UNIVERSITY OF SÃO PAULO
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Graduation Program in Food Science
Area of Food Science

**Evaluation of ethylene-auxin crosstalk and its influence
on the volatile compound metabolism during tomato
(*Solanum lycopersicum* L.) fruit ripening by comparative
metabolomic and proteomic analysis**

Eric de Castro Tobaruela

Ph. D. thesis presented for the degree of
DOCTOR OF SCIENCE

Advisor: Prof. Dr. Eduardo Purgatto

São Paulo
2020

RESUMO

TOBARUELA EC. **Avaliação da interação etileno-auxina e de sua influência no metabolismo de compostos voláteis durante o amadurecimento de tomates (*Solanum lycopersicum* L.) por análise metabolômica e proteômica comparativa.** 2020. 198f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Progressos consideráveis têm sido feitos no estudo do amadurecimento de frutos climatéricos. Entretanto, o conhecimento acerca dos fatores dependentes e independentes de etileno que regulam o amadurecimento de frutos climatéricos ainda é limitado e o papel da auxina e de outros hormônios relacionados à regulação do amadurecimento permanece por ser elucidado. Estudos têm avaliado o papel da auxina e da interação etileno-auxina no metabolismo secundário em frutos de tomate e destacado a necessidade de aprofundar o conhecimento já existente e melhorar a compreensão do papel de ambos os hormônios na formação do aroma de frutos climatéricos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a interação etileno-auxina e sua influência no metabolismo de compostos voláteis durante o amadurecimento de tomates (*Solanum lycopersicum* L.) através de análises metabolômicas e proteômicas comparativas. Para tal, frutos de tomateiro cv. Micro-Tom em estágio *mature green* foram separados em quatro grupos experimentais: CTRL (sem tratamento); ETHY (tratamento com etileno); IAA (tratamento com ácido indol-3-acético); ETHY+IAA (ambos os tratamentos hormonais). A mudança de cor e a emissão de etileno foram determinadas diariamente. Os perfis metabólicos polares e não polares foram determinados separadamente em frutos 0, 8 e 18 dias de amadurecimento por GC-MS enquanto as análises proteômicas foram realizadas em frutos com 0 e 8 dias de amadurecimento por LC-MS. Compostos voláteis foram analisados em dias específicos. Metabolitos primários e secundários tiveram seus níveis significativamente alterados pelos tratamentos hormonais, assim como as enzimas envolvidas em metabolismos relacionados. Análises de enriquecimento evidenciaram as vias metabólicas que foram significativamente influenciadas pelos tratamentos com etileno e auxina, incluindo em metabolismos secundários, como as vias de biossíntese de terpenoides, carotenoides e compostos voláteis derivados de

aminoácidos e ácidos graxos. Por fim, metabólitos primários, metabólitos secundários, enzimas e compostos voláteis importantes para o aroma dos frutos de tomate foram correlacionados em análises de vias metabólicas específicas. Considerando os resultados obtidos, observamos o efeito de cada hormônio estudado na modulação dos metabolismos primário e secundário, e, conseqüentemente, na formação de compostos voláteis, reforçando não apenas a importância do etileno e da auxina na regulação do amadurecimento, assim como o papel do *crosstalk* entre etileno e auxina no desenvolvimento do aroma do tomate.

Palavras-chave: Frutos climatéricos. Carotenoides. Compostos voláteis. Proteínas. Metabólitos.

ABSTRACT

TOBARUELA EC. **Evaluation of ethylene-auxin crosstalk and its influence on the volatile compound metabolism during tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit ripening by comparative metabolomic and proteomic analysis.** 2020. 198f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Considerable progress has been made in studying climacteric fruit ripening. However, knowledge of ethylene-dependent and independent regulatory processes involved in this process is limited, and the roles of auxin and other ripening-related hormones remain to be elucidated. Studies have evaluated the roles of auxin and ethylene-auxin crosstalk in secondary metabolism in tomato fruits and highlighted the need to deepen existing knowledge and improve understanding of the roles of both hormones in regulating aroma formation in climacteric fruits. In this context, the present study aimed to evaluate the ethylene-auxin crosstalk and its influence on the volatile compound metabolism during tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit ripening by comparative metabolomic and proteomic analysis. Tomato fruits cv. Micro-Tom at the mature green stage were randomly separated into four groups according to hormone treatments: CTRL (without treatment); ETHY (ethylene treatment); IAA (indole-3-acetic acid treatment); and ETHY+IAA (both hormone treatments). The color shift and ethylene emission were determined daily. Polar and non-polar metabolic profiles were obtained separately at 0, 8, and 18 days after harvest (DAH) by GC-MS, while proteomic analysis was conducted at 0 and 8 DAH by LC-MS. Volatile compounds were analyzed on specific days. Hormone treatments significantly altered the levels of both primary and secondary metabolites and the enzymes involved in the related metabolisms. Enrichment analyses showed which pathways were significantly influenced by ethylene and auxin treatments, including those of secondary metabolisms, such as the biosynthetic pathways of terpenoids, carotenoids, and volatile compounds derived from amino acids and fatty acids. Finally, primary and secondary metabolites, enzymes, and volatile compounds important for tomato fruit aroma were correlated in specific pathway analyses. Considering the obtained results, we observed the effect of each studied hormone in modulating primary and secondary metabolisms and

therefore volatile compound formation, reinforcing both the importance of ethylene and auxin in regulating ripening and the role of ethylene-auxin crosstalk in regulating the tomato fruit aroma.

Keywords: Climacteric fruits. Carotenoids. Volatile compounds. Proteins. Metabolites.