**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Variações alélicas que afetam a carotenogênese em tomateiro alteram o
amadurecimento e a suscetibilidade dos frutos ao fungo *Botrytis cinerea***

Bruna Orsi

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas

**Piracicaba
2018**

Bruna Orsi
Engenheira Agrônoma

**Variações alélicas que afetam a carotenogênese em tomateiro alteram o
amadurecimento e a suscetibilidade dos frutos ao fungo *Botrytis cinerea***

Orientador:
Prof. Dr. **RICARDO ALFREDO KLUGE**

Coorientador:
Prof. Dr. **IVAN SESTARI**

Dissertação Apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Orsi, Bruna

Variações alélicas que afetam a carotenogênese em tomateiro alteram o amadurecimento e a suscetibilidade dos frutos ao fungo *Botrytis cinerea* / Bruna Orsi. - - Piracicaba, 2018.

88 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Micro Tom 2. Tomate 3. Linhagens quase-isogênicas 4. Etileno I.
Título

DEDICATÓRIA

*À “vó Dite”, um anjo que olhou por mim em
terra e agora olha do céu...*

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos,

A Deus, pela oportunidade de viver

À minha família. Minha mãe Sandra, meu pai Dirceu, minha irmã Nicole e meu irmão Gabriel, por todo amor e ajuda mesmo com toda a distância e por me deixarem buscar meus sonhos. Amo vocês.

Ao meu companheiro e melhor amigo, Dani, por todo suporte emocional e intelectual, sem o qual não seria possível concluir este mestrado.

Ao meu orientador, professor Ricardo Kluge, por suas instruções, paciência, oportunidades concedidas e pela confiança em mim e em todos seus orientados.

Ao meu coorientador, professor Ivan Sestari, por toda ajuda sempre, que mesmo à distância foi essencial para o direcionamento de meu mestrado. Obrigada por compartilhar seu conhecimento e ideias.

Aos meus amigos do Pcolheit, pessoas incríveis que tive a felicidade de conhecer e que sempre estiveram dispostos a ajudar. Allan, Ana, Cris, Magda, Ná e Teen. Vocês são demais!

Aos alunos de graduação que tanto me ajudaram durante todas as análises. Annie, Berranteiro, Dúxa, Fóbis, Juliana, Laura, Lorena, Otto, Quaresma, Remi, Super, Tapas, Thaís e Togue-π.

À professora Neuza Hassimotto, Mayara Adja e professor Eduardo Purgatto, por toda a gentileza em compartilhar seu laboratório e por me auxiliarem com análises tão importantes neste trabalho.

Ao professor Lázaro Peres, por conceder espaço para o cultivo das plantas e ao Mateus, Diego e Cássia, por todo o auxílio.

À professora Marta Spoto e Paula, por me deixarem utilizar seu laboratório e principalmente à Jacqueline, por suas dicas e ajuda sempre.

À professora Beatriz Appezzato da Glória, por compartilhar o espaço do laboratório e os equipamentos necessários para as análises anatômicas.

À Solizete, que sempre foi tão gentil e prestativa, me inteirando de toda a burocracia.

À ESALQ, pela acolhida e oportunidade de fazer um mestrado.

À CAPES, pela concessão de bolsa e auxílio financeiro para a coleta dos frutos.

A todos vocês, muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO GERAL	11
2. CARACTERIZAÇÃO DO AMADURECIMENTO E QUALIDADE NUTRICIONAL DE FRUTOS DE TOMATEIRO CARREGANDO MUTAÇÕES QUE AFETAM A COMPOSIÇÃO DE CAROTENOIDES	21
RESUMO.....	21
ABSTRACT	22
2.1. INTRODUÇÃO	22
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	24
2.2.1. <i>Material vegetal e condições de cultivo</i>	<i>24</i>
2.2.2. <i>Taxa respiratória e produção de etileno</i>	<i>25</i>
2.2.3. <i>Determinações físico-químicas</i>	<i>25</i>
2.2.4. <i>Espessura da cutícula.....</i>	<i>26</i>
2.2.5. <i>Preparo dos extratos hidrofílico e lipofílico</i>	<i>27</i>
2.2.6. <i>Identificação e quantificação de carotenoides.....</i>	<i>27</i>
2.2.7. <i>Compostos fenólicos totais</i>	<i>28</i>
2.2.8. <i>Capacidade antioxidante.....</i>	<i>28</i>
2.2.9. <i>Análise estatística.....</i>	<i>29</i>
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
2.3.1. <i>Mutações que afetam a carotenogênese causam efeitos pleiotrópicos que alteram o padrão do amadurecimento dos frutos após a colheita.</i>	<i>29</i>
2.3.2. <i>Os principais parâmetros de qualidade do tomate são alterados em frutos com diferente composição de carotenoides</i>	<i>33</i>
2.3.3. <i>A modificação na síntese de carotenoides promove alterações na cutícula dos frutos.....</i>	<i>36</i>
2.3.4. <i>Efeito das mutações na composição de carotenoides e compostos fenólicos totais</i>	<i>38</i>

2.3.5. Frutos de tomateiro com maior conteúdo e variedade de carotenoides possuem maior atividade antioxidante	42
2.4. CONCLUSÃO	45
3. A COMPOSIÇÃO DE CAROTENOIDES INFLUENCIA A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E A SUSCETIBILIDADE DE FRUTOS DE TOMATEIRO AO FUNGO <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	51
RESUMO	51
ABSTRACT	52
3.1. INTRODUÇÃO	52
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	55
3.2.1. Material vegetal e condições de cultivo.....	55
3.2.2. Cultura de <i>B. cinerea</i> e infecção dos frutos.....	56
3.2.3. Produção de etileno	57
3.2.4. Visualização da produção de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2	57
3.2.5. Preparo dos extratos hidrofílico e lipofílico.....	57
3.2.6. Perfil de carotenoides	58
3.2.7. Teor de compostos fenólicos totais	59
3.2.8. Capacidade antioxidante	59
3.2.9. Análise estatística	59
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
3.3.1. O acúmulo diferencial de carotenoides no tomateiro altera a suscetibilidade dos frutos ao fungo <i>B. cinerea</i>	60
3.3.2. A inoculação com <i>Botrytis cinerea</i> induz a produção de etileno pelos frutos.....	65
3.3.3. A modificação na atividade de enzimas relacionadas a carotenogênese altera a concentração e o acúmulo de carotenoides nos mutantes <i>B</i> , <i>t</i> , <i>r</i> , <i>Del</i>	67
3.3.4. Modificações na composição de carotenoides alteram a capacidade antioxidante dos frutos e a produção de espécies reativas de oxigênio	71
3.4. CONCLUSÃO	75
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	81

APÊNDICES	83
------------------------	-----------

RESUMO

Variações alélicas que afetam a carotenogênese em tomateiro alteram o amadurecimento e a suscetibilidade dos frutos ao fungo *Botrytis cinerea*

Carotenoides são pigmentos encontrados em grande abundância em frutos do tomateiro. A capacidade de sequestro de radicais destes pigmentos faz do tomate uma excelente opção para inclusão de compostos nutricionais pela dieta. Embora a síntese de carotenoides seja reconhecida como uma das respostas da cascata de eventos que levam ao amadurecimento, pouco se sabe a respeito de sua influência neste processo. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi determinar se o conteúdo e a composição de carotenóide nos frutos acarretam alterações na conservação e na suscetibilidade dos frutos ao fungo *B. cinerea*. Foram utilizadas linhagens quase isogênicas (NILs) ao Micro Tom (MT) carregando as mutações, *Beta carotene* (*B*), *tangerine* (*t*), *yellow flesh* (*r*) e *Delta carotene* (*Del*). A caracterização dessas variações alélicas revelou, não apenas alterações no conteúdo de carotenoides, mas também outros efeitos pleiotrópicos relacionados ao amadurecimento, parâmetros de qualidade, espessura da cutícula e propriedades nutricionais dos frutos. Em face disso, subsequentemente investigamos se o diferencial conteúdo e composição de carotenóides nas referidas NILs altera a suscetibilidade dos frutos ao fungo *Botrytis cinerea*. A caracterização do amadurecimento demonstrou que o pico climatérico dos frutos do mutante *r* foi antecipado, assim como a transição para o estágio *breaker*. De modo contrário, a alteração na coloração da epiderme do mutante *t* foi atrasada, reafirmando suspeitas de outros autores que sugeriram que a enzima carotenoide-isomerase é necessária para a síntese de carotenoides no escuro. O conteúdo de ácido ascórbico também foi contrastante entre estes genótipos, sendo que no mutante *r* a sua concentração foi elevada, enquanto em *t* sua concentração foi reduzida. A perda de massa dos frutos foi menor no mutante *Del*, no entanto, esta característica não esteve relacionada a espessura da cutícula, que foi maior em *B*. A inoculação com *B. cinerea* por meio de ferimentos na pele dos frutos revelou menor suscetibilidade do mutante *t*, e em menor amplitude, do mutante *Del*. Ainda, o mutante *t* também se mostrou menos suscetível à inoculação do patógeno sobre frutos intactos. A maior espessura da cutícula de *B* não reduziu sua suscetibilidade ao fungo, que infectou os tecidos preferencialmente através da cicatriz do pedúnculo. A interação com *B. cinerea* desencadeou a produção de etileno e de espécies reativas de oxigênio (EROs), assim, é provável que a capacidade de sequestro de radicais livres tenha contribuído para a redução da suscetibilidade em *t* e *Del*, que mostraram menor produção de superóxido. Juntos, estes resultados sugerem que a modulação na atividade de enzimas da carotenogênese pode servir como ferramenta para obtenção de frutos com diferente vida útil durante o armazenamento pós-colheita de tomate.

Palavras-chave: Micro Tom; Linhagens quase-isogênicas; Etileno; Podridões pós-colheita

ABSTRACT

Allelic variations affecting tomato carotenogenesis alter ripening and susceptibility of fruits to *Botrytis cinerea*

Carotenoids are pigments found in great abundance in tomato fruits. The radical sequestration capacity of these pigments makes tomato an excellent option for inclusion of nutritional compounds in diet. Although the synthesis of carotenoids is recognized as one of the cascade responses that trigger ripening, little is known about its influence in this process. Thus, the aim of this study was to determine if the content and composition of carotenoids in the fruits alters the conservation and the susceptibility of the fruits to the *B. cinerea* fungus. Micro Tom (MT) near-isogenic lines (NILs) harboring the mutations *Beta carotene* (*B*), *tangerine* (*t*), *yellow flesh* (*r*) and *Delta carotene* (*Del*) has been used. The characterization of these allelic variations revealed not only changes in the carotenoid content but also other pleiotropic effects related to maturation, quality parameters, cuticle thickness and nutritional properties of fruit. In this way, we subsequently investigated whether the differential content and composition of carotenoids in NILs alters fruit susceptibility to the fungus *Botrytis cinerea*. The ripening characterization showed that the climacteric peak of the fruits of the *r* mutant was anticipated, as well as the transition to the breaker stage. Conversely, the change in epidermal coloration of mutant *t* was delayed, reaffirming suspicions of other authors who suggested that the carotenoid-isomerase enzyme is required for the synthesis of carotenoids in the dark. The ascorbic acid content was also contrasting among these genotypes, and in the *r* mutant its concentration was high, while at *t* its concentration was reduced. The fruit mass loss was lower in *Del* mutant, however, this characteristic was not related to cuticle thickness, which was higher in *B*. Wound-inoculation with *B. cinerea* revealed less susceptibility of the mutant *t*, and in a lesser extent, the mutant *Del*. Further, mutant *t* was also less susceptible to pathogen inoculation on intact fruits. The greater thickness of the cuticle of *B* did not reduce its susceptibility to the fungus, which infected the tissues preferentially through the scar of the peduncle. The interaction with *B. cinerea* triggered the production of ethylene and reactive oxygen species (ROS), so the free radical scavenging capacity probably contributed to the reduction of *t* and *Del* susceptibility, which showed lower production of superoxide. Together, these results suggest that modulation in carotenogenesis enzyme activity may serve as a tool to obtain fruit with different shelf-life during post-harvest tomato storage.

Keywords: Micro Tom; Near isogenic lines; Ethylene; Post harvest decay

1. INTRODUÇÃO GERAL

Carotenoides são importantes pigmentos, incluídos na classe dos terpenos e conhecidos principalmente por sua participação na fotossíntese, onde atuam como protetores do aparato fotossintético e na captação de luz, juntamente com as clorofilas (Cazzaniga et al., 2016). Considerando sua capacidade de absorver a luz em um espectro não absorvido pela clorofila, estas moléculas são conhecidas como pigmentos auxiliares na fotossíntese, recebendo comprimentos de onda menores com maior carga energética (Hashimoto, Uragami e Cogdell, 2016).

Nos frutos, o acúmulo de carotenoides está relacionado principalmente à atração de dispersores de sementes, devido a sua função como pigmentos (Yuan *et al.*, 2015). Muitas espécies são conhecidas pela alta disponibilidade desses pigmentos e, considerando a enorme variedade de carotenoides e seu diferente espectro de absorção de luz, a coloração dos tecidos é definida em função do tipo de carotenoide acumulado (Bartley; Scolnik, 1995). O fruto do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) representa uma das fontes mais conhecidas de carotenoides e é caracterizado pelo alto conteúdo de licopeno, que confere sua coloração vermelha (Story *et al.*, 2010). Considerando a capacidade de sequestro de radicais do licopeno, a inclusão de tomate na dieta tem sido recomendada e está associada a redução de doenças cardiovasculares (Cheng *et al.*, 2017).

A biossíntese de carotenoides inicia-se a partir do composto de 5 carbonos, isopentenil pirofosfato (IPP), e de seu isômero dimetilalilo-pirofosfato (DMAPP) (Ruiz-Sola e Rodríguez-Concepción, 2012). Sucessivas reações de condensação entre IPP DMAPP, levam à formação do precursor imediato de carotenoides, geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) (Ruiz-Sola e Rodríguez-Concepción, 2012). A condensação de duas moléculas de GGPP é o passo inicial para a formação do primeiro carotenoide incolor de 40 carbonos, o fitoeno. A partir deste ponto, diversas reações de insaturação, ciclização e isomerização originam os diferentes carotenoides existentes na natureza (Bramley, 2002). A formação de fitoeno é catalisada pela ação da enzima fitoeno sintase (PSY1), sendo este um dos pontos mais limitantes da via. A reação envolve duas etapas onde, inicialmente, a condensação de duas moléculas de GGPP formam o intermediário pre-fitoeno difosfato, que por consequente eliminação de um grupo fosfato é convertido a fitoeno (Fraser e Bramley, 2004). Em tomateiro, são encontrados ao menos dois genes, *Psy-1* e *Psy-2*, responsáveis pela expressão de PSY em frutos em amadurecimento e em tecidos verdes, respectivamente (Li, Tsfadia e Wurtzel, 2009). A ausência da enzima fitoeno sintase em plantas mutantes causa alterações

nos fenótipos de flores tornando-as mais claras, bem como na coloração dos frutos, que permanecem amarelados mesmo em avançado estágio de maturação (Giorio, Stigliani e D'Ambrosio, 2007). Este fenótipo é observado em frutos do tomateiro que carregam a mutação *yellow flesh*, que impede a formação de carotenoides devido a não funcionalidade da PSY1 (Fray e Grierson, 1993; Liu *et al.*, 2003) (Figura 1).

Os passos seguintes na via biossintética de carotenoides envolvem uma série de reações de insaturação. A atividade das enzimas FITOENO DESATURASE (PDS), ZETA-CAROTENO DESATURASE (ZDS) e CAROTENOIDE *cis-trans* ISOMERASE (CRTISO) formam o carotenoide licopeno a partir do fitoeno. Por ação da enzima PDS, o fitoeno é convertido a fitoflueno e este, em seguida, é convertido a ζ -caroteno. Após estas etapas, ζ -caroteno é convertido a neurosporeno e então à tetra-*cis*-licopeno (prolicopeno), em reações catalizadas pela enzima ZDS. Por fim, o prolicopeno é isomerizado a sua configuração *trans* pela enzima CRTISO, formando o carotenoide licopeno (Ruiz-Sola e Rodríguez-Concepción, 2012). Em frutos do tomateiro, a mutação *tangerine* ocasiona a perda de função desta última enzima, devido a alterações na expressão do gene *CRTISO*. Por este motivo, o fenótipo dos frutos é caracterizado por uma coloração alaranjada, ocasionado pelo acúmulo de prolicopeno (Isaacson *et al.*, 2002) (Figura 1).

Após a formação do licopeno, reações de ciclização levam à formação de anéis em uma ou ambas as extremidades de sua cadeia. Durante esta etapa, a carotenogênese se divide em duas vias. Em um lado, a interação com ciclases leva à formação de δ -caroteno, α -caroteno e luteína, enquanto a outra via leva a síntese de β -caroteno e outras xantofilas como zeaxantina, anteraxantina e violaxantina (Ruiz-Sola e Rodríguez-Concepción, 2012) (Figura 1). As principais moléculas geradas durante a ciclização possuem anéis β ou ϵ , inseridos por ação das enzimas LICOPENO- β -CICLASE (LCY-b) e LICOPENO- ϵ -CICLASE (LCY-e), respectivamente. A atividade da LCY-b leva a formação de β -caroteno, enquanto que LCY-e catalisa a reação onde o licopeno é convertido a δ -caroteno (Gómez-García e Ochoa-Alejo, 2013). A partir das cadeias cíclicas de carotenoides, reações de hidroxilação catalizadas por hidroxilases, levam à formação de xantofilas (Ruiz-Sola e Rodríguez-Concepción, 2012) (Figura 1).

Excepcionalmente, em frutos carregando a mutação *Beta carotene*, o aumento da expressão do gene *Beta*, que codifica a enzima LCY-b, ocasiona alto acúmulo de β -caroteno nos frutos. Por isso, os frutos possuem coloração alaranjada mesmo quando maduros (Ronen *et al.*, 2000). Ainda em tomate, outra mutação denominada *Delta carotene*, causa aumento no acúmulo de δ -caroteno devido a elevada expressão do gene que codifica a enzima LCY-e.

Desta forma, ao final do amadurecimento, os frutos possuem coloração vermelho-alaranjada (Ronen *et al.*, 1999) (Figura 1).

Figura 1. Esquema representativo da via de biossíntese de carotenoides em plantas. Em destaque as enzimas com atividade alterada e o respectivo fenótipo dos frutos carregando as mutações *yellow flesh*, *tangerine*, *Delta carotene* e *Beta carotene*. Em azul, enzimas responsáveis pelas diferentes reações de instauração, ciclização e hidroxilação. PSY: fitoeno sintase, PDS: fitoenodesaturase, ZDS: zeta-caroteno isomerase, CRTISO: carotenoide isomerase, LCY-e: licopeno-ε-ciclase, LCY-b: licopeno-β-ciclase. Traços pontilhados indicam a coloração característica de cada carotenoide. Modificado de Bordignon (2015).

O amadurecimento em tomate é caracterizado por um aumento na taxa respiratória e produção de etileno, em um mecanismo comum entre frutos climatéricos (Klee e Giovannoni, 2011). Nestes frutos, dois sistemas de produção de etileno operam. No primeiro, a concentração de etileno é mantida em baixos níveis, devido a sua auto-inibição. Com o

avanço do amadurecimento, a concentração do hormônio é elevada por sua atividade auto-catalítica (Alexander e Grierson, 2002). A contribuição do etileno no amadurecimento de frutos climatéricos foi amplamente estudada fazendo-se uso de mutantes defectivos em reguladores transcricionais relacionados ao amadurecimento, como *ripening-inhibitor* (Vrebalov *et al.*, 2002), *Colorless-non-ripening* (Giovannoni, 2007) e *non-ripening* (Yuan *et al.*, 2016). Após a indução da produção auto-catalítica de etileno e aumento na taxa respiratória, uma série de processos bioquímicos e fisiológicos alteram a aparência, textura, sabor e aroma dos frutos climatéricos (Alexander e Grierson, 2002). O acúmulo de carotenoides é um dos processos impulsionados com o amadurecimento e também está relacionado a produção de etileno (Wang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018).

O caráter climatérico do tomate permite antecipar sua colheita em estádios iniciais de maturação, tornando mais flexível a duração do período entre a colheita e comercialização. Esta prática pode aumentar a vida útil do fruto, no entanto, aspectos de qualidade como teor de ácidos e açúcares, conteúdo de carotenoides e firmeza da polpa podem ser prejudicados (Verheul, Slimestad e Tjøstheim, 2015). O uso de genótipos carregando mutações que afetam o amadurecimento é também uma das estratégias que têm sido empregadas para aumentar a vida útil do tomate, a exemplo dos híbridos do tipo “longa vida” (Shirahige *et al.*, 2010). Este incremento no período de conservação se dá principalmente em razão do retardo no amolecimento da polpa. No entanto, a síntese de pigmentos e o aroma dos frutos podem ser severamente comprometidos, uma vez que estas linhagens apresentam menor síntese e/ou sensibilidade ao etileno (Tarcísio, Vecchia e Koch, 2000). Os carotenoides, além de conferirem a pigmentação e estarem diretamente envolvidos com a aparência dos frutos, também podem alterar seu aroma, visto que importantes compostos voláteis do tomate são derivados de carotenoides (Zhang *et al.*, 2015). Tais compostos são denominados apocarotenoides e participam da percepção dos sabores através de complexas interações entre o olfato e o paladar (Tieman *et al.*, 2012). Vogel *et al.* (2010) mostraram que genótipos de tomate apresentando inibição da síntese de carotenoides são também deficientes em apocarotenoides, o que limita a percepção da doçura dos frutos e reduz a aceitabilidade pelos consumidores.

Outro fator decorrente do amadurecimento e que pode afetar a qualidade dos frutos é a suscetibilidade destes aos fungos patogênicos (Giovannoni, 2004). Durante o armazenamento e vida útil do tomate, os fungos *Alternaria alternata*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium* spp. e *Botrytis cinerea* contribuem para significativa perda da qualidade estrutural, estética e visual, tornando os frutos não comercializáveis (Zhao *et al.*, 2008). O fungo

necrotrófico *Botrytis cinerea*, causador do mofo cinzento, pode infectar flores, frutos, folhas e caules. Seu modo de colonização nos tecidos dos frutos envolve a síntese de toxinas que induzem necrose, além da produção de espécies reativas de oxigênio causadoras de danos aos componentes celulares (Choquer *et al.*, 2007). No período pós-colheita, este fungo é responsável por considerável volume de perdas qualitativas e quantitativas, considerando que os frutos encontram-se mais suscetíveis nesta fase (Romanazzi *et al.*, 2016).

Em função da estratégia de infecção e colonização do tecido pelos patógenos, distintos mecanismos naturais de defesa podem ser ativados, dentre eles, a produção de metabólitos secundários, tais como terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. Os carotenoides estão incluídos na classe dos terpenos e são considerados agentes eficientes contra espécies reativas de oxigênio e radicais livres, por suas propriedades antioxidantes capazes de promover o sequestro dessas moléculas (Ramel *et al.*, 2012). Um dos mecanismos de defesa vegetal contra patógenos consiste na ativação da resposta de hipersensibilidade, caracterizada pela produção de espécies reativas de oxigênio que levam o tecido a morte e impedem a colonização dos patógenos. Esta reação se caracteriza como uma resposta celular extrema promovendo a morte repentina das células próximas ao local de infecção do patógeno. Assim, o agente patogênico é isolado em uma região de células necrosadas, impedindo seu crescimento e desenvolvimento (Resende, Salgado e Chaves, 2003).

Embora este seja um importante mecanismo na defesa vegetal, nem todos os patógenos percebem a resposta de hipersensibilidade como um efeito nocivo, como no caso de *B. cinerea*. Isto porque a infecção deste tipo de patógeno envolve justamente a colonização em células mortas, assim, a consequente produção de espécies reativas de oxigênio acaba favorecendo seu crescimento e desenvolvimento no hospedeiro (Rossi *et al.*, 2011). O efeito de pigmentos com ação antioxidante contra *B. cinerea* já foi constatado. Utilizando genótipos de tomateiro exibindo alto teor de antocianinas nos frutos, Zhang *et al.* (2013) e Bassolino *et al.* (2013) observaram relação direta entre o aumento do conteúdo de antocianinas e a elevação da capacidade antioxidante, o que favoreceu a diminuição da velocidade do processo de amadurecimento dos frutos e menor suscetibilidade ao fungo *B. cinerea*. Da mesma forma, betalaínas já provaram ser eficientes contra a manifestação da podridão cinzenta causada por *B. cinerea* em plantas de tabaco (Polturak *et al.*, 2017).

Os carotenoides são reconhecidos por sua capacidade de atuarem no sequestro de radicais livres, no entanto, há escassez de trabalhos relatando a contribuição destes pigmentos no desenvolvimento de fungos necrotróficos. Além disso, embora as funções dos carotenoides no processo fotossintético sejam conhecidas, a sua contribuição quando acumulados no

cromoplasto ainda foi pouco explorada, sendo relacionada basicamente a função ecológica de atração de dispersores. Acredita-se que uma das razões para a inexistência de estudos abordando este tema decorra da dificuldade de se obter frutos de uma mesma espécie com alterada composição de carotenoides. Sem isso, torna-se difícil concluir se o efeito observado está relacionado à presença do pigmento ou a outro fator inerente ao *background* genético das diferentes espécies, quando comparadas.

O uso de genótipos contrastantes, sejam eles mutantes ou plantas transgênicas, vem sendo a principal abordagem utilizada em estudos genético-fisiológicos (Emmanuel and Levy, 2002). O tomateiro possui uma série de características que o qualificam como o principal modelo disponível para estudos fisiológicos, bioquímicos e moleculares em frutos carnosos (Giovannoni, 2004). Esta espécie é uma das mais adequadas para estudos relacionados à carotenogênese, devido ao elevado conteúdo de carotenoides acumulados nos frutos (Yoo *et al.*, 2017). Além disso, a interação entre frutos de tomateiro e *B. cinerea* já demonstrou ser um modelo adequado para estudos fitopatológicos (Cantu *et al.*, 2008). Em trabalho anterior, Bordignon (2015) obteve linhagens quase isogênicas a cultivar Micro Tom, carregando variações alélicas que afetam a composição de carotenóides nos frutos. A caracterização dessas linhagens revelou alterações em aspectos produtivos e na qualidade nutricional dos frutos que amadureceram na planta. Não obstante, a caracterização do amadurecimento desses mutantes após a colheita, assim como a suscetibilidade destes a patógenos neste estágio ainda permanece em aberto.

Em razão do exposto acima, este trabalho teve como objetivo caracterizar o impacto de variações alélicas que afetam a carotenogênese (*B*, *r*, *t* e *Del*) no padrão de amadurecimento e na conservação pós-colheita dos frutos. Adicionalmente, buscou-se determinar se o conteúdo e a composição de carotenoide em cada linhagem afeta a suscetibilidade dos frutos ao fungo *Botrytis cinerea*.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, L.; GRIERSON, D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 377, p. 2039–2055, 1 out. 2002.
- ALMEIDA, J. *et al.* Fruits from ripening impaired, chlorophyll degraded and jasmonate insensitive tomato mutants have altered tocopherol content and composition. **Phytochemistry**, v. 111, p. 72–83, 2015.
- BARTLEY, G. E.; SCOLNIK, P. A. Plant Carotenoids: Pigments for Photoprotection, Visual Attraction, and Human Health. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1027–1038, 1995.
- BASSOLINO, L. *et al.* Accumulation of anthocyanins in tomato skin extends shelf life. **New Phytologist**, v. 200, n. 3, p. 650–655, nov. 2013.

- BIAN, W. *et al.* Metabolic and Molecular Events Occurring during Chromoplast Biogenesis. **Journal of Botany**, v. 2011, p. 1–13, 15 set. 2011.
- BORDIGNON, S. R. **Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “ Luiz de Queiroz ”** **Obtenção e uso de linhagens quase isogênicas de tomateiro (Solanum lycopersicum L . cv Micro-Tom) afetando a composição de carotenoides : uma ferramenta para o estudo da nutrac.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2015.
- BRAMLEY, P. M. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 377, p. 2107–2113, 1 out. 2002.
- CANTU, D. *et al.* The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 3, p. 859–864, 2008.
- CARVALHO, R. F. *et al.* Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: “Micro-Tom” as an effective toolkit for plant development research. **Plant methods**, v. 7, n. 1, p. 18, 29 jun. 2011.
- CAZZANIGA, S. *et al.* Differential Roles of Carotenes and Xanthophylls in Photosystem I Photoprotection. **Biochemistry**, v. 55, n. 26, p. 3636–3649, 5 jul. 2016.
- CHENG, H. M. *et al.* Lycopene and tomato and risk of cardiovascular diseases: A systematic review and meta-analysis of epidemiological evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1–18, 11 ago. 2017.
- CHOQUER, M. *et al.* *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. **FEMS Microbiology Letters**, v. 277, n. 1, p. 1–10, dez. 2007.
- EGEA, I. *et al.* Chromoplast Differentiation: Current Status and Perspectives. **Plant and Cell Physiology**, v. 51, n. 10, p. 1601–1611, 1 out. 2010.
- EGEA, I. *et al.* Chloroplast to chromoplast transition in tomato fruit: spectral confocal microscopy analyses of carotenoids and chlorophylls in isolated plastids and time-lapse recording on intact live tissue. **Annals of botany**, v. 108, n. 2, p. 291–7, ago. 2011.
- EMMANUEL, E.; LEVY, A. A. Tomato mutants as tools for functional genomics. **Current opinion in plant biology**, v. 5, n. 2, p. 112–7, abr. 2002.
- FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 3, p. 228–265, 2004.
- FRASER, P. D.; BRAMLEY, P.; SEYMOUR, G. B. Effect of the *Cnr* mutation on carotenoid formation during tomato fruit ripening. **Phytochemistry**, v. 58, n. 1, p. 75–79, 2001.
- FRAY, R. G.; GRIERSON, D. Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and co-suppression. **Plant molecular biology**, v. 22, n. 4, p. 589–602, jul. 1993.
- GIORIO, G.; STIGLIANI, A. L.; D’AMBROSIO, C. Agronomic performance and transcriptional analysis of carotenoid biosynthesis in fruits of transgenic HighCaro and control tomato lines under field conditions. **Transgenic research**, v. 16, n. 1, p. 15–28, fev. 2007.
- GIOVANNONI, J. J. Genetic regulation of fruit development and ripening. **The Plant cell**, v. 16 Suppl, n. Suppl, p. S170-80, 2004.

- GIOVANNONI, J. J. Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, n. 3, p. 283–289, 1 jun. 2007.
- GÓMEZ-GARCÍA, M. DEL R.; OCHOA-ALEJO, N. Biochemistry and molecular biology of carotenoid biosynthesis in chili peppers (*Capsicum* spp.). **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 9, p. 19025–53, 16 set. 2013.
- HARRY A. FRANK*, ‡ AND; GARY W. BRUDVIG*, §. Redox Functions of Carotenoids in Photosynthesis†. 2004.
- HASHIMOTO, H.; URAGAMI, C.; COGDELL, R. J. Carotenoids and Photosynthesis. *In*: [s.l.] Springer, Cham, 2016. p. 111–139.
- ISAACSON, T. *et al.* Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta-carotene and xanthophylls in plants. **The Plant cell**, v. 14, n. 2, p. 333–42, fev. 2002.
- KLEE, H. J.; GIOVANNONI, J. J. Genetics and Control of Tomato Fruit Ripening and Quality Attributes. **Annual Review of Genetics**, v. 45, n. 1, p. 41–59, 15 dez. 2011.
- KRINSKY, N. I. Carotenoid protection against oxidation. **Pure and Applied Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 649–660, 1 jan. 1979.
- LI, F.; TSFADIA, O.; WURTZEL, E. T. The phytoene synthase gene family in the Grasses: subfunctionalization provides tissue-specific control of carotenogenesis. **Plant signaling & behavior**, v. 4, n. 3, p. 208–11, mar. 2009.
- LIU, Y.-S. *et al.* There is more to tomato fruit colour than candidate carotenoid genes. **Plant Biotechnology Journal**, v. 1, n. 3, p. 195–207, 25 abr. 2003.
- LYTOVCHENKO, A. *et al.* Tomato Fruit Photosynthesis Is Seemingly Unimportant in Primary Metabolism and Ripening But Plays a Considerable Role in Seed Development 1[W][OA]. [s.d.].
- PANDURANGAIAH, S. *et al.* Differential expression of carotenoid biosynthetic pathway genes in two contrasting tomato genotypes for lycopene content. **Journal of biosciences**, v. 41, n. 2, p. 257–64, jun. 2016.
- PECKER, I. *et al.* A single polypeptide catalyzing the conversion of phytoene to zeta-carotene is transcriptionally regulated during tomato fruit ripening. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 11, p. 4962–6, 1 jun. 1992.
- POLTURAK, G. *et al.* Engineered gray mold resistance, antioxidant capacity, and pigmentation in betalain-producing crops and ornamentals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 34, p. 9062–9067, 22 ago. 2017.
- POWELL, A. L. T. *et al.* Transgenic Expression of Pear PGIP in Tomato Limits Fungal Colonization. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, n. 9, p. 942–950, set. 2000.
- RAMEL, F. *et al.* Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 14, p. 5535–5540, 3 abr. 2012.
- RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 123–130, abr. 2003.
- ROMANAZZI, G. *et al.* Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. **Postharvest Biology and Technology**, v. 113, p. 69–76, 2016.

- RONEN, G. *et al.* Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 17, n. 4, p. 341–51, fev. 1999.
- RONEN, G. *et al.* An alternative pathway to beta -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 20, p. 11102–11107, 26 set. 2000.
- ROSSI, F. R. *et al.* The Sesquiterpene Botrydial Produced by *Botrytis cinerea* Induces the Hypersensitive Response on Plant Tissues and Its Action Is Modulated by Salicylic Acid and Jasmonic Acid Signaling. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 8, p. 888–896, ago. 2011.
- RUIZ-SOLA, M. Á.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Carotenoid biosynthesis in Arabidopsis: a colorful pathway. **The arabidopsis book**, v. 10, p. e0158, 2012.
- SCOTTON, D. C. *et al.* Expression of the *Theobroma cacao* *Bax-inhibitor-1* gene in tomato reduces infection by the hemibiotrophic pathogen *Moniliophthora perniciosa*. **Molecular Plant Pathology**, v. 18, n. 8, p. 1101–1112, out. 2017.
- SESTARI, I. *et al.* Near-isogenic lines enhancing ascorbic acid, anthocyanin and carotenoid content in tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) as a tool to produce nutrient-rich fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 175, p. 111–120, 15 ago. 2014.
- SHIRAHIGE, F. H. *et al.* Produtividade e qualidade de tomates Santa Cruz e Italiano em função do raleio de frutos. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 292–298, set. 2010.
- STORY, E. N. *et al.* An update on the health effects of tomato lycopene. **Annual review of food science and technology**, v. 1, p. 189–210, 2010.
- SU, L. *et al.* Carotenoid accumulation during tomato fruit ripening is modulated by the auxin-ethylene balance. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2015.
- TARCÍSIO, P.; VECCHIA, D.; KOCH, P. S. Tomates longa vida: O que são, como foram desenvolvidos? v. 18, n. 1, 2000.
- TIEMAN, D. *et al.* Report The Chemical Interactions Underlying Tomato Flavor Preferences. **Current Biology**, v. 22, p. 1035–1039, 2012.
- VERHEUL, M. J.; SLIMESTAD, R.; TJØSTHEIM, I. H. From Producer to Consumer: Greenhouse Tomato Quality As Affected by Variety, Maturity Stage at Harvest, Transport Conditions, and Supermarket Storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 20, p. 5026–5034, 2015.
- VOGEL, J. T. *et al.* Carotenoid content impacts flavor acceptability in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 13, p. 2233–2240, 1 out. 2010.
- VREBALOV, J. *et al.* A MADS-Box Gene Necessary for Fruit Ripening at the Tomato Ripening-Inhibitor (Rin) Locus. **Science**, v. 296, n. 5566, p. 343–346, 12 abr. 2002.
- WANG, L. *et al.* Regulation of ethylene-responsive SIWRKYs involved in color change during tomato fruit ripening. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16674, 30 dez. 2017.
- WANG, Y. Q. *et al.* Proteomic analysis of chromoplasts from six crop species reveals insights into chromoplast function and development. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 4, p. 949–961, 2013.

- WIJK, K. J. VAN; KESSLER, F. Plastoglobuli: Plastid Microcompartments with Integrated Functions in Metabolism, Plastid Developmental Transitions, and Environmental Adaptation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 68, n. 1, p. 253–289, 28 abr. 2017.
- YOO, H. J. *et al.* Inferring the genetic determinants of fruit colors in tomato by carotenoid profiling. **Molecules**, v. 22, n. 5, p. 1–14, 2017.
- YUAN, H. *et al.* Carotenoid metabolism and regulation in horticultural crops. **Horticulture Research**, v. 2, n. June, 2015.
- YUAN, X.-Y. *et al.* Role of the Tomato Non-Ripening Mutation in Regulating Fruit Quality Elucidated Using iTRAQ Protein Profile Analysis. **PloS one**, v. 11, n. 10, p. e0164335, 2016.
- ZHANG, J. *et al.* Genome-Wide Association Mapping for Tomato Volatiles Positively Contributing to Tomato Flavor. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1042, 27 nov. 2015.
- ZHANG, J. *et al.* A tomato MADS-box protein, SlCMB1, regulates ethylene biosynthesis and carotenoid accumulation during fruit ripening. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 3413, 21 dez. 2018.
- ZHANG, Y. *et al.* Anthocyanins double the shelf life of tomatoes by delaying overripening and reducing susceptibility to gray mold. **Current Biology**, v. 23, n. 12, p. 1094–1100, 2013.
- ZHAO, Y. *et al.* Biological control of the post-harvest pathogens *Alternaria solani* , *Rhizopus stolonifer* , and *Botrytis cinerea* on tomato fruit by *Pichia guilliermondii*. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 83, n. 1, p. 132–136, 7 jan. 2008.

2. CARACTERIZAÇÃO DO AMADURECIMENTO E QUALIDADE NUTRICIONAL DE FRUTOS DE TOMATEIRO CARREGANDO MUTAÇÕES QUE AFETAM A COMPOSIÇÃO DE CAROTENOIDES

RESUMO

O acúmulo de carotenoides é um dos fatores que mais contribuem com a manutenção da aparência de frutos de tomateiro, devido a sua função como pigmentos, além de atuarem indiretamente na definição do sabor e aroma. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito do acúmulo de diferentes carotenoides no amadurecimento pós-colheita e nos principais parâmetros de qualidade dos frutos. Para isso foram utilizadas linhagens quase-isogênicas ao Micro Tom (MT), carregando mutações que alteram a atividade de enzimas da carotenogênese e, conseqüentemente, a composição de carotenoides. Os frutos foram colhidos em estágio verde-maduro e o avanço do amadurecimento e principais parâmetros de qualidade foram acompanhados até o alcance do estágio vermelho-maduro característico do MT. A introgressão das mutações ocasionou efeitos pleiotrópicos que alteraram a velocidade do amadurecimento dos frutos e os principais parâmetros de qualidade. Os frutos carregando a mutação *yellow flesh*, que causa ausência de carotenoides, tiveram o período climatérico e amadurecimento antecipados. Nesse mutante também foram encontrados os maiores teores de ácido ascórbico. De modo contrário, a mutação *tangerine*, cuja atividade da enzima carotenoide-isomerase é prejudicada, retardou o amadurecimento dos frutos e reduziu o teor de ácido ascórbico. O atraso na formação de carotenoides de *tangerine* comprova a função desta enzima em permitir a formação de pigmentos no escuro. O conteúdo de sólidos solúveis totais foi maior no mutante *Delta carotene*, cuja mutação causa aumento na concentração de δ -caroteno. A firmeza dos frutos foi afetada neste mutante e em *yellow flesh*, em um efeito provavelmente causado pelo aumento da produção de etileno. O maior acúmulo de β -caroteno no mutante *Beta carotene* aumentou a espessura da cutícula dos frutos, no entanto, esta característica não reduziu a perda de massa dos frutos ao longo do armazenamento. Ainda, o aumento na concentração deste carotenoide não pôde compensar a redução de licopeno na atividade antioxidante lipofílica dos frutos, sendo que os mutantes *tangerine* e *Delta carotene* foram os únicos com sequestro de radicais livres semelhante a MT, devido a conservação de isoformas de licopeno. Estes resultados demonstram a influência dos carotenoides nos eventos que regulam o amadurecimento e qualidade dos frutos de tomate, e provém bases para a modificação de seu acúmulo, de modo a obter frutos com diferente composição nutricional.

Palavras-chave: Micro Tom; Linhagens quase-isogênicas; *Solanum lycopersicum*
Climatérico

ABSTRACT

The accumulation of carotenoids is one of the factors that most contribute to the appearance maintenance of tomato fruit, due to its function as pigments, besides acting indirectly in the definition of flavor and aroma. The aim of this study was to verify the effect of different carotenoids accumulation on fruit post-harvest ripening and on the main parameters of fruit quality. In order to this, we used Micro Tom (MT) near-isogenic lines harboring mutations that alter the activity of carotenogenesis enzymes and, consequently, the composition of carotenoids. The fruits were harvested in mature green stage and the maturation progress and main quality parameters were monitored until reaching the red ripe stage relative to MT. The introgression of the mutations caused pleiotropic effects that altered the fruit ripening speed and the main quality parameters. The fruits carrying the *yellow flesh* mutation, which causes absence of carotenoids, had the climacteric period and maturation anticipated. In this mutant the highest levels of ascorbic acid were also found. Conversely, the *tangerine* mutation, whose carotenoid-isomerase enzyme activity is impaired, delayed fruit maturation and reduced ascorbic acid content. The delay in carotenoid formation of *tangerine* confirms the function of this enzyme in allowing the synthesis of pigments in the dark. The content of total soluble solids was higher in *Delta carotene* mutant, whose mutation causes an increase in δ -carotene concentration. Fruit firmness was affected in this mutant and in *yellow flesh*, an effect probably caused by increased ethylene production. The higher accumulation of β -carotene in the mutant *Beta carotene* increased the cuticle thickness, however, this characteristic did not reduce the mass loss of fruit during the storage. Also, the increase in the concentration of this carotenoid could not compensate for the reduction of lycopene in the lipophilic antioxidant activity of the fruits, and the mutants *tangerine* and *Delta carotene* were the only ones with free radical sequestration similar to MT due to the conservation of lycopene isoforms. These results demonstrate the influence of carotenoids on the events that regulate the maturation and quality of tomato fruits, and provide bases for the modification of their accumulation, in order to obtain fruits with different nutritional composition.

Keywords: Micro Tom; Near-isogenic lines; *Solanum lycopersicum*; Climacteric

2.1. INTRODUÇÃO

As modificações ocorridas durante o período pós-colheita de frutos e hortaliças ocasionam profundas alterações nos tecidos dos frutos, principalmente em frutos climatéricos, caracterizados pelo aumento na atividade respiratória e síntese de etileno (Grierson, 2013). O aumento na velocidade das reações metabólicas resulta em alterações dos principais atributos de qualidade dos frutos, como firmeza de polpa, sabor, aparência e propriedades nutricionais, podendo tornar os frutos mais atrativos ao consumidor ou acelerar a sua deterioração (Klee e Giovannoni, 2011). Algumas estratégias vêm sendo empregadas com o intuito de prolongar a

vida de útil dos frutos de tomateiro, dentre elas o uso de genótipos carregando mutações que retardam o amadurecimento dos frutos. Esta estratégia, no entanto, pode afetar negativamente os principais atributos de qualidade, considerando que as modificações que tornam os frutos mais atrativos ao consumidor são desencadeadas pelo amadurecimento (Tarcísio, Vecchia e Koch, 2000).

Os carotenoides são os principais pigmentos encontrados no tomate e são responsáveis por sua coloração vermelha característica, devido aos altos níveis de licopeno presentes na pele e polpa dos frutos (Story *et al.*, 2010). Os carotenoides também estão envolvidos na determinação do aroma e sabor dos frutos, por serem precursores da síntese de determinados compostos voláteis de importância para o tomate (Tieman *et al.*, 2012). Além disso, os carotenoides possuem reconhecidas propriedades nutricionais, devido à elevada atividade antioxidante e participação na síntese da vitamina A (Frusciante *et al.*, 2007). Inicialmente presentes nos cloroplastos e envolvidos em funções relacionadas à fotossíntese, os carotenoides têm sua dinâmica alterada com a diferenciação do cloroplasto para cromoplasto, durante o amadurecimento dos frutos. Nesta transição, clorofilas e membranas dos cloroplastos são degradadas e os carotenoides são sequestrados em estruturas lipoproteicas (Bian *et al.*, 2011). Algumas mutações na via da carotenogênese descobertas em tomateiro foram importantes para a compreensão dos eventos que regulam sua síntese. A mutação *yellow flesh* é ocasionada pela alteração na expressão de *PSY1*, que codifica a enzima fitoeno sintase. Como esta é a etapa inicial na formação de carotenoides, os frutos apresentam coloração amarela devido ao baixo acúmulo dos pigmentos (Fray e Grierson, 1993; Liu *et al.*, 2003). A mutação *tangerine* também ocasiona redução na atividade de uma das enzimas da carotenogênese. Nos frutos deste mutante, a perda de função da carotenoide isomerase impede a isomerização de *cis*-licopeno a *trans*-licopeno, como resultado, os frutos possuem coloração alaranjada devido ao acúmulo de prolicopeno (Isaacson *et al.*, 2002). Em condições normais, durante o amadurecimento do tomate, a expressão das enzimas que atuam na ciclização do licopeno é reduzida (Pandurangaiah *et al.*, 2016). No entanto, no mutante *Beta carotene*, o ganho de função da enzima licopeno- β -ciclase leva à conversão de quase todo o licopeno em β -caroteno (Ronen *et al.*, 2000). De modo semelhante, no mutante *Delta carotene*, o aumento na atividade da licopeno- ϵ -ciclase ocasiona acúmulo de δ -caroteno ao custo de licopeno (Ronen *et al.*, 1999).

O uso de genótipos mutantes vem sendo uma das principais abordagens utilizadas em estudos genético-fisiológicos (Emmanuel e Levy, 2002). A partir de um modelo genético, pode-se criar linhagens quase isogênicas para o estudo de determinada característica através

de introgressões de mutações em um único *background* genético. Esta estratégia fornece um comparativo confiável, uma vez que as variações fenotípicas encontradas podem ser associadas apenas ao efeito da mutação em questão (Carvalho *et al.*, 2011). O tomateiro possui uma série de características que o qualificam como o principal modelo disponível para estudos fisiológicos, bioquímicos e moleculares em frutos carnosos (Giovannoni, 2004). A cultivar Micro-Tom (MT) é um reconhecido modelo vegetal que permite a obtenção de linhagens quase-isogênicas de forma rápida e eficiente (Campos *et al.*, 2010). Além disso, o emprego de linhagens quase isogênicas ao Micro Tom já se provou ser um eficiente meio para obtenção de frutos com elevada propriedade nutricional (Sestari *et al.*, 2014).

Tendo em vista a participação dos carotenoides na determinação dos principais atributos de qualidade do tomate e seu envolvimento com o amadurecimento dos frutos, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da diferente composição de carotenoides no amadurecimento e qualidade de frutos de tomate durante o período pós-colheita. Para acessar esta informação, foram utilizadas linhagens quase isogênicas ao MT, carregando mutações que alteram a atividade de enzimas da carotenogênese. Deste modo, foi possível isolar a contribuição dos pigmentos no amadurecimento e na determinação da qualidade dos frutos.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Material vegetal e condições de cultivo

As linhagens quase isogênicas de tomate *Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom foram obtidas da coleção de mutantes do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal (HCPD-LAB), Universidade de São Paulo, Brasil. As mutações utilizadas neste estudo foram Beta carotene (B), tangerine (t), yellow flesh (r) e Delta carotene (Del). As plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura média de 28°C, fotoperíodo de 11,5 h/13 h (inverno/verão) e radiação fotossinteticamente ativa de 250-350 $\mu\text{mol s}^{-1}$ de fótons m^{-2} . O substrato de plantio consistiu de mistura de substrato comercial (Plantmax HT, Eucatex, São Paulo, Brasil) e vermiculita expandida (1:1). A suplementação nutricional foi realizada no momento da semeadura, incorporando ao substrato NPK 10:10:10 e 4 g L^{-1} de calcário dolomita ($\text{MgCO}_3 + \text{CaCO}_3$). A adubação foliar foi realizada semanalmente a partir da antese (~35 dias após a semeadura), com 1 g L^{-1} de fertilizante de Peters 20-20-20 (NPK). Frutos uniformes foram colhidos no estágio verde-maduro (~38 dias

após a antese) e armazenados em temperatura média de 23°C. A taxa respiratória, produção de etileno, coloração e perda de massa dos frutos foram analisadas em intervalos de três dias, até o alcance do estágio vermelho-maduro característico do Micro Tom, definido em função da coloração vermelha da epiderme. Parte dos frutos colhidos foram reservados para análises destrutivas de avaliação da qualidade, que foram realizadas quando os frutos atingiram os estádios verde-maduro, breaker e vermelho-maduro. O estágio breaker foi caracterizado como o início da alteração da cor verde da epiderme. Frutos no estágio verde-maduro e vermelho-maduro também foram utilizados para análise anatômica de espessura da cutícula. Ao término do armazenamento parte dos frutos tiveram a porção de pele e polpa cuidadosamente separadas e congeladas em nitrogênio líquido para análises posteriores.

2.2.2. Taxa respiratória e produção de etileno

Frutos representativos foram acondicionados em recipientes herméticos (volume de 150 mL) durante 1 hora e 2 horas, para quantificação da taxa respiratória e produção de etileno, respectivamente. Após o período de acondicionamento, alíquotas de 0,5 mL do *headspace* foram injetadas em cromatógrafo a gás Thermofinigan Trace GC Ultra (Thermo Fisher Scientific, EUA), equipado com detector de ionização de chama (FID), metanador e coluna de aço inox de 1/8'' e 1,8 m de comprimento, preparada com Porapak N 50/80. O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 25 mL min⁻¹. A temperatura da coluna, injetor, detector e metanador foi de 110°C, 140°C, 200°C e 350°C, respectivamente. Para a calibração, a área dos cromatogramas foram comparadas com a área de padrões primários de dióxido de carbono (2000 e 10000 µL L⁻¹) e de etileno (0,5 e 2,0 µL L⁻¹). A taxa respiratória foi calculada com base na produção de CO₂ e representada como mg CO₂ kg⁻¹ h⁻¹ de massa fresca (MF). A produção de etileno foi representada como µg C₂H₄ kg⁻¹ h⁻¹, também em base de massa fresca.

2.2.3. Determinações físico-químicas

Perda de massa: determinada através da diferença entre a massa inicial e final dos frutos, com resultados expressos em porcentagem.

Cor: A coloração foi determinada por colorímetro (MinoltaChroma Meter CR-300), realizando três leituras na região equatorial dos frutos. A partir da determinação dos valores

CIE L^* , a^* , b^* , foram obtidos os parâmetros de luminosidade, representado por L^* , e de ângulo Hue, este último calculado em função da cotangente da relação entre a^* e b^* .

Firmeza: A firmeza da polpa foi determinada por penetrômetro manual (Turoni Italy, modelo 53205) com ponteira plana de 2 mm de diâmetro. Foram efetuadas duas leituras por fruto, em lados opostos da região equatorial, após cuidadosa remoção da epiderme na região da leitura. Os resultados foram expressos em Newtons (N).

Acidez titulável: Alíquotas de 5 g de frutos triturados foram diluídas em 90 mL de água destilada e tituladas com solução de hidróxido de sódio 0,1 N até pH 8,2 em pHmetro (Tecnal, modelo TEC-03 MP). Os valores foram expressos em % de ácido cítrico, com base em massa fresca.

Sólidos solúveis totais: Determinado por refratômetro digital (Atago Palete 101), através do índice de refração à 25°C. Os resultados foram expressos em % de sólidos solúveis, com base em massa fresca.

Teor de ácido ascórbico: Alíquotas de 5 g de frutos triturados foram adicionadas à 50 mL de solução de ácido oxálico 1%. O conteúdo de ácido ascórbico foi determinado por titulação, através da redução do indicador 2,6-diclorofenol indolfenol-sódio (DCFI) pelo ácido ascórbico. A calibração do DCFI foi realizada através de padrão de ácido ascórbico, em concentração conhecida. Os resultados foram expressos em mg g^{-1} , em base de massa fresca

2.2.4. Espessura da cutícula

Tecidos de pericarpo da região equatorial dos frutos foram fixadas em solução de Karnovsky, contendo formaldeído 4%, tampão fosfato 0,2 M, pH 7,2 e glutaraldeído 1% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 (Karnovsky, 1965). Os tecidos foram desidratados em série etílica até 100% e embebidos em resina plástica (Leica historesin®, Heraeus Kulzer, Hanau, Alemanha). Secções de 5-6 μm foram realizadas em micrótomo rotativo (Leica RM 2045), e submetidas a teste histoquímico com Sudan IV, para detecção de lipídios (Jensen, 1962). As imagens foram obtidas em microscópio DMLB (Leica, Wetzlar, Alemanha), acoplado à câmera (Leica DC 300F), e analisadas através do software ImageJ. As replicatas biológicas foram compostas de 5 frutos, tomando-se 15 medidas de cada secção.

2.2.5. Preparo dos extratos hidrofílico e lipofílico

As frações hidrofílicas e lipofílicas foram separadas para a realização das análises. O extrato hidrofílico foi obtido pela adição de 10 mL de etanol 80% em 100 mg de amostra liofilizada, seguido de agitação e encubação no escuro, por 30 minutos. A solução foi homogeneizada a 8000 g e o sobrenadante foi coletado e imediatamente utilizado para as análises. A obtenção do extrato lipofílico foi realizada segundo metodologia de Sérino *et al.* (2009), com modificações. Alíquotas de 50 mg de amostra liofilizada foram adicionadas em 100 µL de NaCl saturado e agitadas. Posteriormente, 200 µL de diclorometano foram incorporados ao extrato, seguido de nova agitação. Após a adição de 500 µL de mistura hexano/éter etílico (1:1), o extrato foi novamente agitado e centrifugado a 18000 g por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e os procedimentos, posteriores à etapa de adição da mistura hexano/éter etílico, foram repetidos até se obter um extrato quase incolor. O extrato foi submetido à evaporação a vácuo, em temperatura de 4°C, até a completa eliminação dos resíduos. Para a reconstituição do material sólido, foram adicionados 200 µL de acetato de etila. Após nova agitação, o extrato foi filtrado em membrana de 0,45 µm e imediatamente utilizado para as análises.

2.2.6. Identificação e quantificação de carotenoides

O extrato lipofílico foi utilizado para quantificação e identificação dos carotenoides. O ensaio foi realizado em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), modelo Infinity 1260, equipado com bomba quaternária e injetor automático acoplado a um detector *photo-diode array* (Agilent Technologies, EUA). Uma coluna C30 YCM (5 µm, 250 mm x 4,6 mm, i.d.) foi utilizada para separação dos compostos. As fases móveis consistiram de Metanol:MTBE:H₂O:Acetato de amônio 1 M, nas respectivas proporções de 88:5:5:2, no solvente A, e 28:70:0:2, no solvente B. O tempo total de corrida foi de 60 min, com gradientes de solventes consistindo em 100% de A no início, 15% aos 40 min e 0% aos 50 min. A temperatura da coluna foi mantida em 25 °C, com fluxo de 1 mL min⁻¹ e volume de injeção de 5-10 µL. Os picos eluídos foram monitorados em 450 nm e 474 nm.

A identificação do licopeno e β-caroteno foi realizada em comparação com o tempo de retenção de padrões autênticos. Para os demais carotenoides, uma tentativa de identificação foi realizada através da comparação com a ordem de eluição, espectro de absorção (%III/II) e valores de Q-ratio (II/D_B) reportados na literatura, conforme realizado por vários outros

autores (Cortés *et al.*, 2004; Gentili *et al.*, 2015; Gupta, Sreelakshmi e Sharma, 2015). O valor de (%III/II) representa a relação entre o maior pico de absorção (λ_{III}) e o pico de absorção mediano (λ_{II}), tomando-se o mínimo entre os dois picos como linha de base. O Q-ratio representa a relação entre o pico-*cis* de absorção e o pico de absorção mediano (λ_{II}). Os carotenoides identificados como licopeno, prolicopeno e neurosporeno foram quantificados em equivalente de licopeno, com base na curva de calibração do padrão. Os carotenoides identificados como β -caroteno, δ -caroteno, γ -caroteno, ζ -caroteno e luteína foram quantificados em equivalente de β -caroteno, também em função da curva de calibração do padrão autêntico. Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados foram expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$, em base de massa seca.

2.2.7. Compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi obtido por espectrofotômetro, a partir do extrato hidrofílico. A reação foi realizada pela adição de 200 μL do extrato em 1,5 mL de água destilada e 100 μL de Folin-Ciocalteu. Após 5 minutos, 200 μL de carbonato de sódio 20% foram incorporados à solução, que foi agitada e mantida em escuro por 1 h. A curva de calibração foi preparada com diferentes concentrações de ácido gálico em etanol 80%. As leituras foram realizadas em 765 nm e o ensaio foi conduzido em duplicata. Os resultados foram expressos em mg g^{-1} de equivalente de ácido gálico, em massa seca.

2.2.8. Capacidade antioxidante

A medida da capacidade antioxidante foi realizada no extrato lipofílico e hidrofílico, pelo método baseado na descoloração do radical ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino)-6-sulfônico). O preparo do radical ABTS foi realizado segundo Re *et al.* (1999), com modificações. A solução do radical foi preparada pela adição de 5 mL de solução estoque de ABTS 7 Mm em 88 μL de persulfato de potássio 140 mM. A solução foi mantida em escuro à temperatura ambiente por 16 h antes de se conduzir a análise. No dia da análise, uma solução de trabalho foi preparada, diluindo a solução do radical ABTS em álcool etílico, até o alcance de absorbância de 700 nm. A curva padrão foi preparada com ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano (Trolox). Para as análises, 20 μL do extrato foram adicionados em 2 mL da solução de trabalho de ABTS. Após 6 minutos de incubação em escuro, a 25 °C, a

absorbância foi lida em 734 nm e comparada com o Trolox. O ensaio foi conduzido em triplicada e os resultados foram expressos em $\mu\text{Mol g}^{-1}$ de equivalente de Trolox, em massa seca.

2.2.9. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software R Studio (versão 3. 2. 5). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos a análise de variância e expressos como média $\pm$ erro padrão. A normalidade e homogeneidade dos dados foram verificadas pelo teste de Shapiro-Wilk e de Bartlett, respectivamente. A diferença estatística entre as médias foi calculada pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Uma análise de componentes principais foi conduzida utilizando dados coletados no último dia de armazenamento. A matriz dos dados foi auto escalada antes da análise, de modo a obter o mesmo peso para cada variável.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Mutações que afetam a carotenogênese causam efeitos pleiotrópicos que alteram o padrão do amadurecimento dos frutos após a colheita.

A utilização de linhagens quase isogênicas ao MT carregando as mutações descritas anteriormente, tornou possível isolar a contribuição de diferentes carotenoides no amadurecimento pós-colheita frutos do tomate. Interessantemente, as mutações introgridas parecem ocasionar outros efeitos pleiotrópicos, já que não somente a coloração dos frutos foi alterada, mas também a velocidade no amadurecimento e no padrão climatérico (Figura 1). A cultivar Micro Tom atingiu o estágio vermelho-maduro no décimo oitavo dia de armazenamento (D18) (Figura 1A). Neste dia, os demais genótipos também completaram seu amadurecimento, apresentando a coloração característica esperada para cada mutação introgrida. A única exceção foi observada no mutante *t*, onde a alteração da coloração verde dos frutos foi visualizada apenas no décimo segundo dia de armazenamento (D12). De modo contrário, a velocidade na maturação de *r* foi mais acelerada que MT e os outros mutantes,

sendo que ao sexto dia de armazenamento (D6) foi possível observar o início da transição na coloração da epiderme, enquanto os outros genótipos permaneceram verdes (Figura 1A).

Com os dados colorimétricos, a modificação na coloração dos frutos pode ser confirmada. Em D6, o valor de ângulo Hue encontrado nos frutos de *r* foi menor que os outros genótipos ($P \leq 0,05$), indicando a transição para o estágio *breaker* (Figura 1B). A coloração amarelada observada nos frutos deste genótipo provavelmente deve-se ao acúmulo de narigenina chalcona, composto fenólico encontrado em maior quantidade na fração da pele (Georgé *et al.*, 2011). No último dia de armazenamento, o ângulo Hue de MT apresentou um significativo decréscimo, indicando incremento na coloração vermelha dos frutos. Em função do acúmulo de δ -caroteno, ocasionado pelo ganho de função da enzima licopeno- ϵ -ciclase, os frutos do mutante *Del* apresentaram coloração vermelho-alaranjada. Por este motivo, o ângulo Hue neste mutante foi superior ao do MT. De modo semelhante, a introgressão da mutação que causa aumento na atividade da enzima licopeno- β -ciclase, tornou os frutos *Beta* alaranjados, com ângulo Hue de 86° . A perda de função da enzima carotenoide isomerase, encontrada em *t*, ocasiona aumento no acúmulo de prolicopeno, tornando os frutos alaranjados ao final do amadurecimento (Gentili *et al.*, 2015). No entanto, neste estudo onde os frutos foram colhidos no estágio verde-maduro, o amadurecimento fora da planta alterou a coloração característica dos frutos do mutante *t* para amarelos ao final do armazenamento. Por este motivo, o valor de ângulo Hue foi semelhante ao observado em *r* (Figura 1C). Considerando a coloração vermelho-alaranjada do mutante *Del*, sua luminosidade seguiu um padrão semelhante a observada em MT, decrescendo a partir de D6 (Figura 1B). A redução deste parâmetro de cor é característica do fruto de tomateiro, quando os carotenoides começam a ser sintetizados. Com o avanço do amadurecimento, a alteração da cor rosada para vermelha reduz ainda mais a luminosidade dos frutos devido ao escurecimento da cor vermelha (López Camelo e Gómez, 2004).

Durante o amadurecimento, mesmo após a separação da planta, o acúmulo de carotenoides em frutos de tomateiro é iniciado ao passo em que degradação da clorofila ocorre, em processos desencadeados principalmente pela ação do etileno (Grierson, 2013). Considerando o reconhecido envolvimento deste hormônio na síntese de carotenoides e a continuidade do metabolismo de frutos climatéricos mesmo após a colheita, procedemos a investigação do efeito dessas mutações no padrão climatérico dos frutos. Para os mutantes *B*, *t* e *Del*, os maiores valores de taxa respiratória foram registrados em D12 (Figura 1C).

Figura 1. Mutações que afetam a carotenogênese alteram o padrão de amadurecimento do fruto do tomateiro no período pós-colheita. Evolução do amadurecimento do Micro tom (MT) e dos mutantes *Beta carotene* (B), *tangerine* (t), *yellow flesh* (r) e *Delta carotene* (Del) colhidos no estágio verde-maduro (A). Mudanças na coloração (ângulo Hue°) e luminosidade (L*) da epiderme dos frutos (B). Taxa respiratória e produção de etileno dos frutos (C). Barra de escala = 2 cm. Barras verticais representam o erro padrão da média (n=8).

A cultivar MT apresentou os menores valores de produção de CO₂, mesmo durante o pico respiratório, que ocorreu em D12 (52,8 mg kg⁻¹ h⁻¹ MS). No mutante *r*, o aumento na taxa respiratória foi o mais precoce entre os genótipos, tendo ocorrido em D6 (74,4 mg CO₂ kg⁻¹ h⁻¹ MS). O aumento na taxa respiratória de todos os genótipos procedeu o aumento da

síntese de etileno, comportamento característico do tomate e de outros frutos climatéricos. O mutante *r*, também apresentou a produção de etileno mais antecipada se comparada aos demais genótipos, se iniciando no terceiro dia de armazenamento (D3) e antecedendo o aumento da produção de CO₂ (Figura 1C).

A antecipação na síntese de etileno pode explicar a aceleração no amadurecimento de *r*, visto que a produção autocatalítica do hormônio, presente em frutos climatéricos, impulsiona modificações bioquímicas e o consequente amadurecimento dos frutos (Alexander e Grierson, 2002). Ainda, a maior produção de etileno também foi observada em *r*, no nono dia de armazenamento (D9), com valores de 12,9 µg kg⁻¹ h⁻¹ MF, enquanto que a produção de etileno no pico climatérico de MT foi de 4,7 µg kg⁻¹ h⁻¹ MF, também em D9. O mutante *Del* também produziu altas taxas de etileno, alcançando valores de 9,5 µg kg⁻¹ h⁻¹ MF em D9 e mantendo esta produção até D12, com posterior declínio. No mutante *t* a maior produção de etileno foi visualizada em D12, juntamente com o pico da produção de CO₂ (Figura 1C). Somente após este período, a coloração verde dos frutos começou a ser alterada (Figura 1A).

Embora o ápice da produção de etileno do mutante *t* tenha sido o mais tardio dentre os genótipos, sua ascensão se iniciou juntamente com os demais. Além disso, o momento onde se observou a maior taxa respiratória deste mutante coincidiu com o visualizado em MT. Isto sugere que o atraso na produção de pigmentos não seja um resultado isolado da alteração do padrão climatérico destes frutos. Não somente os eventos que regulam o amadurecimento podem influenciar a síntese de carotenoides. A participação da luz e temperatura também podem alterar o acúmulo de pigmentos em tomate (Cruz, 2017). Isaacson *et al.* (2002), avaliando a composição de pigmentos em plântulas do mutante *tangerine*, sugeriram que a provável função da enzima carotenoide isomerase em plantas é permitir a síntese dos pigmentos em condições de escuro e em tecidos não-fotossintetizantes. Considerando que os frutos utilizados em nosso trabalho foram amadurecidos fora da planta, na ausência de luz, é provável que esta enzima tenha função semelhante em frutos. Além disso, os demais mutantes com alteração na atividade de outras enzimas da carotenogênese não demonstraram atraso na produção de pigmentos. Assim, sugere-se que a atividade da carotenoide isomerase seja necessária para a formação de pigmentos em frutos amadurecidos no escuro.

A contribuição do etileno na modulação da carotenogênese também é conhecida. Sua atividade está relacionada à regulação na expressão de genes envolvidos com a síntese de carotenoides (Su *et al.*, 2015; Wisutiamonkul *et al.*, 2017). Alguns destes genes estão envolvidos em reações acima do licopeno, tais como *PSY1*, *ZISO*, *PDS*, *ZDS* e *CRTISO*, e outros abaixo do licopeno, como as licopeno-ciclases (Fraser e Bramley, 2004). A

participação do etileno no processo de amadurecimento já foi descrita em muitos trabalhos utilizando mutações que afetam a via do etileno e consequentemente o amadurecimento em tomateiro. Dentre as quais podemos destacar as mutações *ripening-inhibitor (rin)* (Fujisawa *et al.*, 2013; Vrebalov *et al.*, 2002) e *nonripening* (Giovannoni, 2004) as quais impactam negativamente a sinalização dependente do etileno, que culmina com aspectos do amadurecimento, em grande parte dependentes do homônio, a exemplo da síntese de vários carotenoides. Em outra mutação, denominada *Colourless-non-ripening (Cnr)*, a produção de etileno também é afetada e a ausência na expressão de PSY1 impede a formação de carotenoides (Fraser, Bramley e Seymour, 2001; Thompson *et al.*, 1999).

2.3.2. Os principais parâmetros de qualidade do tomate são alterados em frutos com diferente composição de carotenoides

Considerando a influência dos diferentes carotenoides no amadurecimento e padrão climatérico dos genótipos, nós procedemos a avaliação do impacto das referidas mutações nos principais parâmetros de qualidade dos frutos em diferentes estádios do desenvolvimento. Dentre os parâmetros avaliados, o conteúdo de sólidos solúveis totais e a acidez têm grande contribuição na qualidade, sendo determinante no sabor dos frutos (Bertin e Génard, 2018). No estágio vermelho-maduro, apenas o mutante *Del* diferiu de MT, com os valores mais altos de sólidos solúveis totais (5,82%) (Figura 2A). Os frutos deste genótipo possuem tamanho reduzido, o que pode explicar este efeito, uma vez que o conteúdo de açúcares solúveis apresenta correlação negativa com o tamanho dos frutos (Hernández-Bautista *et al.*, 2015).

O mutante *r* apresentou o menor teor de ácidos orgânicos no estágio vermelho-maduro (53%), provavelmente pela antecipação do período climatérico, que causou maior consumo de reservas em relação aos demais genótipos ao final do armazenamento (Figura 2B). A firmeza dos frutos também foi afetada (Figura 2C). Embora o MT apresentasse menor firmeza no estágio MG, os frutos com os menores valores registrados no estágio vermelho-maduro foram nos mutantes *r* e *Del*. O principal evento responsável pela diminuição da firmeza dos frutos é a degradação dos componentes da parede celular (Brummell, 2006). O amolecimento dos frutos é um dos processos desencadeados com o amadurecimento e muitas das enzimas envolvidas com a degradação da parede celular são induzidas pelo etileno (Alexander e Grierson, 2002; Grierson, 2013). Neste trabalho, os genótipos com menor

firmeza ao final do amadurecimento, foram aqueles que produziram as maiores quantidades do hormônio.

Figura 2. Parâmetros de qualidade da cultivar Micro tom (MT) e dos mutantes *Beta carotene*, *tangerine*, *yellow flesh* e *Delta carotene*, nos estádios de maturação verde, breaker e vermelho do tomate. Sólidos solúveis totais (A), acidez titulável (B), firmeza (C) e ácido ascórbico (D). Barras verticais indicam o erro padrão da média. Médias seguidas de letras iguais ou sem letras em cada estágio de maturação não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$).

O conteúdo de ácido ascórbico também foi acessado, uma vez que o tomate é considerado uma importante fonte de vitamina C. O teor deste ácido orgânico é inferior nos estádios iniciais de maturação do tomate e no decorrer do amadurecimento seu conteúdo aumenta, podendo permanecer constante ou apresentar declínio ao final do amadurecimento (Kotíková *et al.*, 2011). Com exceção do mutante *r*, que apresentou acréscimo no teor de ácido ascórbico com o avanço do amadurecimento, nos demais genótipos os teores deste antioxidante aumentaram em *breaker* e voltaram a diminuir no estágio vermelho-maduro, o que provavelmente indica seu consumo devido ao aumento no estresse oxidativo dos frutos neste estágio (Figura 2D). Nas etapas finais do amadurecimento, a atividade da enzima

ascorbato oxidase é elevada, ocasionando a degradação de ácido ascórbico à ácido dehidro-ascórbico e redução do oxigênio molecular à água. Além disso, o ascorbato é requerido para a atividade da enzima 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato oxidase (ACO), necessária para a síntese do etileno. Juntos, estes fatores podem explicar a redução no teor de ácido ascórbico com o avanço do amadurecimento (Yahia, Contreras-Padilla e Gonzalez-Aguilar, 2001).

Interessantemente, a ausência de carotenoides em *r* parece ter contribuído com o aumento dos teores de ácido ascórbico. Esta característica pode ser resultado de um mecanismo de defesa para compensar a falta de carotenoides nos frutos, tendo em vista a reconhecida atividade antioxidante do ácido ascórbico. Ainda, podemos destacar a contribuição da degradação da parede celular na síntese deste antioxidante, já que o rompimento das ligações entre os componentes da parede celular aumenta a disponibilidade de ácido galacturônico, um dos precursores do ácido ascórbico (Matteo, Di *et al.*, 2010; Rigano *et al.*, 2018). Deste modo, a maior produção de etileno e redução da firmeza em *r* podem ter contribuído para o aumento no fluxo de precursores da síntese de ácido ascórbico.

De modo contrário, durante os três estádios de maturação avaliados, o conteúdo de ácido ascórbico foi reduzido no mutante *t*. No estágio verde-maduro, os mutantes *B* e *Del* também revelaram menor conteúdo do antioxidante, no entanto, ao final do armazenamento seus teores foram semelhantes a MT. A interação entre carotenoides e o ácido ascórbico é conhecida. Apesar de sua natureza hidrofílica, o ácido ascórbico pode reagir com formas oxidadas de licopeno, β -caroteno e luteína, a fim de regenerar a molécula do carotenoide (Böhm, Edge e Truscott, 2012; Burke *et al.*, 2001; Mortensen, Skibsted e Truscott, 2001). No entanto, neste trabalho o conteúdo de ácido ascórbico foi alterado logo no estágio verde-maduro dos frutos mutantes, onde o teor de carotenoides é reduzido. Esta característica sugere que as mutações na via da carotenogênese podem ter alterado o conteúdo de outros antioxidantes mesmo antes da síntese de carotenoides nos frutos. Ainda, a variação no conteúdo de ácido ascórbico pode ser afetada pela velocidade na progressão do amadurecimento (Clutter e Miller, 1961). Estes autores verificaram que frutos com maturação mais rápida possuem maior conteúdo de ácido ascórbico que frutos cuja maturação é mais lenta. Assim, o atraso no amadurecimento de *t* pode ter afetado a síntese deste antioxidante, ao contrário de *r*, onde a maturação foi mais rápida e o conteúdo de ácido ascórbico foi mais elevado.

2.3.3. A modificação na síntese de carotenoides promove alterações na cutícula dos frutos

Considerando a importância da cutícula durante o amadurecimento dos frutos, a formação desta estrutura durante o período pós-colheita também foi avaliada. Para isso, nós investigamos possíveis diferenças entre a espessura da cutícula de frutos no início e final do armazenamento. No estágio verde-maduro, embora semelhante aos demais mutantes, *r* revelou aumento significativo na espessura da cutícula em relação ao MT, enquanto que no estágio vermelho-maduro, a espessura da cutícula dos frutos do mutante *B* curiosamente foi maior que nos demais genótipos avaliados (Figura 3A e C).

A cutícula é uma importante barreira de defesa dos frutos, contribuindo para seu turgor e integridade (Saladié *et al.*, 2007). Durante o amadurecimento, com a degradação das paredes celulares, a pressão interna dos frutos não é mais suportada pelo pericarpo, sendo transferida à epiderme e cutícula (Domínguez *et al.*, 2012). A formação desta estrutura é considerada parte da cascata de eventos que envolvem o amadurecimento dos frutos, uma vez que mudanças na expressão de genes relacionados a sua síntese alteram os genes envolvidos nas etapas finais do amadurecimento (Giménez *et al.*, 2010).

Trabalhos anteriores já comprovaram a relação entre genes envolvidos na formação da cutícula e na síntese de carotenoides. A inibição do gene *CUTIN DEFICIENT 2* em frutos de tomateiro ocasionou mudanças na espessura da cutícula, bem como no conteúdo de licopeno (Kimbara *et al.*, 2013). Em trabalho posterior, Giménez *et al.* (2015) demonstraram que o silenciamento de *TAGL1*, da família de fatores de transcrição MADS-box, ocasiona redução na formação da cutícula e na expressão de *PSY*, prejudicando a produção de pigmentos. Neste estudo também observamos interações entre a formação de carotenoides e a deposição de cutícula, uma vez que a diminuição da atividade da fitoeno sintase em *r*, aumentou a espessura da cutícula dos frutos no estágio verde-maduro. No entanto, nossos resultados também sugerem a participação da enzima licopeno- β -ciclase na formação desta estrutura, considerando que no estágio vermelho-maduro a espessura da cutícula nos frutos de *B* foi superior ao MT e aos demais mutantes.

Embora a cutícula de *B* e *r* tenham se mostrado mais espessas, esta característica não reduziu a perda de massa dos frutos ao longo do armazenamento, sendo que *Del* foi o mutante onde a perda de massa foi menos expressiva (Figura 3B). Este resultado é contra intuitivo, uma vez que a relação superfície volume destes frutos é maior que a dos demais genótipos, pelo fato dos frutos serem menores, logo era de se esperar que exibisse maior perda de água

para o ambiente. Considerando o grande conteúdo de água em frutos de tomateiro, a perda de massa dos frutos ao longo do armazenamento é geralmente associada à transpiração (Prudent *et al.*, 2009). Apesar da reconhecida contribuição da cutícula como barreira à perda de água em plantas, sua relação com a perda de água em frutos é complexa e precisa ser melhor investigada (Yeats *et al.*, 2012).

Figura 3. Espessura da cutícula e perda de massa dos frutos de tomateiro. Valores médios de espessura da cutícula dos frutos nos estádios verde-maduro e vermelho-maduro (A). Perda de massa dos frutos ao longo do armazenamento (B). Visão anatômica da cutícula dos frutos que diferiram de Micro Tom nos dois estádios de maturação (C). Barra de escala = 50 μm. Barras verticais indicam erro padrão (n=5 na espessura da cutícula e n=8 na perda de massa). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais ou sem letras indicam ausência de diferença significativa no estádio verde-maduro. Médias seguidas de letras minúsculas iguais ou sem letras indicam ausência de diferença significativa em vermelho-maduro ($P \geq 0,05$). MT: Micro tom, B: *Beta carotene*, t: *tangerine*, r: *yellow flesh*, Del: *Delta carotene*.

Estudos demonstram que, em frutos de tomateiro, a cutícula não está relacionada à redução da perda de água e aumento da vida útil dos frutos na pós-colheita (Bouzo e Gariglio, 2016; Isaacson *et al.*, 2009). Em outras espécies, evidências também reforçam a menor

participação da cutícula na retenção de água em frutos, uma vez que a espessura da cutícula de folhas é geralmente mais fina que a de frutos, e mesmo nestas condições a perda de água pelos frutos é maior (Becker *et al.*, 1986). Ainda, nos mutantes de tomateiro *sitiens*, *notabilis* e *flaca*, o reduzido conteúdo de ácido abscísico torna a cutícula das folhas menos espessa, enquanto a dos frutos é maior. Isto sugere que a regulação da perda de água pela cutícula é mais importante em folhas do que em frutos (Martin *et al.*, 2017). Uma das possíveis causas para a redução da influência da cutícula é a presença da cicatriz peduncular dos frutos, que parece ter mais impacto na perda de água do que a cutícula (Bouzo e Gariglio, 2016).

Coletivamente, nossos resultados sugerem adicionais efeitos pleiotrópicos decorrentes das mutações nos genes envolvidos com a carotenogênese, já que a diferente composição de carotenoides alterou também a espessura da cutícula dos frutos. Embora a perda de massa não tenha sido reduzida em frutos com maior espessura de cutícula, a contribuição desta estrutura ainda envolve a resistência a fatores externos como danos mecânicos e uma barreira a entrada de patógenos (Yeats *et al.*, 2012). Deste modo, como se verá adiante, buscou-se investigar se características associadas as referidas mutações podem alterar a suscetibilidade dos frutos a patógenos após a colheita.

2.3.4. Efeito das mutações na composição de carotenoides e compostos fenólicos totais

O perfil de carotenoides foi acessado para verificar se a introgressão das mutações ocasionou alterações no conteúdo de outros carotenoides e compostos relacionados a defesa. Considerando as diferenças encontradas na espessura da cutícula, os pigmentos foram quantificados na fração da pele e polpa separadamente. A partir da identificação baseada nas características do espectro de cada carotenoide, foram identificados *trans*-licopeno, *cis*-licopeno, prolicopeno, β -caroteno, ζ -caroteno, γ -caroteno, δ -caroteno, luteína, neurosporeno e fitoflueno (Apêndice A, B e E).

Como esperado, as mutações introgrididas no Micro Tom alteraram a composição dos carotenoides nos frutos dos genótipos estudados (Figura 4). O carotenoide majoritário encontrado em MT foi o *trans*-licopeno, tanto na pele quanto polpa dos frutos (Figura 4A). Na maioria dos casos, as mutações reduziram expressivamente o conteúdo de *trans*-licopeno e *cis*-licopeno nos frutos, com exceção do mutante *Del*, que apresentou menor redução (Figura 4A e B). Embora o conteúdo de *cis*-licopeno também tenha sido reduzido no mutante *t*, os

teores de prolicopeno foram elevados. Como esta também é uma forma *cis* de licopeno, denominada tetra-*cis*-licopeno, pode-se inferir que o conteúdo desta isoforma é maior neste mutante (Figura 4C). A principal alteração ocasionada pela introgressão da mutação *tangerine* foi o aumento na variedade de carotenoides presentes nos frutos. Além de prolicopeno, os principais carotenoides encontrados neste mutante foram neurosporeno (Figura 4I), ζ -caroteno (Figura 4E) e fitoflueno (Figura 4J). Em menores quantidades foram encontrados alguns carotenoides cíclicos como β -caroteno (Figura 4D) e γ -caroteno (Figura 4F), embora em menor concentração que em MT.

O carotenoide δ -caroteno, que não esteve presente em MT em nenhuma das frações do fruto, foi encontrado em concentração de $164 \mu\text{g g}^{-1}$ MS na pele e $97,8 \mu\text{g g}^{-1}$ MS na polpa (Figura 4G). Resultados semelhantes foram encontrados por Gentili *et al.* (2015) e Yoo *et al.* (2017), em frutos de tomateiro carregando esta mutação. O acúmulo de carotenoides na configuração *cis* é explicado pela reduzida ação da enzima carotenoide isomerase.

Em condições normais, o licopeno na configuração *cis* é convertido em seu isômero *trans*, o que permite a ação de licopeno-ciclases e consequente ciclização do licopeno. Assim, a perda de função da enzima pode causar o acúmulo de prolicopeno (tetra-*cis*-licopeno) e de precursores acima da via. É importante lembrar que as isoformas de licopeno na configuração *cis* são mais facilmente absorvidas pelo organismo humano, assim, a maior disponibilidade destes carotenoides no mutante *t*, o tornam uma melhor fonte de licopeno quando comparado a tomates vermelhos (Burri *et al.*, 2009).

Após a isomerização do licopeno, enzimas conhecidas como licopeno-ciclases atuam na ciclização da molécula introduzindo ϵ -anéis, no caso da licopeno- ϵ -ciclase, ou β -anéis, no caso da licopeno- β -ciclase (Fraser e Bramley, 2004). Desta forma, o emprego das mutações que aumentam a atividade de licopeno-ciclases, encontradas nos mutantes *B* e *Del*, elevou o conteúdo de β -caroteno e δ -caroteno, respectivamente. (Figura 4D e G). Em comparação ao MT, a concentração de β -caroteno no mutante *B* teve aumento de 13-vezes na pele e 5-vezes na polpa. Neste mutante também foram encontrados traços de prolicopeno (Figura 4C) e fitoflueno (Figura 4J) na pele dos frutos, que não foram encontrados em MT. No mutante *Del*, além de δ -caroteno, os carotenoides neurosporeno e ζ -caroteno também foram superiores ao MT (Figura 4I e E). Ainda, o aumento na atividade da enzima licopeno- ϵ -ciclase aumentou o conteúdo de luteína na pele e polpa dos frutos, uma vez que δ -caroteno é um dos precursores da síntese desta xantofila (Figura 4H).

Figura 4. Conteúdo de carotenoides na pele e polpa dos frutos de tomateiro. Concentração de *trans*-licopeno (A), *cis*-licopeno (B), prolicopeno (C), β-caroteno (D), ζ-caroteno (E), γ-caroteno (F), δ-caroteno (G), luteína (H), neurosporeno (I) e fitoeno (J). Barras verticais indicam erro padrão da média (n=3). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais ou sem letras indicam ausência de diferença significativa na fração da pele. Médias seguidas de letras minúsculas iguais ou sem letras indicam ausência de diferença significativa na fração da polpa ($P \geq 0,05$). MT: Micro Tom, B: *Beta carotene*, t: *tangerine*, r: *yellow flesh*, Del: *Delta carotene*. Dados representados em massa seca (MS).

O mutante *r* não acumulou carotenoides na pele dos frutos até o final do armazenamento, apenas teores reduzidos de β -caroteno ($9,18 \mu\text{g g}^{-1}$ MS) na fração da polpa (Figura 4D). No início da formação de pigmentos em frutos, a reação catalisada pela enzima fitoeno sintase envolve a condensação de duas moléculas de geranilgeranil pirofosfato e consequente formação de fitoeno, o primeiro carotenoide formado na carotenogênese. Deste modo, a perda de função desta enzima no mutante *r* impede o acúmulo de carotenoides formados abaixo da via (Liu *et al.*, 2003).

Além dos carotenoides, os compostos fenólicos são outros metabólitos encontrados no tomate e influenciam a qualidade nutricional dos frutos, principalmente por sua reconhecida atuação no sequestro de radicais livres (Elbadrawy e Sello, 2016). A quantificação de compostos fenólicos totais também foi acessada, com o objetivo de verificar possíveis interações entre os carotenoides e esta classe de metabólitos secundários. Na porção da pele dos frutos não foram encontradas diferenças significativas entre os mutantes e o MT (Figura 5). Ao contrário dos carotenoides, a maior concentração destes compostos foi encontrada na polpa dos frutos, exceto para os mutantes *t* e *Del*, que apresentaram teores reduzidos de compostos fenólicos na polpa em relação ao MT e aos demais mutantes (Figura 5).

Figura 5. Conteúdo de compostos fenólicos totais na pele e polpa dos frutos de tomateiro. Barras verticais indicam erro padrão da média ($n=3$). Médias sem letras na fração da pele indicam ausência de diferença significativa. Médias seguidas de letras iguais na fração da polpa indicam ausência de diferença significativa ($P \geq 0,05$). MT: *Micro tom*, B: *Beta carotene*, t: *tangerine*, r: *yellow flesh*, Del: *Delta carotene*. Dados representados em massa seca (MS).

Há escassez de informações relatando a interação entre carotenoides e compostos fenólicos em frutos. Alguns autores observaram aumento no teor de compostos fenólicos em frutos com baixo conteúdo de carotenoides (Georgé *et al.*, 2011; Minoggio *et al.*, 2003). No presente trabalho, nenhum genótipo exibiu maior conteúdo de fenólicos que MT, nem mesmo *r*, que exibiu reduzidos níveis de carotenoides. Cichon, Riedl e Schwartz (2017) também reportaram valores reduzidos de compostos fenólicos em suco de tomate do mutante *tangerine* em relação ao tomate vermelho. No entanto, estes autores não puderam confirmar se estas diferenças estavam associadas apenas à variedade, ou se foram influenciadas pelo estágio de maturação na colheita e manuseio pós-colheita. Aqui nós utilizamos linhagens quase isogênicas contendo o mesmo *background* genético e estágio de maturação dos frutos no momento da colheita. Deste modo, excluindo-se o efeito de *background*, podemos concluir que o reduzido teor de compostos fenólicos nos frutos é decorrente da mutação *tangerine*.

A quantificação de compostos fenólicos realizada nesta pesquisa, bem como dados reportados na literatura revelam possíveis interações entre estes compostos e os carotenoides. Desse modo, são necessários estudos mais aprofundados para entender melhor a relação entre estas duas classes de metabólitos secundários. Em relação aos carotenoides, os resultados encontrados neste trabalho reforçam os dados encontrados por outros autores utilizando as mesmas mutações encontradas em *B* (Ronen *et al.*, 2000), *t* (Gentili *et al.*, 2015), *r* (Liu *et al.*, 2003), e *Del* (Ronen *et al.*, 1999). A modificação na composição de carotenoides nestas linhagens confirma a participação das enzimas da carotenogênese e o efeito da manipulação de sua atividade, que pode ser um mecanismo para obtenção de frutos com diferente qualidade nutricional.

2.3.5. Frutos de tomateiro com maior conteúdo e variedade de carotenoides possuem maior atividade antioxidante

Para tentar isolar a contribuição dos carotenoides e compostos fenólicos, a análise da capacidade antioxidante foi realizada em um extrato lipofílico e hidrofílico, respectivamente (Figura 6). No extrato lipofílico, os genótipos com maior capacidade antioxidante foram MT, *t* e *Del*, tanto na fração da pele quanto da polpa. Os mutantes *B* e *r* exibiram menor capacidade antioxidante, com respectivas reduções de 25,5% e 38,4% em relação ao MT na fração da pele, e 41,6% e 57,3% na polpa. A ausência de carotenoides ocasionada pela mutação *yellow flesh* foi responsável pelo reduzido sequestro de radicais em *r*. No entanto, o

acúmulo de β -caroteno em *B* não foi capaz de conservar sua capacidade antioxidante (Figura 6A).

Figura 6. Capacidade antioxidante nas frações da pele e polpa dos frutos de tomateiro. Capacidade antioxidante do extrato lipofílico (A) e hidrofílico (B). Barras verticais indicam erro padrão da média (n=3). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais ou sem letras indicam ausência de diferença estatística na fração da pele. Médias seguidas de letras minúsculas iguais ou sem letras indicam ausência de diferença estatística na fração da polpa ($P \leq 0,05$). MT: Micro Tom, B: *Beta carotene*, t: *tangerine*, r: *yellow flesh*, Del: *Delta carotene*. Dados representados em massa seca (MS).

No extrato lipofílico, a capacidade antioxidante do tomate é relacionada principalmente aos carotenoides e a vitamina E. Ao contrário, no extrato hidrofílico é representada pelos compostos fenólicos e a vitamina C. A participação dos compostos fenólicos nas propriedades nutricionais do tomate é conhecida, já que estes metabólitos são os principais responsáveis pela capacidade antioxidante total dos frutos (Kotíková *et al.*, 2011). Os resultados encontrados nesta pesquisa também demonstram expressiva participação dos compostos fenólicos, sendo que o sequestro do radical ABTS foi elevado no extrato hidrofílico (Figura 6B). Uma vez que o acúmulo de diferentes carotenoides alterou o teor de compostos fenólicos totais dos frutos, a capacidade antioxidante do extrato hidrofílico também revelou diferença entre os genótipos. Na fração da pele, o MT apresentou os menores valores enquanto que, na porção da polpa, o mutante *B* foi a linhagem onde o extrato hidrofílico exibiu menor capacidade de sequestro de radicais. Ainda na polpa, o mutante *r* foi a linhagem com maior capacidade antioxidante hidrofílica (Figura 6B). Esta característica pode ser explicada principalmente pela participação dos compostos fenólicos, mas também

pela presença do ácido ascórbico, encontrado em maior quantidade neste genótipo (Figura 2D). Embora não diferindo significativamente de MT, a capacidade antioxidante dos genótipos *t* e *Del* foi inferior à *r* na polpa. Nestes genótipos o teor de compostos fenólicos também havia sido reduzido.

Para compreender melhor o impacto dos diferentes carotenoides na capacidade antioxidante dos genótipos nós procedemos uma análise de componentes principais utilizando a concentração de cada carotenoide, de compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante dos extratos em ambas as frações dos frutos (Figura 7). Os genótipos com maior capacidade antioxidante lipofílica, MT, *t* e *Del*, foram separados dos genótipos de menor capacidade antioxidante pelo segundo componente, tanto na pele (Figura 7A) quanto na polpa dos frutos (Figura 7B). A maior quantidade e variedade de carotenoides encontradas em MT, *t* e *Del*, provavelmente são responsáveis pela elevada capacidade antioxidante destes genótipos, uma vez que a maioria dos pigmentos seguiu a mesma separação pelo segundo componente principal. O acúmulo de β -caroteno não favoreceu a capacidade antioxidante nos frutos de *B*, sendo que este mutante esteve mais relacionado a *r*, onde há ausência da maioria dos carotenoides (Figura 7A e 7B).

Embora possua o mesmo número de ligações duplas-conjugadas que o licopeno, a ciclização da molécula de β -caroteno, reduz sua capacidade de sequestro de radicais (Shi *et al.*, 2004). O potencial antioxidante do licopeno é aproximadamente duas vezes maior que isômeros contendo β -anéis, principalmente por sua cadeia aberta (Bohm *et al.*, 2002). Assim, mesmo com o elevado teor de β -caroteno, a severa redução no conteúdo de licopeno diminui a capacidade antioxidante dos frutos do mutante *B*. Como demonstrado anteriormente, o conteúdo de *trans*-licopeno foi muito superior em MT, no entanto *t* e *Del* também acumularam licopeno na isomeria *cis*, que possui atividade antioxidante tão elevada quanto a configuração *trans* (Müller, Fröhlich e Böhm, 2011). Além disso, nestes mutantes também foram encontrados outros carotenoides como β -caroteno, ζ -caroteno, δ -caroteno, γ -caroteno, luteína e neurosporeno. Conforme relatado por Shi, Kakuda e Yeung (2004), a mistura de licopeno com outros carotenoides aumenta a eficiência no sequestro de radicais se comparada a atuação isolada dos pigmentos. Neste estudo acreditamos que a maior variedade de carotenoides encontrada em *t* e *Del*, associado as isoformas de licopeno, podem ter agido sinergicamente de modo a aumentar a capacidade antioxidante dos frutos.

Figura 7. Análise de componentes principais com dados da concentração de carotenoides, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante hidrofílica e lipofílica na pele (A) e polpa (B) dos frutos de Micro tom (MT) e dos mutantes *Beta carotene*, *tangerine*, *yellow flesh* e *Delta carotene*.

2.4. CONCLUSÃO

A introgressão de mutações que alteram a atividade de enzimas relacionadas a carotenogênese impacta não apenas o conteúdo de carotenoides, mas promove efeitos

pleiotrópicos que se refletiram no amadurecimento, parâmetros de qualidade e na propriedade nutricional dos frutos.

O climatério respiratório e a síntese de etileno antecipada no mutante *yellow flesh*, acelera a alteração da cor dos frutos.

Por outro lado, nos frutos do mutante *tangerine*, o retardo na modificação da cor dos frutos teve relação com a mutação que causa não funcionalidade da enzima carotenoide isomerase, a qual depende da sinalização luminosa.

A alteração na via dos carotenoides afeta a deposição de cutícula nos mutantes *yellow flesh* e *Beta carotene*. Entretanto, isto não altera a taxa de perda de massa dos frutos durante o armazenamento.

Apesar da ausência de carotenoides em *yellow flesh*, este exibe o maior conteúdo de ácido ascórbico e conserva elevado teor de compostos fenólicos

A maior atividade antioxidante lipofílica encontrada em Micro Tom, *tangerine* e *Delta carotene*, decorre da maior abundância de isoformas de licopeno e da maior variedade de carotenoides.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, L.; GRIERSON, D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 377, p. 2039–2055, 1 out. 2002.
- BECKER, M. *et al.* Water permeability of plant cuticles: permeance, diffusion and partition coefficients. **Trees**, v. 1, p. 54–60, 1986.
- BERTIN, N.; GÉNARD, M. Tomato quality as influenced by preharvest factors. **Scientia Horticulturae**, v. 233, p. 264–276, 15 mar. 2018.
- BIAN, W. *et al.* Metabolic and Molecular Events Occurring during Chromoplast Biogenesis. **Journal of Botany**, v. 2011, p. 1–13, 15 set. 2011.
- BÖHM, F.; EDGE, R.; TRUSCOTT, T. G. Interactions of dietary carotenoids with singlet oxygen (1O_2) and free radicals: potential effects for human health. **Acta biochimica Polonica**, v. 59, n. 1, p. 27–30, 2012.
- BOHM, V. *et al.* Trolox equivalent antioxidant capacity of different isomers of a-carotene, b-carotene, lycopene, and zeaxanthin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 221–226, 2002.
- BOUZO, C.; GARIGLIO, N. Relationship between different physical properties of tomato fruits and water loss during postharvest. **Acta scientiarum Polonorum. Hortorum cultus = Ogrodnictwo**, v. 15, n. May, p. 13–25, 2016.
- BRUMMELL, D. A. Brummell — Cell wall metabolism during fruit ripening PRIMARY CELL WALL METABOLISM DURING FRUIT RIPENING*. **New Zealand Journal of Forestry Science**, v. 36, n. 1, p. 99–111, 2006.
- BURKE, M. *et al.* Characterisation of carotenoid radical cations in liposomal environments: interaction with vitamin C. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 60, n. 1, p. 1–6, abr. 2001.

- BURRI, B. J. *et al.* Tangerine tomatoes increase total and tetra-cis-lycopene isomer concentrations more than red tomatoes in healthy adult humans. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, n. SUPPL. 1, p. 1–16, 2009.
- CAMPOS, M. L. *et al.* Small and remarkable: The Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions. **Plant signaling & behavior**, v. 5, n. 3, p. 267–70, mar. 2010.
- CARVALHO, R. F. *et al.* Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: “Micro-Tom” as an effective toolkit for plant development research. **Plant methods**, v. 7, n. 1, p. 18, 29 jun. 2011.
- CICHON, M. J.; RIEDL, K. M.; SCHWARTZ, S. J. A metabolomic evaluation of the phytochemical composition of tomato juices being used in human clinical trials. **Food Chemistry**, v. 228, n. October, p. 270–278, 2017.
- CLUTTER, M. E.; MILLER, E. V. Ascorbic acid content and time of ripening of tomatoes. **Economic Botany**, v. 15, n. 3, p. 218–222, jul. 1961.
- CORTÉS, C. *et al.* Identification and Quantification of Carotenoids Including Geometrical Isomers in Fruit and Vegetable Juices by Liquid Chromatography with Ultraviolet–Diode Array Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2203–2212, 21 abr. 2004.
- CRUZ, A. B. Interação entre luz, etileno e auxinas durante o amadurecimento e carotenogênese em frutos de tomateiro Light, ethylene and auxin crosstalk during tomato fruit ripening and carotenogenesis. 2017.
- ELBADRAWY, E.; SELLO, A. Evaluation of nutritional value and antioxidant activity of tomato peel extracts. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, p. S1010–S1018, 1 nov. 2016.
- EMMANUEL, E.; LEVY, A. A. Tomato mutants as tools for functional genomics. **Current opinion in plant biology**, v. 5, n. 2, p. 112–7, abr. 2002.
- FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 3, p. 228–265, 2004.
- FRASER, P. D.; BRAMLEY, P.; SEYMOUR, G. B. Effect of the Cnr mutation on carotenoid formation during tomato fruit ripening. **Phytochemistry**, v. 58, n. 1, p. 75–9, set. 2001.
- FRAY, R. G.; GRIERSON, D. Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and co-suppression. **Plant molecular biology**, v. 22, n. 4, p. 589–602, jul. 1993.
- FRUSCIANTE, L. *et al.* Antioxidant nutritional quality of tomato. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, n. 5, p. 609–617, 1 maio 2007.
- FUJISAWA, M. *et al.* A Large-Scale Identification of Direct Targets of the Tomato MADS Box Transcription Factor RIPENING INHIBITOR Reveals the Regulation of Fruit Ripening. **The Plant Cell**, v. 25, n. 2, p. 371–386, 1 fev. 2013.
- GENTILI, A. *et al.* Screening of carotenoids in tomato fruits by using liquid chromatography with diode array-linear ion trap mass spectrometry detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 33, p. 7428–7439, 2015.
- GEORGÉ, S. *et al.* Changes in the contents of carotenoids, phenolic compounds and vitamin C during technical processing and lyophilisation of red and yellow tomatoes. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1603–1611, 2011.

- GIMÉNEZ, E. *et al.* Functional analysis of the Arlequin mutant corroborates the essential role of the ARLEQUIN/TAGL1 gene during reproductive development of tomato. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, 2010.
- GIMÉNEZ, E. *et al.* Transcriptional Activity of the MADS Box *ARLEQUIN / TOMATO AGAMOUS-LIKE1* Gene Is Required for Cuticle Development of Tomato Fruit. **Plant Physiology**, v. 168, n. 3, p. 1036–1048, 2015.
- GIOVANNONI, J. J. Genetic regulation of fruit development and ripening. **The Plant cell**, v. 16 Suppl, n. Suppl, p. S170-80, 2004.
- GRIERSON, D. Ethylene and the Control of Fruit Ripening. **The Molecular Biology and Biochemistry of Fruit Ripening**, p. 43–73, 2013.
- GUPTA, P.; SREELAKSHMI, Y.; SHARMA, R. A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography. **Plant Methods**, v. 11, n. 1, p. 5, 2015.
- HERNÁNDEZ-BAUTISTA, A. *et al.* Fruit size QTLs affect in a major proportion the yield in tomato. **Chilean journal of agricultural research**, v. 75, n. 4, p. 402–409, 2015.
- ISAACSON, T. *et al.* Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta-carotene and xanthophylls in plants. **The Plant cell**, v. 14, n. 2, p. 333–42, fev. 2002.
- ISAACSON, T. *et al.* Cutin deficiency in the tomato fruit cuticle consistently affects resistance to microbial infection and biomechanical properties, but not transpirational water loss. **The Plant Journal**, v. 60, p. 363–377, 2009.
- JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principles and practice / by William A. Jensen. - Version details - Trove**. San Francisco: W.H. Freeman & Co., 1962.
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137–138, 1965.
- KIMBARA, J. *et al.* Inhibition of cutin deficient 2 causes defects in cuticle function and structure and metabolite changes in tomato fruit. **Plant and Cell Physiology**, v. 54, n. 9, p. 1535–1548, 2013.
- KLEE, H. J.; GIOVANNONI, J. J. Genetics and Control of Tomato Fruit Ripening and Quality Attributes. **Annual Review of Genetics**, v. 45, n. 1, p. 41–59, 15 dez. 2011.
- KOTÍKOVÁ, Z. *et al.* Determination of antioxidant activity and antioxidant content in tomato varieties and evaluation of mutual interactions between antioxidants. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 8, p. 1703–1710, 1 out. 2011.
- LIU, Y.-S. *et al.* There is more to tomato fruit colour than candidate carotenoid genes. **Plant Biotechnology Journal**, v. 1, n. 3, p. 195–207, 25 abr. 2003.
- LÓPEZ CAMELO, A. F.; GÓMEZ, P. A. Comparison of color indexes for tomato ripening. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 534–537, set. 2004.
- MARTIN, L. B. B. *et al.* Cuticle Biosynthesis in Tomato Leaves Is Developmentally Regulated by Abscissic Acid. **Plant Physiology**, v. 174, n. 3, p. 1384–1398, 2017.
- MATTEO, A. DI *et al.* The ascorbic acid content of tomato fruits is associated with the expression of genes involved in pectin degradation. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 1, p. 163, 6 ago. 2010.
- MINOGGIO, M. *et al.* Polyphenol pattern and antioxidant activity of different tomato lines and cultivars. **Annals of nutrition & metabolism**, v. 47, n. 2, p. 64–9, 2003.

- MORTENSEN, A.; SKIBSTED, L. H.; TRUSCOTT, T. G. The Interaction of Dietary Carotenoids with Radical Species. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, n. 1, p. 13–19, 1 jan. 2001.
- MÜLLER, L.; FRÖHLICH, K.; BÖHM, V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxyl radical scavenging assay. **Food Chemistry**, v. 129, n. 1, p. 139–148, 2011.
- PANDURANGAIAH, S. *et al.* Differential expression of carotenoid biosynthetic pathway genes in two contrasting tomato genotypes for lycopene content. **Journal of biosciences**, v. 41, n. 2, p. 257–64, jun. 2016.
- PRUDENT, M. *et al.* Genetic and physiological analysis of tomato fruit weight and composition: influence of carbon availability on QTL detection. **Journal of experimental botany**, v. 60, n. 3, p. 923–37, 2009.
- RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology & medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–7, maio 1999.
- RIGANO, M. M. *et al.* Pectic enzymes as potential enhancers of ascorbic acid production through the D-galacturonate pathway in Solanaceae. **Plant Science**, v. 266, p. 55–63, 1 jan. 2018.
- RONEN, G. *et al.* Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 17, n. 4, p. 341–51, fev. 1999.
- RONEN, G. *et al.* An alternative pathway to beta -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 20, p. 11102–11107, 26 set. 2000.
- SALADIÉ, M. *et al.* A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. **Plant physiology**, v. 144, n. 2, p. 1012–28, jun. 2007.
- SÉRINO, S. *et al.* HPLC Assay of Tomato Carotenoids: Validation of a Rapid Microextraction Technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 8753–8760, 14 out. 2009.
- SESTARI, I. *et al.* Near-isogenic lines enhancing ascorbic acid, anthocyanin and carotenoid content in tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) as a tool to produce nutrient-rich fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 175, p. 111–120, 15 ago. 2014.
- SHI, J. *et al.* Stability and Synergistic Effect of Antioxidative Properties of Lycopene and Other Active Components. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 559–573, 2004.
- STORY, E. N. *et al.* An update on the health effects of tomato lycopene. **Annual review of food science and technology**, v. 1, p. 189–210, 2010.
- SU, L. *et al.* Carotenoid accumulation during tomato fruit ripening is modulated by the auxin-ethylene balance. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2015.
- TARCÍSIO, P.; VECCHIA, D.; KOCH, P. S. Tomates longa vida: O que são, como foram desenvolvidos? v. 18, n. 1, 2000.
- THOMPSON *et al.* Molecular and genetic characterization of a novel pleiotropic tomato-ripening mutant. **Plant physiology**, v. 120, n. 2, p. 383–90, jun. 1999.
- TIEMAN, D. *et al.* Report The Chemical Interactions Underlying Tomato Flavor Preferences. **Current Biology**, v. 22, p. 1035–1039, 2012.

- VREBALOV, J. *et al.* A MADS-Box Gene Necessary for Fruit Ripening at the Tomato Ripening-Inhibitor (Rin) Locus. **Science**, v. 296, n. 5566, p. 343–346, 12 abr. 2002.
- WISUTIAMONKUL, A. *et al.* Carotenoid accumulation in durian (*Durio zibethinus*) fruit is affected by ethylene via modulation of carotenoid pathway gene expression. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 115, p. 308–319, 2017.
- YAHIA, E. M.; CONTRERAS-PADILLA, M.; GONZALEZ-AGUILAR, G. Ascorbic Acid Content in Relation to Ascorbic Acid Oxidase Activity and Polyamine Content in Tomato and Bell Pepper Fruits During Development, Maturation and Senescence. **LWT- Food Science and Technology**, v. 34, n. 7, p. 452–457, 2001.
- YEATS, T. H. *et al.* The fruit cuticles of wild tomato species exhibit architectural and chemical diversity, providing a new model for studying the evolution of cuticle function. **Plant Journal**, v. 69, n. 4, p. 655–666, 2012.
- YOO, H. J. *et al.* Inferring the genetic determinants of fruit colors in tomato by carotenoid profiling. **Molecules**, v. 22, n. 5, p. 1–14, 2017.

3. A COMPOSIÇÃO DE CAROTENOIDES INFLUENCIA A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E A SUSCETIBILIDADE DE FRUTOS DE TOMATEIRO AO FUNGO *Botrytis cinerea*

RESUMO

Carotenoides são metabólitos secundários encontrados em altas concentrações em frutos de tomate e reconhecidos por sua capacidade antioxidante. Embora já tenha se constatado a participação de outras classes de pigmentos na redução da suscetibilidade do tomate ao fungo necrotrófico *Botrytis cinerea*, a contribuição dos carotenoides ainda foi pouco explorada. O objetivo deste trabalho foi verificar a participação de diferentes carotenoides na regulação da suscetibilidade de frutos de tomate ao fungo *B. cinerea*. Para isso, foram utilizadas linhagens quase isogênicas de tomateiro carregando os alelos *B*, *t*, *r* e *Del*, os quais afetam a composição de carotenoides. Frutos nos estádios verde e maduro foram inoculados por meio da introdução da suspensão de esporos diretamente na polpa ou por aspersão sobre frutos intactos e a evolução da doença e síntese de etileno foram acompanhadas durante cinco dias após a inoculação. A composição de carotenoides influenciou a suscetibilidade dos frutos no estágio vermelho-maduro. No entanto, embora o acúmulo de pigmentos seja resultado do amadurecimento e atividade do etileno, os frutos maduros foram mais suscetíveis ao fungo. Ainda, a síntese de etileno foi estimulada pelo patógeno, principalmente em frutos verdes, provavelmente em uma tentativa de tornar os frutos mais suscetíveis. A linhagem *tangerine* (*t*), foi menos suscetível ao patógeno independentemente da forma de inoculação. A partir do terceiro dia após a inoculação na polpa, a evolução da doença no mutante *Delta carotene* (*Del*) se mostrou mais lenta, sendo este mutante menos suscetível no último dia de avaliação, juntamente com o *t*. Ao final do período avaliado os mutantes mais suscetíveis ao patógeno foram *Beta carotene* (*B*) e *yellow flesh* (*r*). Estes genótipos também apresentaram expressivas reduções no conteúdo de licopeno dos frutos. Apesar do conteúdo de licopeno em *t* e *Del* ter sido inferior ao encontrado no controle (cv. Micro Tom), a variedade de carotenoides encontrados nestes mutantes foi maior que a presente em MT. Esta característica aumentou a capacidade antioxidante destes mutantes e mostrou-se como o principal efeito que reduziu a suscetibilidade dos frutos, uma vez que a produção de espécies reativas de oxigênio também foi induzida após a inoculação e a produção de superóxido foi menos intensa em frutos vermelhos do MT, *t* e *Del*. Assim, o conjunto de dados obtidos sugere que a maior variedade de isômeros de carotenóides presente em *t* e *Del* reduz a explosão oxidativa desencadeada pelo patógeno, em razão da maior capacidade antioxidante do tecido, retardando a progressão e o desenvolvimento do *Botrytis*.

Palavras-chave: Micro Tom; Linhagens quase isogênicas; *Solanum lycopersicum*; Etileno

ABSTRACT

Carotenoids are secondary metabolites found in high concentrations in tomato fruits and are recognized for their antioxidant capacity. Although the presence of other pigment classes in the reduction of tomato susceptibility to the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* has already been observed, the contribution of carotenoids has not been explored. The objective of this work was to verify the participation of different carotenoids in the susceptibility regulation of tomato fruits to *B. cinerea*. For this, Micro Tom (MT) near-isogenic lines harboring the alleles *B*, *t*, *r* and *Del*, which affect the composition of carotenoids, were used. Fruits in mature green and red ripe stages were inoculated by introducing the spore suspension directly into the flesh or by spraying on intact fruits and the evolution of the disease and ethylene synthesis were monitored for five days after inoculation. The composition of carotenoids influenced the fruit susceptibility in the red ripe stage. However, although the accumulation of pigments is a result of ripening and ethylene activity, the mature fruits were more susceptible to the fungus. Furthermore, ethylene synthesis was stimulated by the pathogen, especially in green fruits, probably in an attempt to make the fruits more susceptible. The *tangerine* (*t*) mutant was less susceptible to the pathogen regardless of the form of inoculation. From the third day after inoculation, the disease evolution in the mutant *Delta carotene* (*Del*) was slowed and this mutant was less susceptible at the last evaluation day, similarly to *t*. At the end of the evaluated period the mutants most susceptible to the pathogen were *Beta carotene* (*B*) and *yellow flesh* (*r*). These genotypes also showed significant reductions in the lycopene content of the fruits. Although the content of lycopene in *t* and *Del* was lower than that found in the control (Micro Tom), the variety of carotenoids found in these mutants was higher than that present in MT. This characteristic increased the antioxidant capacity of these mutants and was shown to be the main effect that reduced fruit susceptibility, since the production of reactive oxygen species was also induced after inoculation and the production of superoxide was less intense in MT, *t* and *Del* red fruits. Thus, the data obtained suggests that the greater variety of carotenoid isomers present in *t* and *Del* reduces the oxidative burst triggered by the pathogen, due to the higher antioxidant capacity of the tissue, delaying the progression and development of *Botrytis cinerea*.

Keywords: Micro Tom; Near isogenic lines; *Solanum lycopersicum*; Ethylene

3.1. INTRODUÇÃO

A incidência de fungos patogênicos pode desencadear perdas quantitativas e qualitativas, antes e após a colheita de frutos do tomateiro, devido a degradação dos tecidos que impossibilitam sua comercialização e consumo (Alkan e Fortes, 2015). Dentre os patógenos de maior importância para a cultura do tomateiro está o fungo necrotrófico *Botrytis cinerea*, causador da podridão cinzenta. Este patógeno pode penetrar os tecidos em estádios

iniciais de desenvolvimento do fruto e permanecer quiescente nos tecidos até encontrar as condições ideais para seu desenvolvimento (Zhao *et al.*, 2008). Com o avanço do amadurecimento, os frutos tornam-se mais suscetíveis à ação de fungos necrotróficos devido à eventos resultantes deste processo, como a degradação da parede celular, amolecimento dos tecidos, alterações na cutícula, aumento no teor de sólidos solúveis, alterações no pH e na atividade de fitohormônios (Alkan e Fortes, 2015). Nem todos os eventos envolvidos com o amadurecimento tornam os frutos mais suscetíveis (Cantu *et al.*, 2009). No entanto, os sinais que impulsionam a liberação do estado quiescente do fungo a sua forma latente, provavelmente são resultados de parte destes eventos (Alkan e Fortes, 2015). Dentre eles a degradação dos componentes da parede celular e alterações na cutícula, já mostraram estar envolvidos com a modulação da suscetibilidade à fungos necrotróficos (Blanco-Ulate *et al.*, 2014; Mengiste, 2012). Além disso, o próprio fungo pode secretar enzimas que degradam os componentes parede celular e da cutícula dos frutos, permitindo sua entrada (Kan, van *et al.*, 1997; Kars *et al.*, 2005; Verhoeff e Warren, 1972).

Os eventos que culminam com a suscetibilidade dos frutos são regulados por complexas relações entre fitohormônios, sendo que a interação entre o tomate e o fungo *B. cinerea* causa a reprogramação transcricional de muitos destes hormônios, levando a maior resistência ou suscetibilidade dos frutos (Blanco-Ulate *et al.*, 2013). O hormônio gasoso etileno é conhecido por sua relação com o amadurecimento dos frutos e está envolvido com respostas de resistência a patógenos por sua interação com o ácido jasmônico (Blanco-Ulate *et al.*, 2013; Glazebrook, 2005). Por outro lado, o etileno também pode impulsionar a suscetibilidade dos frutos ao promover o amadurecimento (Blanco-Ulate *et al.*, 2013; Grierson, 2013) e por sua participação na germinação dos esporos (Kepczynska, 1989).

Após a entrada do patógeno, a colonização dos tecidos ativa diversas respostas pelos frutos, dentre elas a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Resende, Salgado e Chaves, 2003). A indução de EROs pode progredir para um estado de rápida produção, denominado explosão oxidativa. Além de ter um efeito antimicrobiano direto, a explosão oxidativa pode servir de sinal para a indução da resposta de hipersensibilidade, caracterizada como um evento de maior amplitude que pode induzir a morte programada dos tecidos e interromper o fornecimento de nutrientes para o patógeno (Glazebrook, 2005). Este mecanismo pode ser eficiente contra fungos biotróficos, no entanto, por seu modo de vida necrotrófico, o desenvolvimento de *B. cinerea* é impulsionado com a morte dos tecidos (Kan, van, 2006). A importância de EROs no estabelecimento da podridão cinzenta em tomate já foi documentada. Bassolino *et al.* (2013),

Zhang *et al.* (2013) e Zhang *et al.* (2015) atribuíram a maior resistência de frutos contendo alto acúmulo de antocianinas em razão da maior atividade antioxidante presente nos frutos, o que retardou a ação de EROS e, conseqüentemente, a progressão da doença. Em plantas, um mecanismo semelhante foi observado por Polturak *et al.* (2017), onde o acúmulo de betalaínas em plantas transformadas de tabaco reduziu a incidência da podridão cinzenta causada por *B. cinerea*, devido à elevada atividade antioxidante conferida por esta classe de pigmentos.

Em frutos do tomateiro, os pigmentos encontrados em maior abundância são os carotenoides. O acúmulo destes pigmentos é também um dos eventos desencadeados com o amadurecimento e uma das respostas associadas a ação do etileno (Alexander e Grierson, 2002; Giovannoni, 2004). A presença de cadeias duplas conjugadas conferem a estas moléculas a capacidade de atuarem como antioxidantes, por permitirem a transferência de elétrons e sequestro de radicais através da deslocalização eletrônica (Hammond e Renzi, 2013; Han, Zhang e Skibsted, 2012). Em razão de suas propriedades antioxidantes e de sua habilidade em promover o *quenching* fotoquímico, os carotenoides estão associados a componentes fotossintéticos e podem atuar na sua proteção (Ramel *et al.*, 2012). Além disso, a propriedade antioxidante dos carotenoides é um dos motivos pelo qual a inclusão de tomate na dieta é recomendada (Cheng *et al.*, 2017). Apesar da reconhecida capacidade antioxidante dos carotenoides e dos relatos sobre a atuação de outros pigmentos na atenuação da explosão oxidativa e redução da suscetibilidade de frutos ao *Botrytis*, a atuação de carotenoides neste aspecto ainda não foi explorada.

Diferentes mutações na via biossintética de carotenoides foram isoladas de frutos de tomate. A mutação recessiva denominada *yellow flesh* (*r*) afeta o ponto mais crítico da via, impedindo a formação de carotenoides devido a codificação de uma fitoeno sintase (PSY) não funcional (Fray e Grierson, 1993). Na mutação *tangerine* (*t*), a expressão do gene *CRTISO*, que codifica uma carotenoide isomerase, é prejudicada. Assim, os frutos apresentam elevado conteúdo de prolicopeno quando maduros (Isaacson *et al.*, 2002). A composição de carotenoides também é alterada no mutante *Beta carotene* (*B*). A presença desta mutação causa aumento na atividade de uma licopeno- β -ciclase específica do cromoplasto, que converte quase todo o licopeno em β -caroteno (Ronen *et al.*, 2000). De modo semelhante, no mutante *Delta carotene* (*Del*) a excessiva produção de δ -caroteno ao custo de licopeno ocorre devido ao aumento na atividade de uma licopeno- δ -ciclase do cromoplasto (Ronen *et al.*, 1999; Yoo *et al.*, 2017).

O emprego destes mutantes para compreender a função dos diferentes genes relacionados a carotenogênese e sua relação com a suscetibilidade de frutos a patógenos,

como o *Botrytis*, constitui uma abordagem elegante para tratar de tal assunto. No entanto, somente a utilização de mutações não permite concluir sua função específica, uma vez que o fenótipo observado pode ser resultado da atuação de outros genes. Neste sentido, o uso de linhagens quase isogênicas introgrididas em um único modelo de estudo pode ser mais eficiente em isolar o efeito de mutações específicas, uma vez que as isolinhas compartilham do mesmo *background* genético, com diferença apenas na mutação introgridida. Assim, o fenótipo observado pode ser associado apenas à mutação em questão (Carvalho *et al.*, 2011). Um interessante modelo de estudo de frutos carnosos é o tomateiro (Emmanuel e Levy, 2002). Além de ser o modelo favorito para estudos relacionados à carotenogênese, devido à acentuada presença de carotenoides (Liu *et al.*, 2003), o tomate e sua interação com *B. cinerea* é considerado um modelo adequado para estudos fitopatológicos (Cantu *et al.*, 2008; Powell *et al.*, 2000).

Em resumo, embora existam estudos relacionando a presença de outros pigmentos à redução da suscetibilidade a patógenos, não existem estudos sobre o real efeito dos pigmentos carotenoides acumulados na polpa dos frutos e sua interação com organismos patogênicos causadores de perdas na pós-colheita. A falta de pesquisas sobre o assunto compromete o entendimento sobre o papel dos carotenóides na defesa vegetal. Assim, considerando todos estes aspectos, o objetivo deste trabalho foi utilizar linhagens quase isogênicas de tomateiro carregando mutações que alteram o conteúdo e a composição de carotenoide nos frutos, de modo a determinar se estes pigmentos afetam a suscetibilidade dos frutos ao fungo *B. cinerea*.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Material vegetal e condições de cultivo

As linhagens quase isogênicas de tomate *Solanum lycopersicum* L. cv. Micro Tom foram obtidas da coleção de mutantes do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal (HCPD-LAB), Universidade de São Paulo, Brasil. As isolinhas utilizadas neste estudo foram *Beta carotene* (*B*), *tangerine* (*t*), *yellow flesh* (*r*) e *Delta carotene* (*Del*). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação com temperatura média de 28 ° C, fotoperíodo de 11,5 h/13 h (inverno/verão) e radiação fotossinteticamente ativa de 250-350 $\mu\text{mol s}^{-1}$. O substrato de plantio consistiu de mistura de substrato

comercial (Plantmax HT, Eucatex, São Paulo, Brasil) e vermiculita expandida (proporção 1:1). A suplementação nutricional foi realizada no momento da semeadura, incorporando ao substrato NPK 10:10:10 e 4 g L⁻¹ de calcário dolomita (MgCO₃ + CaCO₃). A adubação foliar foi realizada semanalmente a partir da antese (~35 dias após a semeadura), com 1 g L⁻¹ de fertilizante de Peters 20-20-20 (NPK). Análises de suscetibilidade à *B. cinerea* foram conduzidas em frutos colhidos nos estádios de maturação verde-maduro, definido como o máximo diâmetro dos frutos e coloração verde da epiderme, bem como no estágio vermelho-maduro do MT, caracterizado pela coloração vermelha da epiderme. Parte dos frutos colhidos em cada estágio tiveram a porção de casca e polpa cuidadosamente separadas e congeladas em nitrogênio líquido para posteriores análises.

3.2.2. Cultura de *B. cinerea* e infecção dos frutos

Uma cultura de *B. cinerea* foi disponibilizada pelo Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN), Universidade de São Paulo, Brasil. Três semanas antes da inoculação dos frutos, um disco de micélio da cultura foi transferido para placas de petri contendo meio de cultura BDA. As placas foram incubadas a 23°C, com fotoperíodo de 12 h. Os esporos foram coletados e adicionados em solução contendo água esterilizada e DMSO, de modo a obter uma concentração final de 6 x 10⁴ esporos mL⁻¹. No dia da colheita, os frutos foram selecionados quanto a uniformidade e desinfetados. Duas perfurações (2 mm de profundidade e 1 mm de diâmetro) foram efetuadas em posição oposta, na região equatorial de cada fruto. Nas perfurações foram inoculados 5 µL de água esterilizada ou da suspensão de esporos de *B. cinerea*. Os frutos foram armazenados em temperatura média de 23°C, em ambiente escuro com umidade relativa do ar próxima da saturação. A suscetibilidade dos frutos foi avaliada diariamente pelo acompanhamento da incidência da doença, representada pela porcentagem de lesões desenvolvidas nos frutos, e pela severidade, referente ao diâmetro de cada lesão. Um ensaio de suscetibilidade também foi conduzido por aspersão de suspensão de esporos (1,5 x 10⁵) sobre os frutos. A aspersão foi realizada três vezes e os frutos foram mantidos em temperatura média de 23°C, em alta umidade. Para avaliar o desenvolvimento do patógeno, os frutos foram divididos em grupos de acordo com o grau de suscetibilidade, sendo eles: resistentes (quando não ocorreu o desenvolvimento de lesões), parcialmente resistentes (quando as lesões progrediram em menos de 50% do tecido) e suscetíveis (quando

o fruto inteiro foi infectado). A porcentagem de frutos em cada grupo foi contabilizada em 7 dias após a inoculação.

3.2.3. Produção de etileno

Frutos inoculados com *B. cinerea* ou água foram acondicionados em recipientes herméticos (volume de 150 mL) durante 2 horas. Em seguida, uma alíquota de 0,5 mL do *headspace* do recipiente foram injetadas em cromatógrafo a gás Thermofinigan Trace GC Ultra (Thermo Fisher Scientific, EUA), equipado com detector de ionização de chama (FID), metanador e coluna de aço inox preparada com Porapak N 50/80 (1/8" e 1,8 m). O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 25 mL min⁻¹. A temperatura da coluna, injetor, detector e metanador foi de 110 °C, 140 °C, 200 °C e 350°C, respectivamente. A calibração foi feita comparando-se a área dos cromatogramas com a área de padrões primários de etileno (0,5 e 2,0 µL L⁻¹). Os resultados foram representados como µg C₂H₄ kg⁻¹ h⁻¹, em base de massa fresca.

3.2.4. Visualização da produção de O₂⁻ e H₂O₂

Pericarpo de frutos inoculados com *B. cinerea* ou água foram excisados em cerca de 2 cm ao redor das lesões. Os tecidos foram mantidos por 4 horas em solução de Tetrazólio nitroazul (NBT) ou 3'3-Diaminobenzedina (DAB), para detecção de superóxido e H₂O₂, respectivamente. Antes de avaliar as lesões, os tecidos foram infiltrados a vácuo dentro da solução, por 30 minutos. A solução para detecção de superóxido foi composta de 0,1% de NBT em 50 mM de buffer fosfato de potássio e 10 mM de azida de sódio. A solução para a detecção de H₂O₂ foi feita pela diluição de 0,1% de DAB em água destilada. O pH da solução foi corrigido com HCl até 3,8. O princípio deste método baseia-se na formação de um polímero insolúvel entre H₂O₂ e DAB, como descrito por (Thordal-Christensen *et al.*, 1997).

3.2.5. Preparo dos extratos hidrofílico e lipofílico

O extrato hidrofílico foi obtido pela adição de 10 mL de etanol 80% em 100 mg de amostra liofilizada, seguido de agitação e encubação no escuro, por 30 minutos. A solução foi homogeneizada a 8000 g e o sobrenadante foi coletado e imediatamente utilizado para as análises. A obtenção do extrato lipofílico foi realizada segundo metodologia de Sérino *et al.*

(2009), com modificações. Alíquotas de 50 mg de amostra liofilizada foram adicionadas em 100 μL de NaCl saturado e agitadas. Posteriormente, 200 μL de diclorometano foram incorporados ao extrato, seguido de nova agitação. Após a adição de 500 μL de mistura hexano/éter etílico (1:1), o extrato foi novamente agitado e centrifugado a 18000 g por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e os procedimentos posteriores à etapa de adição da mistura hexano/éter etílico foram repetidos até se obter um extrato quase incolor. O extrato foi submetido à evaporação a vácuo, em temperatura de 4 °C, até a completa eliminação dos resíduos. Para a reconstituição do material sólido, foram adicionados 200 μL de acetato de etila. Após nova agitação, o extrato foi filtrado em membrana de 0,45 μm e imediatamente utilizado para as análises.

3.2.6. Perfil de carotenoides

O extrato lipofílico foi utilizado para quantificação e identificação dos carotenoides. O ensaio foi realizado em CLAE (cromatógrafo líquido de alta eficiência), modelo Infinity 1260, equipado com bomba quaternária e injetor automático acoplado a um detector *photo-diode array* (Agilent Technologies, EUA). Uma coluna C30 YCM (5 μm , 250 mm x 4,6 mm, i.d.) foi utilizada para separação dos compostos. As fases móveis consistiram de Metanol:MTBE:H₂O:Acetato de amônio (1 M), nas respectivas proporções de 88:5:5:2, no solvente A, e 28:70:0:2, no solvente B. O tempo total de corrida foi de 60 min, com gradientes de solventes consistindo em 100% de A no início, 15% aos 40 min e 0% aos 50 min. A temperatura da coluna foi mantida em 25 °C, com fluxo de 1 mL min⁻¹ e volume de injeção de 5-10 μL . Os picos eluídos foram monitorados em 450 nm e 474 nm.

A identificação do licopeno e β -caroteno foi realizada em comparação com o tempo de retenção de padrões autênticos. Para os demais carotenoides, uma tentativa de identificação foi realizada através da comparação com a ordem de eluição, espectro de absorção (%III/II) e valores de Q-ratio (II/D_B) reportados na literatura, conforme realizado por vários outros autores (Cortés *et al.*, 2004; Gentili *et al.*, 2015; Gupta, Sreelakshmi e Sharma, 2015). O valor de (%III/II) representa a relação entre o maior pico de absorção (λ_{III}) e o pico de absorção mediano (λ_{II}), tomando-se o mínimo entre os dois picos como linha de base. O Q-ratio representa a relação entre o pico-*cis* de absorção (quando presente) e o pico de absorção mediano (λ_{II}). Os carotenoides identificados como licopeno, prolicopeno e neurosporeno foram quantificados em equivalente de Licopeno, com base na curva de calibração do padrão. Os carotenoides identificados como β -caroteno, δ -caroteno, γ -caroteno e luteína foram

quantificados em equivalente de β -caroteno, também em função da curva de calibração do padrão autêntico. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$, em base de massa seca.

3.2.7. Teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi obtido a partir do extrato hidrofílico. A reação foi realizada pela adição de 200 μL do extrato em 1,5 mL de água destilada e 100 μL de Folin-Ciocalteu. Após 5 minutos, 200 μL de carbonato de sódio 20% foram incorporados à solução, que foi agitada e mantida em escuro por 1 h. A curva de calibração foi preparada com diferentes concentrações de ácido gálico em etanol 80%. As leituras foram realizadas em 765 nm e o ensaio foi conduzido em duplicata. Os resultados foram expressos em mg g^{-1} de equivalente de ácido gálico, em massa seca.

3.2.8. Capacidade antioxidante

A medida da capacidade antioxidante foi realizada no extrato lipofílico e hidrofílico, pelo método baseado na descoloração do radical ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino)-6-sulfônico).. O preparo do radical ABTS foi realizado segundo Re *et al.* (1999), com modificações. A solução do radical foi preparada pela adição de 5 mL de solução estoque de ABTS 7 Mm em 88 μL de persulfato de potássio 140 Mm. A solução foi mantida em escuro à temperatura ambiente por 16 h antes de se conduzir a análise. No dia da análise, uma solução de trabalho foi preparada, diluindo a solução do radical ABTS em álcool etílico, até o alcance de absorbância de 700 nm. A curva padrão foi preparada com 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano (Trolox) 2 mM (0-20 μMol). Para as análises, 20 μL do extrato foram adicionados em 2 mL da solução de trabalho de ABTS. Após 6 minutos de incubação em escuro, a 25 °C, a absorbância foi lida em 734 nm. O ensaio foi conduzido em triplicata e os resultados foram expressos em $\mu\text{Mol g}^{-1}$ de equivalente de Trolox, em massa seca.

3.2.9. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software R Studio (versão 3. 2. 5). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Os resultados foram

submetidos a análise de variância e expressos como média $\pm$ erro padrão. Dados expressos como porcentagem foram transformados pela fórmula: arco seno $x/100^{0.5}$. A normalidade e homogeneidade dos dados foram verificadas pelo teste de Shapiro-Wilk e de Bartlett, respectivamente. A diferença estatística entre as médias foi calculada pelo teste de Tukey. O nível de significância foi estabelecido como $P \leq 0,05$. Uma análise de componentes principais foi conduzida utilizando dados de frutos no estágio vermelho-maduro. A matriz dos dados foi auto escalada antes da análise, de modo a obter o mesmo peso para cada variável.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. O acúmulo diferencial de carotenoides no tomateiro altera a suscetibilidade dos frutos ao fungo *B. cinerea*

A utilização de linhagens quase isogênicas ao MT, carregando as mutações descritas anteriormente, permitiu acessar o efeito da diferente composição de carotenoides na suscetibilidade dos frutos ao fungo *B. cinerea*. Esta abordagem também forneceu um comparativo mais confiável, quando comparado ao simples emprego de mutações, uma vez que as linhagens compartilham do mesmo *background* genético. Considerando que a síntese de carotenoides ocorre com o avanço do amadurecimento, o desenvolvimento do patógeno foi avaliado em dois estádios de maturação dos frutos. Um ensaio de suscetibilidade foi conduzido no estágio verde-maduro, antes da síntese expressiva de carotenoides, e no estágio vermelho-maduro, quando os frutos possuem altas concentrações dos pigmentos. A incidência (Figura 1A) e severidade da doença (Figura 1B) no estágio verde-maduro não diferiram entre os mutantes e o MT ($P \geq 0,05$). A inoculação dos frutos neste estágio serviu de controle adicional para observar o efeito dos carotenoides na suscetibilidade dos frutos. É provável que a suscetibilidade similar entre as linhagens seja decorrente de características em comum neste estágio, como a ausência de carotenoides e a integridade dos tecidos, que ainda não sofreram as modificações fisiológicas e bioquímicas decorrentes do amadurecimento.

No entanto, no estágio verde-maduro, a inoculação com o patógeno parece ter impulsionado o avanço do amadurecimento dos frutos, uma vez que frutos no mesmo estágio inoculados com água não desenvolveram lesões e permaneceram verdes durante os cinco dias após a inoculação (dados não apresentados). De modo contrário, a coloração dos frutos inoculados com *B. cinerea* foi alterada, indicando o início da síntese de carotenoides (Figura

1E), o que sugere a ocorrência de modificações fisiológicas nos frutos decorrentes da interação com o patógeno.

Figura 1. Parâmetros de suscetibilidade avaliados em frutos inoculados com *B. cinerea* em diferentes estádios de maturação. Incidência (A) e severidade (B) da doença em frutos no estágio verde-maduro e incidência (C) e severidade (D) da doença em frutos no estágio vermelho-maduro. Manifestação dos sintomas da doença em frutos verdes e maduros, após cinco dias da inoculação com o patógeno (E). Barra de escala = 2 cm. Círculos brancos determinam as extremidades das lesões. Barras verticais representam $\pm$ erro padrão da média ($n=5$). Médias sem letras ou seguidas de letras iguais não diferem significativamente ($P \leq 0,05$).

Ao contrário dos frutos verdes, nos frutos inoculados no estágio vermelho-maduro a progressão da doença ocorreu rapidamente e se mostrou diferente entre os genótipos. Ao longo do período de avaliação, a incidência da doença foi maior no mutante *r* e menor no mutante *t*, embora diferenças estatísticas tenham sido observadas apenas no terceiro dia após a inoculação (dai) (Figura 1C). A severidade da doença no mutante *t* foi significativamente menor em relação ao MT e aos outros mutantes durante todos os dias de avaliação (Figura 1D). O mutante *Del* se mostrou suscetível ao patógeno durante os primeiros quatro dias de avaliação. No entanto, a partir do terceiro dia, o aumento do diâmetro das lesões nestes frutos se mostrou mais lento, sendo significativamente menor que MT ao quinto dia, enquanto as lesões dos outros genótipos continuaram avançando rapidamente (Figura 1C).

Estes resultados sugerem a participação dos carotenoides na modulação da suscetibilidade dos frutos ao fungo *B. cinerea*, uma vez que após a formação dos pigmentos característicos de cada mutação, diferenças na suscetibilidade dos frutos foram observadas. No entanto, a formação de carotenoides não é um evento isolado do amadurecimento. Durante este processo profundas alterações tornam os frutos mais suscetíveis ao ataque de patógenos (Alexander e Grierson, 2002; Alkan e Fortes, 2015; Grierson, 2013). Um dos motivos que tornam os frutos maduros mais suscetíveis ao *B. cinerea* é a degradação das primeiras barreiras de defesa dos frutos, que envolvem os componentes da parede celular e da cutícula. Nos estádios avançados de maturação, estas estruturas são degradadas de modo a permitir a dispersão das sementes, facilitando a entrada de patógenos e aumentando o conteúdo de açúcares menos complexos, que podem servir de nutriente para os fungos (Cantu *et al.*, 2009). Além disso, o próprio patógeno pode secretar enzimas que degradam estas estruturas, permitindo sua entrada (Kan, van *et al.*, 1997; Kars *et al.*, 2005).

O processo de amadurecimento também é acompanhado por alterações no balanço entre agentes pro-oxidantes e antioxidantes. No estágio *breaker* de frutos do tomateiro, a concentração de peróxido de hidrogênio, a peroxidação lipídica e a oxidação proteica são elevadas (Jimenez *et al.*, 2002). A indução da produção de EROs também acontece com a infecção dos frutos por fungos necrotróficos, onde NADPH oxidases são sintetizadas pelo hospedeiro e pelo patógeno, levando à explosão oxidativa e contribuindo positivamente com a suscetibilidade (Zhang *et al.*, 2015). A importância de EROs na infecção de *B. cinerea* está relacionada ao seu modo de vida necrotrófico. Antes mesmo das células serem invadidas pelas hifas, o patógeno pode secretar substâncias que levam a morte dos tecidos, dentre estas substâncias estão toxinas, ácido oxálico e EROs (Kan, van, 2005). A contribuição da explosão oxidativa no estabelecimento de *B. cinerea* em frutos de tomate foi documentada em trabalhos

anteriores. Zhang *et al.* (2013) Zhang *et al.* (2015) e Bassolino *et al.* (2013) demonstraram que o enriquecimento do tomate com antocianinas elevou a capacidade antioxidante dos frutos e impediu o avanço da explosão oxidativa pelos tecidos, tornando os frutos mais resistentes ao fungo. Embora tratando-se de órgãos diferentes, Polturak *et al.* (2017) mostraram que a indução de EROs também foi a estratégia de infecção utilizada por *B. cinerea* em plantas de tabaco. Neste mesmo trabalho, os autores comprovaram a atuação de betalaínas na redução da suscetibilidade das plantas, em função da elevação na capacidade antioxidante atribuída aos pigmentos.

Embora o processo de infecção de *B. cinerea* ocorra principalmente através de aberturas naturais ou ferimentos, o patógeno é capaz de penetrar diretamente a cutícula, mesmo que intacta (Holz, Coertze e Williamson, 2007). Considerando a importância da integridade celular e da cutícula na resistência dos frutos, nós conduzimos um ensaio inoculando frutos maduros por meio da aspersão da suspensão de esporos, de modo a verificar se o rompimento da primeira barreira de defesa é alterado entre os genótipos e se este aspecto interfere o processo de infecção (Figura 2).

Anteriormente, nossos resultados haviam demonstrado efeitos pleiotrópicos da mutação *Beta carotene*, que culminaram com o aumento na espessura da cutícula dos frutos. Interessantemente, quando a inoculação foi feita por aspersão da suspensão de esporos sobre os frutos intactos, o mutante *B* apresentou o maior número de frutos resistentes, juntamente com *t* (Figura 2A). No entanto, considerando que a infecção de *B. cinerea* ocorre principalmente através de aberturas naturais, como a cicatriz do pedúnculo, foi possível observar que na maior parte dos frutos parcialmente resistentes ou suscetíveis, as lesões se iniciaram a partir desta estrutura (Figura 2B). Esta característica pode explicar o fato de que o mutante *B* também foi a linhagem com a menor porcentagem de frutos parcialmente resistentes e a maior porcentagem de frutos suscetíveis, juntamente com *r*. É possível que nos frutos onde o patógeno não conseguiu acessar a cicatriz do pedúnculo, a resistência de *B* pode ter resultado da maior espessura da cutícula dos frutos. No entanto, uma vez que o patógeno pôde atingir a polpa dos frutos, a suscetibilidade foi tão elevada quanto no ensaio onde o patógeno foi inoculado diretamente na polpa, não permitindo a manifestação da resistência parcial.

Figura 2. Resultado do ensaio de frutos inoculados por aspersão da suspensão de esporos de *B. cinerea*. Porcentagem de frutos resistentes (R), parcialmente resistentes (PR) e suscetíveis (S) em 7 dias após a inoculação (A). Fenótipo dos frutos mostrando os diferentes graus de suscetibilidade (B). Barra de escala = 3 cm. Barras verticais representam $\pm$ erro padrão da média (n=5). Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente ($P \geq 0,05$). MT: Micro Tom, B: *Beta carotene*, t: *tangerine*, r: *yellow flesh*, Del: *Delta carotene*.

Embora nenhum dos genótipos tenha se mostrado totalmente resistente ao patógeno, a modulação no conteúdo de carotenoides promoveu diferenças na manifestação da doença entre os mutantes. No primeiro capítulo, nossos resultados demonstraram efeitos pleiotrópicos das mutações impactando a evolução do amadurecimento fora da planta, com consequente influência em parâmetros resultantes desse processo. É provável que o emprego das mutações também tenha ocasionado efeitos semelhantes em frutos amadurecidos na planta. Assim, a diferença na suscetibilidade entre os genótipos pode não ter resultado exclusivamente do perfil de carotenoides, mas também de outros aspectos relacionados ao amadurecimento. Junto a isso, em frutos verdes, onde as modificações mais expressivas resultantes do amadurecimento ainda não ocorreram, não foram observadas diferenças na suscetibilidade entre os mutantes. Entretanto, a inoculação com *B. cinerea* neste estágio parece ter desencadeado modificações fisiológicas nos frutos, que foram observadas pela alteração na coloração da epiderme. Desta forma, a regulação da suscetibilidade de tomate à *B. cinerea* em

linhagens com diferente acúmulo de carotenoides pode ter sido desencadeada pelos processos decorrentes do próprio amadurecimento ou pelo efeito direto do carotenoide sobre o desenvolvimento do patógeno. Para endereçar estas questões, nós acompanhamos a produção de etileno pelos frutos e a participação dos carotenoides como agentes antioxidantes em frutos inoculados com o patógeno.

3.3.2. A inoculação com *Botrytis cinerea* induz a produção de etileno pelos frutos

A produção de etileno foi monitorada após a inoculação dos frutos com o patógeno ou com água, de modo a verificar se a síntese deste hormônio esteve relacionada com as respostas de suscetibilidade dos frutos. Em ambos os estádios de maturação, a inoculação com o patógeno ocasionou aumento na produção de etileno, sendo que os frutos inoculados com água mantiveram as concentrações deste hormônio mais baixas (Figura 3).

A inoculação com *B. cinerea* no estádio verde-maduro induziu a produção de etileno em níveis muito superiores ao do estádio vermelho-maduro, entre o terceiro e quinto dia após a inoculação (Figura 3A e C). Embora frutos verdes sejam menos suscetíveis à *B. cinerea*, a inoculação com o patógeno neste estádio de maturação ocasiona aumento na expressão de genes e na atividade de enzimas envolvidas com o amadurecimento (Blanco-Ulate *et al.*, 2013; Cantu *et al.*, 2009). Assim, é provável que estas respostas sejam desencadeadas pelo patógeno na tentativa de acelerar este processo e tornar os frutos mais suscetíveis (Blanco-Ulate *et al.*, 2013).

A suscetibilidade de frutos maduros ao *B. cinerea* pode depender de um ou mais fatores envolvidos com o amadurecimento. Dentre eles, pode-se citar a degradação de paredes celulares e amolecimento dos frutos, que facilitam o estabelecimento e desenvolvimento do patógeno (Cantu *et al.*, 2009). Além disso, alterações na composição da cutícula, no teor de sólidos solúveis, no pH intracelular, no conteúdo de compostos fenólicos e em respostas oxidativas são outros processos alterados com o amadurecimento, que podem permitir a colonização dos frutos por fungos necrotróficos (Alkan e Fortes, 2015). O etileno é responsável por grande parte destas alterações e a sua produção durante o amadurecimento e senescência dos frutos pode funcionar como sinal para a germinação dos conídios. Assim, o etileno pode aumentar a suscetibilidade dos frutos com o próprio amadurecimento e ainda estimular o desenvolvimento de hifas e estruturas reprodutivas (Kan, van, 2005).

Figura 3. Quantificação da produção de etileno nos primeiros cinco dias de inoculação. Produção de etileno em frutos no estágio ‘verde-maduro’ inoculados com *B. cinerea* (A) e com água (B). Produção de etileno em frutos no estágio ‘vermelho-maduro’ inoculados com *B. cinerea* (C) e com água (D). Barras verticais representam $\pm$ erro padrão da média (n=4). Dados representados em massa fresca (MF).

Embora a contribuição do etileno com o aumento da suscetibilidade seja conhecida, sua participação nas respostas à infecção de patógenos é muito complexa. Trabalhos anteriores concluíram sua contribuição na resistência de frutos à patógenos, em função de seu envolvimento com respostas de defesa (Akagi, Dandekar e Stotz, 2011; Marcos, González-Candelas e Zacarías, 2005). Assim, baixos níveis de etileno parecem ser necessários para a manutenção da resistência dos frutos, enquanto altos níveis aumentam sua suscetibilidade (Blanco-Ulate *et al.*, 2013).

Em frutos climatéricos a síntese deste hormônio é governada por dois sistemas, denominados sistema 1 e sistema 2. No primeiro, sua síntese é suprimida devido a auto-inibição. No segundo sistema, a síntese auto-catalítica de etileno é ativada, ocasionando o amadurecimento dos frutos (Liu *et al.*, 2015; Pech *et al.*, 2012; Poel, Van de *et al.*, 2012). A

alta concentração de etileno observada nos frutos verdes inoculados com *B. cinerea* provavelmente é resultado da ativação do sistema 2 de produção. Assim, a resistência dos frutos nos dois primeiros dias após a inoculação deve-se à baixa produção de etileno. No entanto, após um determinado limite na concentração do hormônio ser atingido, sua produção auto-catalítica foi ativada, aumentando a suscetibilidade dos frutos (Figura 3A).

Embora os frutos verdes utilizados neste estudo tenham mostrado menor suscetibilidade ao fungo, quando comparados ao estágio vermelho-maduro, a produção de etileno desencadeada após a inoculação acelerou o processo de maturação. Isto explica a alteração na coloração dos frutos inoculados com o patógeno em relação aos frutos inoculados somente com água. No estágio vermelho-maduro, onde as modificações que tornam os frutos mais suscetíveis já ocorreram, a produção de etileno foi consideravelmente menor. Embora seja sutil, a concentração do etileno foi estatisticamente menor em MT e nos mutantes *Del* e *t*. Contudo, no quinto dia após a inoculação, *t* e *B* exibiram as maiores concentrações de etileno. Da mesma forma, uma concentração pouco maior de etileno foi observada em *r* durante os dois primeiros dias e no quarto dia após a inoculação dos frutos (Figura 3C). Assim como nos frutos verdes, a síntese de etileno foi menor nos frutos inoculados com água (Figura 3D), o que indica que a síntese de etileno no estágio vermelho-maduro também tenha sido desencadeada em função da inoculação das lesões com o patógeno.

3.3.3. A modificação na atividade de enzimas relacionadas a carotenogênese altera a concentração e o acúmulo de carotenoides nos mutantes *B*, *t*, *r*, *Del*

Para compreender as respostas associadas a diferencial suscetibilidade dos mutantes *B*, *t*, *r*, *Del* ao *B. cinerea* e sua relação com a diferente composição de carotenoides, procedemos a caracterização do perfil de carotenoides de cada genótipo. A partir da separação dos pigmentos por cromatografia líquida, pode-se perceber que a alteração na atividade de enzimas específicas da carotenogênese também impactaram o conteúdo de carotenoides em outros pontos da via. A identificação e composição de carotenoides foi separada entre as frações de pele e polpa dos frutos, uma vez que a inoculação do patógeno foi feita diretamente na polpa. A partir de padrões comerciais e de nossa tentativa de identificação (Apêndices A, C, D e E), foram identificados entre os genótipos os carotenoides *trans*-licopeno, *cis*-licopeno, β -caroteno, δ -caroteno, ζ -caroteno, γ -caroteno, neurosporeno, prolicopeno e a xantofila luteína (Figura 4A e B).

Figura 4. Concentração de carotenoides e compostos fenólicos nos frutos. Carotenoides encontrados no estágio verde maduro (a) e vermelho maduro (b). Compostos fenólicos totais de frutos no estágio verde maduro ou vermelho maduro (c). Barras verticais representam $\pm$ erro padrão da média ($n=3$). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais ou sem letras indicam ausência de diferença estatística na fração da pele. Médias seguidas de letras minúsculas iguais ou sem letras indicam ausência de diferença estatística na fração da polpa ($P \leq 0,05$). MT: *Micro tom*, B: *Beta carotene*; t: *tangerine*, r: *yellow flesh*, Del: *Delta carotene*. Dados representados em massa seca (MS).

No estágio verde maduro, o principal carotenoide encontrado foi β -caroteno e a xantofila luteína, na pele e polpa dos frutos (Figura 4A). O maior conteúdo de β -caroteno foi encontrado em MT, na fração da polpa. O impacto no acúmulo de carotenoides ocasionado pelas mutações introgrididas não foi observado no estágio verde-maduro, considerando que todos os mutantes acumularam os mesmos carotenoides, embora em conteúdos diferentes de MT. Neste estágio de maturação, a formação de carotenoides ocorre em cloroplastos (Egea *et al.*, 2010) e a regulação de sua síntese é controlada por genes diferentes dos expressos nos frutos em amadurecimento. Em frutos verdes, a síntese de β -caroteno é governada pelo gene *CrtL-b*, que também codifica uma licopeno- β -ciclase. Com o avanço do amadurecimento, outra licopeno- β -ciclase é formada pela expressão do gene *B*, exclusivo do cromoplasto (Ronen *et al.*, 2000). Esta especificidade na expressão genica é provavelmente o motivo pelo qual os níveis de β -caroteno não foram superiores no mutante *B* neste estágio de maturação. Da mesma forma, nos frutos do mutante *r* foram encontrados β -caroteno e luteína, apesar da introgressão da mutação *yellow flesh* que leva à perda de função do gene *Psy-1*. Em tecidos verdes de tomate, um segundo gene para expressão da enzima fitoeno-sintase, *Psy-2*, foi descrito anteriormente (Bartley e Scolnik, 1993; Liu *et al.*, 2003). Desta forma, nestes tecidos a produção de carotenoides não depende exclusivamente de *Psy-1*.

No estágio vermelho-maduro, a composição de carotenoides foi muito diferente entre os genótipos. Os principais carotenoides encontrados em MT foram *trans* e *cis*-licopeno e, em menores quantidades, β -caroteno (Figura 4B). Como esperado, a introgressão das mutações nos genótipos reduziu o conteúdo de *trans*-licopeno nos frutos, entretanto, no mutante *Del* esta redução foi menos expressiva em relação aos outros genótipos. A perda de função da enzima fitoeno-sintase no mutante *r* reduziu expressivamente o conteúdo de carotenoides em ambas as frações dos frutos. Neste genótipo, a maioria dos pigmentos esteve ausente, com exceção de quantidades reduzidas de β -caroteno na pele e da conservação dos teores de luteína na polpa.

A perda de função da enzima carotenoide-isomerase reduziu o conteúdo de *trans*-licopeno nos frutos do mutante *t*. Por outro lado, a presença de licopeno na isomeria *cis* foi maior nestes frutos, seguidos do mutante *Del*. O conteúdo de β -caroteno no mutante *B* foi significativamente maior que MT e os outros genótipos, em função do aumento na atividade da enzima licopeno- β -ciclase (Figura 4B).

Em frutos com a mutação *tangerine*, o carotenoide β -caroteno também foi encontrado embora em menores concentrações. A presença deste carotenoide neste mutante é

provavelmente remanescente da síntese durante o estágio verde-maduro, considerando que a isomeria *cis* de licopeno impede sua ciclização por licopeno-ciclases, devido a forças de repulsão entre os átomos (Eckardt, 2002). No entanto, trabalhos anteriores encontraram evidências da fotoisomerização de *cis*-licopeno (Isaacson *et al.*, 2002). Assim, considerando que os frutos utilizados neste estudo completaram seu amadurecimento nas plantas, é provável que a presença de β -caroteno no mutante *t* seja resultado da isomerização de *cis*-licopeno pela incidência de luz nos frutos, permitindo sua ciclização. Além disso, algumas ciclases podem atuar diretamente sobre neurosporeno (Hirabayashi *et al.*, 2004; Schmidt-Dannert, Umeno e Arnold, 2000; Takaichi *et al.*, 1996). Em *t*, também foram encontrados maior conteúdo de neurosporeno (Figura 4C) e traços de ζ -caroteno (Apêndice A e D). A presença destes carotenoides confirma que a perda de função da enzima carotenoide-isomerase altera não somente o conteúdo de *cis*-licopeno nos frutos, mas também dos carotenoides acima da via.

Em contrapartida, o maior conteúdo do carotenoide monocíclico δ -caroteno foi encontrado no mutante *Del*, em resposta ao aumento na atividade da enzima licopeno- ϵ -ciclase. Esta enzima é responsável pela introdução de ϵ -anéis na cadeia linear de licopeno, podendo formar, além de δ -caroteno, outros carotenoides abaixo da via, como o ϵ - ϵ -caroteno e α -caroteno (Bramley, 2002). Esta característica explica também o elevado conteúdo de luteína encontrado em *Del*, considerando o aumento no fluxo de precursores para sua síntese (Figura 4B).

O teor de compostos fenólicos também foi acessado, considerando sua reconhecida capacidade de sequestro de radicais e seu papel no aumento da resistência de frutos de tomate ao fungo *Botrytis cinerea* (Zhang *et al.* 2015). Em ambos os estádios de maturação, a introgressão das mutações ocasionou mudanças no conteúdo de compostos fenólicos (Figura 4C). No estágio verde-maduro o conteúdo destes compostos na polpa dos frutos de *r* e *Del* foram significativamente maiores que MT, enquanto no estágio vermelho-maduro, não foram encontradas diferenças nesta fração dos frutos.

Juntos, estes resultados sugerem que não somente a quantidade de carotenoides nos frutos pode alterar sua suscetibilidade à *B. cinerea*, mas também a variedade de carotenoides encontrados. Nos frutos verdes, onde todos os genótipos se mostraram suscetíveis ao patógeno, a composição de carotenoides foi muito semelhante, com diferenças apenas na concentração de cada pigmento. Ao contrário, em frutos vermelhos, a composição e quantidade de carotenoides teve grande diferença entre os mutantes. Sendo que os genótipos mais resistentes ao final do armazenamento, *t* e *Del*, foram aqueles com maior variedade de pigmentos.

3.3.4. Modificações na composição de carotenoides alteram a capacidade antioxidante dos frutos e a produção de espécies reativas de oxigênio

Considerando a importância de EROs na colonização dos tecidos por fungos necrotróficos e a reconhecida capacidade antioxidante dos carotenoides e compostos fenólicos, nós decidimos investigar se a diferente composição desses metabólitos nos frutos alterou sua capacidade de sequestro de radicais livres. Para isolar a contribuição dos carotenoides e compostos fenólicos, o ensaio foi conduzido em um extrato lipofílico e hidrofílico, respectivamente.

Durante o estágio verde-maduro, tanto a capacidade antioxidante do extrato hidrofílico quanto do extrato lipofílico, foram maiores na polpa dos frutos (Tabela 1). Porém, com o avanço do amadurecimento, o maior sequestro de radicais passou a ocorrer na pele dos frutos. Em relação ao extrato hidrofílico de ambos os estádios de maturação, o mutante *r* revelou maior capacidade antioxidante, sendo este o genótipo que havia apresentado o maior conteúdo de compostos fenólicos. No extrato lipofílico, em verde-maduro, os frutos com maior capacidade antioxidante na polpa foram dos mutantes *B*, *t* e *Del*. Enquanto no estágio vermelho-maduro, MT, *t* e *Del* foram os genótipos com maior capacidade antioxidante da polpa (Tabela 1).

A capacidade antioxidante atribuída aos carotenoides deve-se a presença de cadeias duplas conjugadas, e o número dessas ligações define a capacidade antioxidante de cada carotenoide (Stahl e Sies, 2003). O licopeno possui elevado número de duplas ligações conjugadas em sua cadeia acíclica, sendo mais eficiente que β -caroteno no sequestro de radicais peróxidos (Galano e Francisco-Marquez, 2009). Assim, a maior concentração de licopeno em *Del*, quando comparado aos demais mutantes, justificam a maior capacidade antioxidante encontrada na polpa dos frutos. Aliado a isso, os altos teores de *cis*-licopeno, β -caroteno, δ -caroteno e luteína, elevam a capacidade de sequestro de radicais neste genótipo. Da mesma forma, o mutante *t* também conservou as concentrações de β -caroteno e aumentou as concentrações de *cis*-licopeno, o que pode justificar sua capacidade antioxidante similar a observada em MT, apesar da reduzida concentração de *trans*-licopeno.

Em relação à suscetibilidade dos frutos, embora tenham sido encontradas diferenças significativas entre a capacidade antioxidante dos frutos verdes de ambos os extratos, nenhum dos mutantes foi menos suscetível à *B. cinerea* neste estágio. Este resultado sugere que a capacidade antioxidante não foi o fator mais decisivo no estabelecimento da doença em frutos verdes. É provável que a elevada produção de etileno nesses frutos possa ter suprimido o

efeito da atividade antioxidante dos genótipos, já que mesmo os frutos com maior capacidade antioxidante foram suscetíveis ao patógeno. Ainda, a capacidade antioxidante do extrato hidrofílico parece não ter regulado a resistência dos frutos vermelhos, uma vez que os mutantes *t* e *Del* tiveram a menor capacidade de sequestro de radicais neste extrato (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade antioxidante dos diferentes extratos e frações dos frutos nos estádios de maturação verde-maduro e vermelho-maduro.

Genótipo	Verde-maduro		Vermelho-maduro	
	Extrato lipofílico ($\mu\text{Mol g}^{-1}$)	Extrato Hidrofílico ($\mu\text{Mol g}^{-1}$)	Extrato lipofílico ($\mu\text{Mol g}^{-1}$)	Extrato Hidrofílico ($\mu\text{Mol g}^{-1}$)
Pele				
Micro tom	$0,41 \pm 0,08$ a	$2,96 \pm 0,59$ ab	$8,40 \pm 0,41$ a	$36,09 \pm 1,37$ bc
Beta carotene	$0,68 \pm 0,07$ a	$3,01 \pm 0,33$ ab	$8,33 \pm 0,56$ a	$32,69 \pm 0,95$ c
tangerine	$0,45 \pm 0,07$ a	$2,01 \pm 0,32$ b	$9,13 \pm 0,74$ a	$38,66 \pm 0,77$ b
yellow flesh	$0,58 \pm 0,09$ a	$4,03 \pm 0,51$ a	$9,24 \pm 0,06$ a	$45,03 \pm 1,60$ a
Delta carotene	$0,46 \pm 0,04$ a	$2,66 \pm 0,56$ b	$9,26 \pm 0,30$ a	$35,96 \pm 0,61$ bc
Polpa				
Micro tom	$0,42 \pm 0,03$ c	$6,18 \pm 0,26$ abc	$2,01 \pm 0,29$ ab	$17,93 \pm 0,52$ ab
Beta carotene	$1,17 \pm 0,17$ a	$4,39 \pm 0,22$ c	$1,64 \pm 0,23$ b	$17,64 \pm 0,18$ ab
tangerine	$1,13 \pm 0,12$ ab	$6,68 \pm 0,12$ ab	$2,50 \pm 0,23$ ab	$17,44 \pm 0,48$ b
yellow flesh	$0,58 \pm 0,12$ bc	$7,48 \pm 0,65$ a	$1,67 \pm 0,16$ b	$19,53 \pm 0,54$ a
Delta carotene	$1,10 \pm 0,14$ ab	$5,57 \pm 0,53$ bc	$4,02 \pm 0,12$ a	$16,71 \pm 0,26$ b

Dados representados como média $\pm$ erro padrão ($n=3$). Médias seguidas de letras diferentes na mesma fração dos frutos e coluna diferem significativamente entre si ($P \leq 0,05$). Dados representados em equivalente de massa seca.

Para confirmar a participação de EROs na suscetibilidade dos frutos, nós conduzimos um ensaio histoquímico utilizando NBT e DAB, de modo a caracterizar a produção de superóxido e peróxido de hidrogênio, respectivamente (Figura 5). A detecção de H_2O_2 deve-se a sua polimerização com DAB, formando um precipitado marrom escuro (Thordal-Christensen *et al.*, 1997). Já a detecção de superóxido acontece pela reação com NBT e consequente produção de formazan, que possui coloração roxa (Grellet Bournonville e Díaz-Ricci, 2011).

Figura 5. Análises histoquímicas para detecção de espécies reativas de oxigênio em frutos de tomateiro 24 h depois da inoculação com *B. cinerea*. Ensaio conduzido no estágio verde-maduro (A) e vermelho-maduro (B). A produção de superóxido foi detectada pela reação com Tetrazólio nitroazul (NBT) e a produção de H_2O_2 foi detectada com 3'3-Diaminobenzedina (DAB). Imagens no canto inferior esquerdo demonstram o resultado do ensaio em frutos inoculados com água. Barras de escala em (A) = 500 μm . Barras de escala em (B) = 1 mm.

No estágio verde-maduro, quando o conteúdo de carotenoides e compostos fenólicos é reduzido, a reação pôde ser visualizada mesmo em frutos inoculados somente com água, e nenhum dos genótipos mostrou ser mais eficiente na redução de EROs (Figura 5A). Da mesma forma, no estágio vermelho-maduro não foram observadas claras diferenças na produção de H_2O_2 entre os genótipos, embora em *t* a reação com DAB permaneceu mais

concentrada ao redor da lesão onde a suspensão de esporos foi inoculada, enquanto nos demais genótipos a reação se espalhou pelo tecido (Figura 5B). Já a reação com NBT foi mais intensa nos mutantes *Beta carotene* e *yellow flesh*, indicando maior produção de superóxido. Além disso, os frutos inoculados somente com água não apresentaram halo característico da produção de superóxido e H_2O_2 , o que confirma que *B. cinerea* pode induzir a produção de EROs e tornar os frutos mais suscetíveis no estágio vermelho-maduro (Figura 5B).

Para compreender melhor o envolvimento da capacidade antioxidante dos carotenoides e compostos fenólicos na suscetibilidade à *B. cinerea*, nós conduzimos uma análise de componentes principais utilizando as concentrações de cada carotenoide, compostos fenólicos e a capacidade antioxidante de frutos vermelhos (Figura 6). Na porção da pele, o primeiro e segundo componentes explicaram 36,2% e 29,87% da variância, respectivamente (Figura 6A). Enquanto que na porção da polpa, 25,04% da variância foi explicada pelo primeiro componente e 47,18% pelo segundo (Figura 6B).

Figura 6. Análise de componentes principais referente aos carotenoides, atividade antioxidante dos extratos e compostos fenólicos totais encontrados na pele (a) e polpa (b) de frutos vermelhos.

Na pele, a capacidade antioxidante do extrato lipofílico esteve mais associada aos principais carotenoides encontrados em MT e no mutante *Del*. Enquanto que a capacidade antioxidante do extrato hidrofílico esteve associada à *r*, assim como os compostos fenólicos (Figura 6A). O MT e o mutante *Del* estiverem fortemente relacionados entre si e entre os

carotenoides *trans*-licopeno, *cis*-licopeno, γ -caroteno, luteína e δ -caroteno. Estes genótipos haviam apresentado porcentagem semelhante de frutos resistentes, parcialmente resistentes e suscetíveis, quando a inoculação foi conduzida na pele (Figura 2A). Assim, é provável que o acúmulo destes carotenoides tenha sido o principal fator que influenciou a infecção por *B.cinerea* quando o patógeno foi inoculado na pele dos frutos desses genótipos. Já na fração da polpa, o primeiro componente separou os mutantes *t* e *Del* dos demais genótipos, sendo justamente estes mutantes que apresentaram menor suscetibilidade quando o patógeno foi inoculado diretamente na polpa dos frutos (Figura 6B). Ao mesmo tempo, os carotenoides *trans*-licopeno, *cis*-licopeno, δ -caroteno e luteína também seguiram esta separação, acompanhados da capacidade antioxidante do extrato lipofílico. Estes resultados sugerem que a capacidade antioxidante dos diferentes carotenoides, representada pelo extrato lipofílico, foi quem mais contribuiu para a redução da suscetibilidade dos frutos. Sendo os mutantes com maior concentração e variedade de carotenoides, os menos suscetíveis à *B. cinerea*.

Em trabalhos anteriores Bassolino *et al.* (2013), Zhang *et al.* (2013) e Zhang *et al.* (2015) observaram resistência ao fungo *B. cinerea* em frutos de tomate com elevado conteúdo de antocianinas. A resistência dos frutos foi atribuída a capacidade destes pigmentos impedirem a explosão de EROs e consequente morte dos tecidos. Assim, este efeito reduziu o crescimento do fungo justamente por este ser seu principal mecanismo de infecção. Em nosso trabalho, a atividade antioxidante lipofílica dos mutantes menos suscetíveis foi mais elevada, assim como o sequestro de radicais, no entanto, nenhum dos genótipos foi resistente ao *B. cinerea*. Ao contrário dos trabalhos citados anteriormente, a concentração total dos pigmentos não foi elevada nos frutos mutantes, sendo que a diferença mais expressiva entre eles baseou-se na alteração do tipo de carotenoide acumulado. Assim, investigações futuras podem esclarecer se o acúmulo expressivo dos carotenoides encontrados em *tangerine* e *Del* podem ocasionar efeitos adicionais na resistência dos frutos.

3.4. CONCLUSÃO

A maior variedade de isômeros de carotenóides presente em *t* e *Del* reduz a explosão oxidativa desencadeada pelo patógeno, em razão da maior capacidade antioxidante do tecido, retardando a progressão e o desenvolvimento do *Botrytis*.

A composição de carotenoides, tanto na pele quanto polpa dos frutos de *tangerine*, contribuiu para a redução da suscetibilidade, enquanto a menor suscetibilidade de *Delta carotene* foi observada somente na fração da polpa, onde a capacidade antioxidante foi maior.

REFERÊNCIAS

- AKAGI, A.; DANDEKAR, A. M.; STOTZ, H. U. Resistance of *Malus domestica* Fruit to *Botrytis cinerea* Depends on Endogenous Ethylene Biosynthesis. **Phytopathology**, v. 101, n. 11, p. 1311–1321, nov. 2011.
- ALEXANDER, L.; GRIERSON, D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 377, p. 2039–2055, 1 out. 2002.
- ALKAN, N.; FORTES, A. M. Insights into molecular and metabolic events associated with fruit response to post-harvest fungal pathogens. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 889, 2015.
- BARTLEY, G. E.; SCOLNIK, P. A. cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of PSY2, a second tomato gene encoding phytoene synthase. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 34, p. 25718–21, 5 dez. 1993.
- BASSOLINO, L. *et al.* Accumulation of anthocyanins in tomato skin extends shelf life. **New Phytologist**, v. 200, n. 3, p. 650–655, nov. 2013.
- BLANCO-ULATE, B. *et al.* Tomato transcriptome and mutant analyses suggest a role for plant stress hormones in the interaction between fruit and *Botrytis cinerea*. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. May, 2013.
- BLANCO-ULATE, B. *et al.* Genome-wide transcriptional profiling of *Botrytis cinerea* genes targeting plant cell walls during infections of different hosts. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 435, 3 set. 2014.
- BRAMLEY, P. M. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 377, p. 2107–2113, 1 out. 2002.
- CANTU, D. *et al.* The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 3, p. 859–864, 2008.
- CANTU, D. *et al.* Ripening-Regulated Susceptibility of Tomato Fruit to *Botrytis cinerea* Requires NOR But Not RIN or Ethylene. **PLANT PHYSIOLOGY**, 2009.
- CARVALHO, R. F. *et al.* Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: “Micro-Tom” as an effective toolkit for plant development research. **Plant methods**, v. 7, n. 1, p. 18, 29 jun. 2011.
- CHENG, H. M. *et al.* Lycopene and tomato and risk of cardiovascular diseases: A systematic review and meta-analysis of epidemiological evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1–18, 11 ago. 2017.
- CORTÉS, C. *et al.* Identification and Quantification of Carotenoids Including Geometrical Isomers in Fruit and Vegetable Juices by Liquid Chromatography with Ultraviolet–Diode Array Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2203–2212, 21 abr. 2004.
- ECKARDT, N. A. Tangerine Dreams: Cloning of Carotenoid Isomerase from *Arabidopsis* and Tomato. **the Plant Cell Online**, v. 14, n. 2, p. 289–292, 2002.
- EGEA, I. *et al.* Chromoplast Differentiation: Current Status and Perspectives. **Plant and Cell Physiology**, v. 51, n. 10, p. 1601–1611, 1 out. 2010.

- EMMANUEL, E.; LEVY, A. A. Tomato mutants as tools for functional genomics. **Current opinion in plant biology**, v. 5, n. 2, p. 112–7, abr. 2002.
- FRAY, R. G.; GRIERSON, D. Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and co-suppression. **Plant molecular biology**, v. 22, n. 4, p. 589–602, jul. 1993.
- GALANO, A.; FRANCISCO-MARQUEZ, M. Reactions of OOH Radical with β -Carotene, Lycopene, and Torulene: Hydrogen Atom Transfer and Adduct Formation Mechanisms. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 32, p. 11338–11345, 13 ago. 2009.
- GENTILI, A. *et al.* Screening of carotenoids in tomato fruits by using liquid chromatography with diode array-linear ion trap mass spectrometry detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 33, p. 7428–7439, 2015.
- GIOVANNONI, J. J. Genetic regulation of fruit development and ripening. **The Plant cell**, v. 16 Suppl, n. Suppl, p. S170-80, 2004.
- GLAZEBROOK, J. Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, n. 1, p. 205–227, 2005.
- GRELLET BOURNONVILLE, C. F.; DÍAZ-RICCI, J. C. Quantitative determination of superoxide in plant leaves using a modified NBT staining method. **Phytochemical Analysis**, v. 22, n. 3, p. 268–271, maio 2011.
- GRIERSON, D. Ethylene and the Control of Fruit Ripening. **The Molecular Biology and Biochemistry of Fruit Ripening**, p. 43–73, 2013.
- GUPTA, P.; SREELAKSHMI, Y.; SHARMA, R. A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography. **Plant Methods**, v. 11, n. 1, p. 5, 2015.
- HAMMOND, B. R.; RENZI, L. M. Carotenoids. **Advances in nutrition (Bethesda, Md.)**, v. 4, n. 4, p. 474–6, 1 jul. 2013.
- HAN, R. M.; ZHANG, J. P.; SKIBSTED, L. H. Reaction dynamics of flavonoids and carotenoids as antioxidants. **Molecules**, v. 17, n. 2, p. 2140–2160, 2012.
- HIRABAYASHI, H. *et al.* The role of the carotenoids in the photoadaptation of the brown-colored sulfur bacterium *Chlorobium phaeobacteroides*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 79, n. 3, p. 280–285, 1 maio 2007.
- HOLZ, G.; COERTZE, S.; WILLIAMSON, B. The Ecology of Botrytis on Plant Surfaces. *In: Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 9–27.
- ISAACSON, T. *et al.* Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta-carotene and xanthophylls in plants. **The Plant cell**, v. 14, n. 2, p. 333–42, fev. 2002.
- JIMENEZ, A. *et al.* Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. **Planta**, v. 214, n. 5, p. 751–758, 1 mar. 2002.
- KAN, J. A. L. VAN *et al.* Cutinase A of *Botrytis cinerea* is Expressed, but not Essential, During Penetration of Gerbera and Tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, n. 1, p. 30–38, jan. 1997.
- KAN, J. A. L. VAN. INFECTION STRATEGIES OF BOTRYTIS CINEREA. **Acta Horticulturae**, n. 669, p. 77–90, fev. 2005.
- KAN, J. A. L. VAN. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 5, p. 247–253, maio 2006.

- KARS, I. *et al.* Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. **The Plant Journal**, v. 43, n. 2, p. 213–225, 10 jun. 2005.
- KEPCZYNASKA, E. Ethylene requirement during germination of *Botrytis cinerea* spores. **Physiologia Plantarum**, v. 77, n. 3, p. 369–372, 1 nov. 1989.
- LIU, M. *et al.* Ethylene control of fruit ripening: revisiting the complex network of transcriptional regulation. **Plant Physiology**, n. October 2015, p. pp.01361.2015, 2015.
- LIU, Y.-S. *et al.* There is more to tomato fruit colour than candidate carotenoid genes. **Plant Biotechnology Journal**, v. 1, n. 3, p. 195–207, 25 abr. 2003.
- MARCOS, J. F.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L.; ZACARÍAS, L. Involvement of ethylene biosynthesis and perception in the susceptibility of citrus fruits to *Penicillium digitatum* infection and the accumulation of defence-related mRNAs. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 418, p. 2183–2193, 1 ago. 2005.
- MENGISTE, T. Plant Immunity to Necrotrophs. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 50, p. 267–94, 2012.
- PECH, J.-C. *et al.* Ethylene and Fruit Ripening. In: **Annual Plant Reviews Volume 44**. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2012. p. 275–304.
- POEL, B. VAN DE *et al.* Targeted systems biology profiling of tomato fruit reveals coordination of the Yang cycle and a distinct regulation of ethylene biosynthesis during postclimacteric ripening. **Plant physiology**, v. 160, n. 3, p. 1498–514, 1 nov. 2012.
- POLTURAK, G. *et al.* Engineered gray mold resistance, antioxidant capacity, and pigmentation in betalain-producing crops and ornamentals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 34, p. 9062–9067, 22 ago. 2017.
- POWELL, A. L. T. *et al.* Transgenic Expression of Pear PGIP in Tomato Limits Fungal Colonization. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, n. 9, p. 942–950, set. 2000.
- RAMEL, F. *et al.* Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants. **Plant physiology**, v. 158, n. 3, p. 1267–78, mar. 2012.
- RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology & medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–7, maio 1999.
- RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 123–130, abr. 2003.
- RONEN, G. *et al.* Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 17, n. 4, p. 341–51, fev. 1999.
- RONEN, G. *et al.* An alternative pathway to beta -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 20, p. 11102–11107, 26 set. 2000.
- SCHMIDT-DANNERT, C.; UMENO, D.; ARNOLD, F. H. Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 7, p. 750–753, 1 jul. 2000.
- SÉRINO, S. *et al.* HPLC Assay of Tomato Carotenoids: Validation of a Rapid Microextraction Technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 8753–8760, 14 out. 2009.
- STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, n. 6, p. 345–351, 2003.

- TAKAICHI, S. *et al.* The carotenoid 7,8-dihydro- ψ end group can be cyclized by the lycopene cyclases from the bacterium *Erwinia uredovora* and the higher plant *Capsicum annuum*. **European journal of biochemistry**, v. 241, n. 1, p. 291–6, 1 out. 1996.
- THORDAL-CHRISTENSEN, H. *et al.* Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. **The Plant Journal**, v. 11, n. 6, p. 1187–1194, 1997.
- VERHOEFF, K.; WARREN, J. M. In vitro and in vivo production of cell wall degrading enzymes by *Botrytis cinerea* from tomato. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 78, n. 4, p. 179–185, jul. 1972.
- YOO, H. J. *et al.* Inferring the genetic determinants of fruit colors in tomato by carotenoid profiling. **Molecules**, v. 22, n. 5, p. 1–14, 2017.
- ZHANG, Y. *et al.* Anthocyanins double the shelf life of tomatoes by delaying overripening and reducing susceptibility to gray mold. **Current Biology**, v. 23, n. 12, p. 1094–1100, 2013.
- ZHANG, Y *et al.* Different ROS-Scavenging Properties of Flavonoids Determine Their Abilities to Extend Shelf Life of Tomato. **Plant Physiology**. v. 169, p. 1568-1583, 2015.
- ZHAO, Y. *et al.* Biological control of the post-harvest pathogens *Alternaria solani* , *Rhizopus stolonifer* , and *Botrytis cinerea* on tomato fruit by *Pichia guilliermondii*. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 83, n. 1, p. 132–136, 7 jan. 2008.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados nesta dissertação demonstram a ocorrência de novos efeitos pleiotrópicos atribuídos às mutações *Beta carotene*, *tangerine*, *yellow flesh* e *Delta carotene*. As variações alélicas introgridas ao Micro Tom impactaram a velocidade do amadurecimento, a estrutura da cutícula dos frutos, os principais parâmetros de qualidade e, como era esperado, a propriedade nutricional dos frutos, representada pelos carotenoides, compostos fenólicos e capacidade antioxidante. A alteração no teor de sólidos solúveis, ácidos orgânicos e firmeza provavelmente resultaram do diferenciado padrão climatérico entre os genótipos, no entanto, abordagens mais específicas são necessárias para esclarecer a influência de tais mutações na taxa respiratória e produção de etileno.

O desenvolvimento do fungo necrotrófico *B. cinerea* também foi alterado entre os genótipos. A inoculação com o patógeno demonstrou menor suscetibilidade do mutante *tangerine* e *Delta carotene*, enquanto *Beta carotene* e *yellow flesh* se mostraram mais suscetíveis. Embora a cutícula dos frutos de *Beta carotene* tenha se mostrado mais espessa, esta característica não reduziu a perda de massa dos frutos durante o armazenamento pós-colheita e nem sua suscetibilidade ao *Botrytis*, uma vez que a entrada do patógeno se deu principalmente pela cicatriz do pedúnculo. A interação com o patógeno ocasionou aumento na produção de etileno, que foi observado em todos os mutantes, principalmente em frutos verdes. A produção de espécies reativas de oxigênio também foi desencadeada pela interação com o patógeno. Neste sentido, a maior capacidade de sequestro de radicais pode ter contribuído para a redução da suscetibilidade de *tangerine* e *Delta carotene*. Embora nenhum dos genótipos tenha sido totalmente resistente ao fungo, a redução da suscetibilidade foi efeito da simples alteração do tipo de carotenoide acumulado, sendo que nenhum mutante apresentou maior concentração total de carotenoides. Assim, a redução da suscetibilidade pode ser resultado da atuação direta do pigmento acumulado no tecido, ou dos efeitos pleiotrópicos das mutações observados sobre o amadurecimento dos frutos. Trabalhos futuros podem endereçar estas questões, aumentando o teor do carotenoide acumulado, a fim de verificar se existe algum efeito adicional decorrente da concentração do pigmento.

Embora sejam necessários maiores esclarecimentos sobre a atuação de carotenoides no amadurecimento e na suscetibilidade ao *B. cinerea*, nossos resultados demonstram a contribuição destes pigmentos nestes aspectos. Desta forma, além de alterar a composição nutricional, a manipulação de carotenoides específicos e de seus níveis pode ser uma elegante estratégia para a obtenção de frutos com superior qualidade e vida útil pós-colheita.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Tentativa de identificação dos principais carotenoides encontrados nos frutos de tomateiro em comparação com dados reportados na literatura. Parênteses indicam picos pouco definidos. %III/II representam a relação entre o maior pico de absorção (λ_{III}) e o pico de absorção mediano (λ_{II}), tomando-se o mínimo entre os dois picos como linha de base. Q-ratio representa a relação entre o pico-*cis* de absorção (quando presente) e o pico de absorção mediano (λ_{II}).

APÊNDICE B. Cromatogramas da pele dos frutos de tomateiro no estágio vermelho-maduro, amadurecidos fora da planta. Micro Tom (a), *Beta carotene* (b), *tangerine* (c), *yellow flesh* (d) e *Delta carotene* (e). Identificação dos picos no apêndice 1.

APÊNDICE C. Cromatogramas da pele dos frutos de tomateiro colhidos no estágio verde-maduro. Micro Tom (a), *Beta carotene* (b), *tangerine* (c), *yellow flesh* (d) e *Delta carotene* (e). Identificação dos picos no apêndice 1.

APÊNDICE D. Cromatogramas da pele dos frutos de tomateiro colhidos no estágio vermelho-maduro. Micro Tom (a), *Beta carotene* (b), *tangerine* (c), *yellow flesh* (d) e *Delta carotene* (e). Identificação dos picos no apêndice 1.

APÊNDICE E. Espectro de absorção UV-visível (230-640 nm) extraído dos picos identificados.

n°	Tempo de retenção	λ (nm) encontrado	λ (nm) literatura	%III/II encontrado	%III/II literatura	Q ratio encontrado	Q ratio literatura	Provável composto
1	19,5	332, (424), 446, 474	423, 440, 470 [2]	63,4	64,7 [1]	0,22	0,13 [1]	<i>cis</i> - luteína
2	19,8	(424), 446, 474	(424), 445, 474 [1]	67,38	62,5 [1]	-	-	luteína
3	29,5	332, 348, 368	332, 348, 367 [1]	89,0	90,9 [1]	0,74	-	fitoflueno
4	34	350, (425), 452, 479	345, 451, 479 [3]	26,7	30,0 [1]	0,50	0,34 [3]	13- ou 13' - <i>cis</i> -β-carotene
5	34,6	340, (420), 452, 478	342, (426), 452, 478 [4]	26,3	30,0 [1]	0,19	0,13 [4]	9- ou 9' - <i>cis</i> -β-carotene
6	35,7	(418), 440, 458	418, 439, 463 [5]	29,4	-	-	-	prolicopeno
7	36,4	380, 402, 426	380, 401, 426 [1]	107,0	112,0 [1]	-	-	ζ-caroteno
8	41,4	346, 432, 456, 488	432, 457, 488 [1]	77,1	71,4 [1]	0,62	0,54 [1]	δ-caroteno 1
9	42	348, 434, 458, 490	345, 425, 450 [1]	58,3	53,1 [1]	0,68	0,48 [1]	δ-caroteno 2
10	44,7	416, 438, 466	412, 434, 462 [1]	80,8	79,2 [1]	0,52	0,47 [1]	15- <i>cis</i> - neurosporeno
11	45,1	420, 442, 470	416, 440, 469 [1]	97,4	92,3 [1]	-	-	neurosporeno
12	46,2	(440), 466, 496	439, 462, 492 [1]	52,2	53,3 [1]	-	-	γ-caroteno
13	46,7	416, 440, 470	-	102,84	-	0,99	-	não identificado
14	47,44	416, 440, 470	-	80,99	-	0,68	-	não identificado
15	50,4	446, 472, 502	446, 472, 503 [1]	71,8	70,6 [1]	0,26	0,15 [1]	<i>cis</i> -licopeno 1
16	55,6	442, 472, 504	446, 472, 503 [1]	71,3	73,9 [1]	0,26	-	<i>all-trans</i> -licopeno
17	57	364, 446, 476, 504	446, 472, 503 [1]	83,6	74,3 [1]	0,66	-	<i>cis</i> -licopeno 2

Referência:

- [1] Gupta, P.; Sreelakshmi, Y.; Sharma, R. A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatograph. **Plant Methods**, v. 11, 2015, 12 p.
- [2] Liu, H.L.; Kao, T.H.; Chen, B.H. Determination of Carotenoids in the Chinese Medical Herb Jiao-Gu-Lan (Gynostemma Pentaphyllum MAKINO) by Liquid Chromatography. **Chromatographia**, v. 60, p. 411-417, 2004.
- [3] Strati, I. F.; Sinaoglou, V. J.; Kora, L. Carotenoids from Foods of Plant, Animal and Marine Origin: An Efficient HPLC-DAD Separation Method. **Foods**, v. 1, p. 52-56, 2012.
- [4] Inbaraj, B. S.; Lu, H.; Hung, C. F., et al. Determination of carotenoids and their esters in fruits of Lycium barbarum Linnaeus by HPLC-DAD-APCI-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 812-818, 2008.
- [5] Gentili, A.; Careti, F.; Ventura et al., S. Screening of Carotenoids in Tomato Fruits by Using LiquidChromatography with Diode Array-Linear Ion Trap Mass Spectrometry Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 7428-7439, 2015.