, 2014.

SAVADI, S.; MURALIDHARA, B. M.; PREETHI, P. Advances in genomics of cashew tree: molecular tools and strategies for accelerated breeding. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 16, n. 5, p. 1-15, 2020.

SCHWEIGGERT, R. M.; VARGAS, E.; CONRAD, J.; HEMPEL, J.; GRAS, C. C.; ZIEGLER, J. U.; MAYER, A.; JIMENEZ, V.; ESQUIVEL, P.; CARLE, R. Carotenoids, carotenoid esters, and anthocyanins of yellow-, orange-, and red-peeled cashew apples (*Anacardium occidentale* L.). **Food chemistry**, Amsterdam, v. 200, p. 274-282, 2016.

SEYMOUR, G.; TUCKER, G. A.; POOLE, M.; GIOVANNONI, J. **The molecular biology and biochemistry of fruit ripening**. John Wiley & Sons, 2013.

SHIRLEY, B. W.; HANLEY, S.; GOODMAN, H. M. Effects of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two Arabidopsis transparent testa mutations. **Plant Cell**, Oxford, v. 4, p. 333–347, 1992.

SIMSEK, O.; DONMEZ, D.; KACAR, Y. A. RNA-Seq analysis in fruit science: a review. **American Journal of Plant Biology**, New York, v. 2, n. 5, p. 1, 2017.

SIVAGURUNATHAN, P.; SIVASANKARI, S.; MUTHUKKARUPPAN, S.M.J. Characterization of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) fruits collected from Ariyalur District. **BioScience Research**, [s.l.], v. 1, p. 101- 107, 2010.

SMITH, C. J.; WATSON, C. F.; MORRIS, P. C.; BIRD, C. R.; SEYMOUR, G. B.; GRAY, J. E.; ARNOLD, C.; et al. Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 14, p. 369-379, 1990.

SOUSA, L. B.; FEITOZA, L. L.; GOMES, R. L. F.; LOPES, A. C. A.; SOARES, E. B.; SILVA, E. M. P. Floral biology aspects of the early dwarf and common cashew. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, 2007.

SRIVASTAVA, S.; SINGH, R. K.; PATHAK, G.; GOEL, R.; ASIF, M. H.; SANE, A. P.; SANE, V. A. Comparative transcriptome analysis of unripe and mid-ripe fruit of *Mangifera*

indica (var. “Dashehari”) unravels ripening associated genes. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. 1-13, 2016.

STICKLEN, M. B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 9, n. 6, p. 433-443, 2008.

STRACKE, R.; ISHIHARA, H.; HUEP, G.; BARSCH, A.; MEHRTENS, F.; NIEHAUS, K.; WEISSHAAR, B. Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. **Plant Journal**, [s.l.], v. 50, n. 4, p. 660-677, 2007.

SU, X.; XU, J.; RHODES, D.; SHEN, Y.; SONG, W.; KATZ, B.; WANG, W. Identification and quantification of anthocyanins in transgenic purple tomato. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 202, p. 184-188, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 6 ed., 2017.

TAKOS, A. M.; JAFFÉ, F. W.; JACOB, S. R.; BOGS, J.; ROBINSON, S. P.; WALKER, A. R. Light-induced expression of a MYB gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples. **Plant Physiology**, Varanasi, v. 142, p. 1216–1232, 2006.

TALASILA, U.; SHAIK, K. B. Quality, spoilage and preservation of cashew apple juice: A review. **Journal of Food Science and Technology**, New Delhi, v. 52, n. 1, p. 54-62, 2015.

TAMIELLO-ROSA, C. S.; CANTU-JUNGLES, T. M.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L. M. Pectins from cashew apple fruit (*Anacardium occidentale*): Extraction and chemical characterization. **Carbohydrate research**, Amsterdam, v. 483, p. 107752, 2019.

TANAKA, Y.; BRUGLIERA, F.; KALC, G.; SENIOR, M.; DYSON, B.; NAKAMURA, N.; KATSUMOTO, Y.; CHANDLER, S. Flower color modification by engineering of the flavonoid biosynthetic pathway: practical perspectives. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Oxford, v. 74, p.1760-1769, 2010.

TERRIER, N.; TORREGROSA, L.; AGEORGES, A.; VIALET, S.; VERRIES, C.; CHEYNIER, V.; ROMIEU, C. Ectopic expression of VvMybPA2 promotes proanthocyanidin biosynthesis in grapevine and suggests additional targets in the pathway. **Plant Physiology**, Varanasi, v. 149, p. 1028–1041, 2009.

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.; BLANCOULTE, 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**, New York, v. 34, p. 950–952, 2016.

VASCONCELOS, M. S.; GOMES-ROCHETTE, N. F.; OLIVEIRA, M. L. M.; NUNES-

PINHEIRO, D. C. S.; TOMÉ, A. R.; SOUSA, F. Y. M.; PINHEIRO, F. G. M.; MOURA, C. F. H.; MIRANDA, M. R. A.; MOTA, E. F.; MELO, D. F. Anti-inflammatory and wound healing potential of cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.) in mice. **Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 240, n. 12, p. 1648-1655, 2015.

VIDAL, F. C. N.; BARROS, L. M.; CAVALCANTI, J. J. V.; MELO, D. S. **Melhoramento genético e cultivares de cajueiro**. In: ARAÚJO, J. P. P. (Ed.). Agronegócio caju: práticas e inovações. Brasília, DF: Embrapa, parte 7, cap. 2, p. 481-508, 2013.

VIDAL, M. F. **Cajucultura nordestina continua em declínio**. Caderno Setorial ETENE – Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, n. 22, 2017.

VITAL, B. R.; CARNEIRO, A. D. C. O.; PIMENTA, A. S.; DELLA LUCIA, R. M. Adesivos à base de taninos das cascas de duas espécies de eucalipto para produção de chapas de flocos. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 4, p. 571-582, 2004.

VORAGEN, A. G. J.; COENEN, G.; VERHOEF, R. P.; SCHOLS, H. A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, Deerfield Beach, v. 20, p. 263-275, 2009.

WALKER, A. R.; LEE, E.; BOGS, J.; MCDAVID, D. A.; THOMAS, M. R.; ROBINSON, S. P. White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 49, n. 5, p. 772-785, 2007.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for Transcriptomics. **Nature Reviews**, London, v. 10, p. 57-63, 2009.

WANG, D.; YEATS, T. H.; ULUISIK, S.; ROSE, J. K.; SEYMOUR, G. B. Fruit softening: revisiting the role of pectin. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 23, n. 4, p. 302-310, 2018.

WANG, D.; SAMSULRIZAL, N. H.; YAN, C.; ALLCOCK, N. S.; CRAIGON, J.; BLANCO-ULATE, B.; ORTEGA-SALAZAR, I.; MARCUS, S. E.; BAGHERI, H. M.; PEREZ-FONS, L.; FRASER, P. D.; FOSTER, T.; FRAY, R.; KNOX, J. P.; SEYMOUR, G. B. Characterization of CRISPR mutants targeting genes modulating pectin degradation in ripening tomato. **Plant physiology**, Varanasi, v. 179, n. 2, p. 544-557, 2019.

WATADA, A. E.; HERNER, R. C.; KADER, A. A.; ROMANI, R. J.; STABY, G. L. Terminology for the description of developmental stages of horticultural crops. **Horticulturae Science**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.20-21, 1984.

WEN, B.; STRÖM, A.; TASKER, A.; WEST, G.; TUCKER, G. A. Effect of silencing the two major tomato fruit pectin methylesterase isoforms on cell wall pectin metabolism. **Plant Biology**. Oxford, 15, 1025-32, 2013.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiology**, Varanasi, v. 126, p. 485–493, 2001.

WITASARI, L. D.; HUANG, F. C.; HOFFMANN, T.; ROZHON, W.; FRY, S. C.; SCHWAB, W. Higher expression of the strawberry xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase genes Fv

XTH 9 and Fv XTH 6 accelerates fruit ripening. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 100, n. 6, p. 1237-1253, 2019.

XU, W.; DUBOS, C.; LEPINIEC, L. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 20, n. 3, p. 176-185, 2015.

XUE, C.; GUAN, S. C.; CHEN, J. Q.; WEN, C. J.; CAI, J. F.; CHEN, X. Genome wide identification and functional characterization of strawberry pectin methylesterases related to fruit softening. **BMC plant biology**, London, v. 20, n. 1, p. 1-17, 2020.

YAHIA, E. M. **Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits: Açai to Citrus**. Ed. Elsevier, p. 414 – 417, 2011.

YANG, Y. N.; ZHAO, G.; YUE, W. Q.; ZHANG, S. L.; GU, C.; WU, J. Molecular cloning and gene expression differences of the anthocyanin biosynthesis-related genes in the red/green skin color mutant of pear (*Pyrus communis* L.). **Tree genetics & genomes**, Heidelberg, v. 9, n. 5, p. 1351-1360, 2013.

YANG, Y.; YAO, G.; YUE, W.; ZHANG, S.; WU, J. Transcriptome profiling reveals differential gene expression in proanthocyanidin biosynthesis associated with red/green skin color mutant of pear (*Pyrus communis* L.). **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, p. 795, 2015.

YANG, L.; HUANG, W.; XIONG, F.; XIAN, Z.; SU, D.; REN, M.; LI, Z. Silencing of Sl PL, which encodes a pectate lyase in tomato, confers enhanced fruit firmness, prolonged shelf-life and reduced susceptibility to grey mould. **Plant biotechnology journal**, Oxford, v. 15, n. 12, p. 1544-1555, 2017.

YOKOYAMA, R.; NISHITANI, K. Functional diversity of xyloglucan- related proteins and its implications in the cell wall dynamics in plants. **Plant Biology**, Oxford, v. 2, p. 598–604, 2000.

ZHAO, X.; YUAN, Z.; FENG, L.; FANG, Y. Cloning and expression of anthocyanin biosynthetic genes in red and white pomegranate. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 128, n. 4, p. 687-696, 2015.