UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Interação etileno-auxina e sua influência na produção de
compostos voláteis do aroma durante o amadurecimento do
tomate (*Solanum lycopersicum*)

Vanessa Caroline de Barros Bonato

Dissertação para
obtenção do Título de MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Purgatto

São Paulo
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Interação etileno-auxina e sua influência na produção de
compostos voláteis do aroma durante o amadurecimento do
tomate (*Solanum lycopersicum*)

Vanessa Caroline de Barros Bonato

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Dissertação para
obtenção do Título de MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Purgatto

São Paulo
2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

B699i Bonato, Vanessa Caroline de Barros
Interação etileno-auxina e sua influência na produção de compostos voláteis do aroma durante o amadurecimento do tomate (*Solanum lycopersicum*) / Vanessa Caroline de Barros Bonato. -- São Paulo, 2015.
93p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Orientador: Purgatto, Eduardo

1. Bioquímica de alimentos 2. Tomate 3. Expressão gênica
I. T. II. Purgatto, Eduardo, orientador.

641.1 CDD

Vanessa Caroline de Barros Bonato

Interação etileno-auxina e sua influência na produção de
compostos voláteis do aroma durante o amadurecimento do
tomate (*Solanum lycopersicum*)

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Eduardo Purgatto
Orientador/presidente

Prof. Assoc. Lázaro Eustáquio Pereira Peres
1o. examinador

Prof. Titular Helenice Mercier
2o. examinador

São Paulo, 19 de outubro de 2015.

DEDICATÓRIA

À minha minha família, pelo incentivo, apoio, carinho e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Eduardo Purgatto, por todo o companheirismo, paciência, motivação e amizade em toda essa trajetória;

Aos professores e funcionários do Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos por toda colaboração;

Aos parceiros deste trabalho, Bruna Lima, Carolina P. Fernandes e Luciano Freschi por toda assistência e companheirismo;

Aos professores Beatriz Rosana Cordenunsi, Luciano Freschi e Helenice Mercier pelas contribuições dadas ao trabalho na minha banca de qualificação;

Aos amigos do Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos, pela amizade;

À Fapesp, pela concessão da bolsa de mestrado;

À todos que colaboraram direta ou indiretamente para que este trabalho pudesse ser executado.

RESUMO

BONATO, V. C. B. **Interação etileno-auxina e sua influência na produção de compostos voláteis do aroma durante o amadurecimento do tomate (*Solanum lycopersicum*)**. 2015. 93p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O amadurecimento é um processo complexo e geneticamente programado através do qual o fruto adquire características próprias (níveis de açúcar e acidez, cor, amaciamento, sabor e aroma, entre outras) que o torna atraente aos consumidores. O tomate (*Solanum lycopersicum*) tem sido largamente utilizado como modelo para os estudos sobre amadurecimento de frutos devido à sua importância nutricional e econômica e aos avanços no entendimento de sua genética e bioquímica. Neste fruto, um conjunto de 20 a 30 substâncias voláteis, entre álcoois, aldeídos, cetonas e ésteres, contribuem para o aroma, sendo elas derivadas principalmente de aminoácidos, ácidos graxos e carotenóides. O hormônio etileno está intimamente relacionado com as alterações metabólicas que ocorrem no amadurecimento, inclusive na geração desses compostos voláteis, através da ativação de fatores de transcrição que regulam genes codificadores de enzimas envolvidas nesse processo. Embora se saiba bastante a respeito da bioquímica que produz compostos de aroma e o envolvimento do etileno nesse processo, pouco se sabe sobre o mecanismo de sua regulação. Além disso, o etileno não é o único regulador do amadurecimento, pois há vários indícios de que as auxinas também estão envolvidas neste processo. Embora crescente, este campo ainda encontra-se pouco explorado quando comparado aos avanços obtidos sobre o papel do etileno no amadurecimento de frutos. Os dados são ainda mais escassos no que se refere a regulação das vias de biossíntese dos compostos voláteis. Assim, este trabalho visa avaliar como a interação entre o ácido indol-3-acético (AIA), a auxina mais abundante em plantas, e o etileno influencia a produção do aroma em frutos de tomateiro. Para tal, tomates da cultivar Micro-Tom foram tratados com AIA e etileno, isoladamente e em conjunto. Os resultados mostraram que os grupos de frutos caracterizaram-se por possuir diferentes perfis de compostos voláteis. Os tratamentos com AIA e etileno+AIA ocasionaram atraso no acúmulo de compostos voláteis derivados de isoprenóides, assim como na transcrição de genes envolvidos na síntese desses compostos: *carotenoid cleavage dioxygenases* 1A e 1B (*S/CCD1A* e *S/CCD1B*). A mudança da cor verde para a vermelha e o acúmulo de licopeno também foram atrasados em resposta a estes dois tratamentos. Foram também avaliados os níveis de transcritos de genes envolvidos na síntese de voláteis derivados de ácidos graxos, sendo eles lipoxigenases (*S/LOX*), hidroperóxido liases (*S/HPL*) e álcool desidrogenases (*S/ADH*), além dos níveis da produção de etileno, e AIA na forma livre e conjugados. Os resultados mostraram-se robustos em relação aos impactos nos perfis de compostos voláteis, causados pelos mesmos tratamentos hormonais, em frutos de tomateiro da variedade Grape. Os dados sugerem que a auxina possui importante papel na formação de compostos voláteis do aroma em frutos de tomateiro, regulando de forma negativa este metabolismo. Esse efeito modulador ocorre provavelmente por meio de interações com o etileno.

Palavras-chave: amadurecimento, compostos voláteis, frutos climatéricos, hormônios vegetais.

ABSTRACT

BONATO, V. C. B. **Ethylene-auxin interaction and its influence on volatile profile during ripening of tomato (*Solanum lycopersicum*)**. 2015. 93p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Fruit ripening is a complex and genetically programmed process through the fruit acquires characteristics (sweetness and acidity, color, softening, flavor and aroma, etc.) that make it attractive to consumers. The tomato fruit (*Solanum lycopersicum*) has been widely used as a model for studies on fruit ripening due to its nutritional and economic importance and advances in the understanding of its genetics and biochemistry. A set of 20 to 30 volatile substances, including alcohols, aldehydes, ketones and esters, which were derived from amino acids, fatty acids and carotenoids, contribute to the flavor. The hormone ethylene is closely related to the metabolic changes that occur in the maturation, including the generation of these volatile compounds, through the activation of transcription factors that regulate genes encoding proteins involved in this process. Although the knowledge about the biochemistry pathways that produces flavor compounds and the involvement of ethylene have advanced, little is known about the regulation of this process. In addition, ethylene is not the unique hormone that plays this role on fruit ripening. There is a growing body of evidence indicating the involvement of auxin in the maturation. The role of other hormonal classes is still little explored when compared to progress made on the role of ethylene in fruit ripening, especially regarding the regulation of the biosynthetic pathways of volatile compounds. This study aim to assess how the interaction between the indole-3-acetic acid (IAA), the most abundant auxin in plants, and ethylene influence the production of tomato fruit aroma. To do this, fruit from tomato cultivar Micro-Tom were treated with IAA and ethylene, separately and in combination. The results showed that the fruit groups characterized by having different profiles of volatile compounds. The treatment with IAA and IAA + ethylene caused delay in accumulation of volatile compounds derived from isoprenoid, as well as in the transcription of genes involved in the synthesis of these compounds: carotenoid cleavage dioxygenases 1A and 1B (*S/CCD1A* and *S/CCD1B*). The change from green to red and the accumulation of lycopene were also delayed in response to these two treatments. We also assessed the levels of transcripts of genes involved in the synthesis of volatile compounds derived from fatty acids (lipoxygenases [*S/LOX*], hydroperoxide lyases [*S/HPL*] and alcohol dehydrogenases [*S/ADH*]), besides the levels of ethylene production, and IAA in free and conjugated form. The results were robust with respect to impacts on volatile compounds profiles, caused by the same hormone treatments in tomato variety Grape. The data suggest that auxin plays an important role in the synthesis of volatile compounds in tomato fruit, negatively regulating this metabolism. This modulating effect likely occurs through crosstalks with ethylene.

Keywords: climacteric fruits, fruit ripening, plant hormones, volatile compounds.

LISTA DE FIGURAS

Lista de figuras da seção 1(INTRODUÇÃO):

Figura 1	Representação esquemática da transição do cloroplasto à cromoplasto.	25
Figura 2	Principais precursores e vias de formação de compostos voláteis em plantas.	26
Figura 3	Possíveis precursores dos apocarotenóides e monoterpenos voláteis.	28
Figura 4	Biossíntese de compostos voláteis derivados de aminoácidos.	29
Figura 5	Via catabólica de fosfolipídios e sua relação com o amadurecimento.	30
Figura 6	Biossíntese de etileno durante o desenvolvimento e amadurecimento de tomate e os diferentes genes envolvidos no sistema 1 e 2 de produção de etileno.	32
Figura 7	Modelo de sinalização do etileno.	34
Figura 8	Sinalização de auxina mediada pela proteína <i>Transporter Inhibitor Response 1</i> (TIR1).	37
Figura 9	Modelo de interações entre etileno e auxina.	39

Lista de figuras da seção 5 (ARTIGO):

Figura 1	Efeitos de tratamentos hormonais sobre a coloração de tomates da cultivar Micro-Tom.	61
Figura 2	Perfis de variação de etileno, AIA livre e conjugados, em frutos de tomateiro da cultivar Micro-Tom em função dos tratamentos com AIA, etileno e etileno+AIA, (grupo controle = não tratado).	63
Figura 3	Análises multivariadas de compostos voláteis emitidos por frutos de tomateiro (Micro-Tom), 4 dias após tratamentos hormonais.	68
Figura 4	Análises multivariadas de compostos voláteis emitidos por frutos de tomateiro (Micro-Tom), 14 dias após tratamentos hormonais.	70
Figura 5	A) Expressões relativas de enzimas clivadoras de carotenóides (CCD's, do inglês, <i>carotenoid cleavage dioxygenases</i>), B) concentrações de carotenóides em função do tempo e C) perfil comparativo das áreas normalizadas de compostos voláteis derivados de isoprenóides, obtidas através de cromatogramas, após tratamentos hormonais em frutos de tomateiro (Micro-Tom).	72
Figura 6	Perfil comparativo das expressões relativas de enzimas envolvidas na síntese de compostos voláteis derivados de ácidos graxos em frutos de tomateiro da cultivar Micro-Tom em função dos tratamentos com AIA, etileno e etileno+AIA, (grupo controle = não tratado).	74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Descrição dos compostos voláteis emitidos por frutos de tomateiro (Micro-Tom) não tratados (C) e tratados com Etileno (E), AIA (A) e Etileno+AIA (E+A) e diferenças estatísticas dos grupos "E", "A" e "E+A" em relação a "C", quatro e quatorze dias (D4 e D14) após os tratamentos.	65
-----------------	---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1-MCP: 1-metilciclopropeno

2,4 – D: 2,4-ácido diclorofenóxiacético

AADC: *Aromatic amino acid decarboxylase*

AAH: Análise de agrupamento hierárquico

ABP1: *Auxin-Binding Protein-1*

ACC: 1-aminociclopropano-1-carboxílico

ACO: ACC oxidades

ACP: Análise de componentes principais

ACS: ACC sintases

ADH: Álcool desidrogenase

AFB: *Auxin Signaling F-Box*

AIA: Ácido-indol-3-acético

AIP: Ácido indol-3-pirúvico

ANOVA: Análise de variância

ARF: Auxin response factor

ARF: Auxin response factor

ATT: Álcool acil transferase

BHT: 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol

CAR/DVB/PDMS: carboxeno, divinilbenzeno e polidimetilsiloxano

CAS: *Chemical Abstracts Service*

CCD: *Carotenoid cleavage dioxygenase*

cDNA: DNA complementar

CP: componente principal

DMAPP: Dimetilalil difosfato

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNase: Desoxirribonuclease

EIN: *Ethylene insensitive*

ERF: *Ethylene responsive factor*

FDR: *False Discovery Rate*

FID: *Flame ionization detector*

FMO: *Flavin-containing monooxygenase*

GC-MS-SIM: *Chromatography Mass Spectrometry in the Selected Ion Monitoring*

Mode

GH3: *Gretchen Hagen 3*

h: hora

HDMF : 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona

HDMF: 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona (HDMF)

HPL: Hidroperóxidolase

IAM: Indol-3-acetamida

IAOx: Indole-3-acetaldoxima

IR: Índices de retenção

LOX: Lipoxigenase

LSD: *Least Significant Difference test*),

MG: *Mature green*

MTA: 5-metiltioadenosina

MTBSTFA: N-terc-butil(dimetilsilil)-N-(metil)-trifluoroacetamida

NR: *Never-Ripe*

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PIN: *Pin-Formed*

RE: Retículo endoplasmático

RNA: Ácido ribonucleico

SAM: S-adenosil-L-metionina

SAMS: S-adenosil-L-metionina sintase

SPME: *Solid Phase Microextraction*

TAA: *Tryptophan aminotransferase of arabidopsis*

TAR: *Tryptophan aminotransferase-related*

TIR1: *Transporter inhibitor response*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 O AMADURECIMENTO EM FRUTOS	24
1.2 ETILENO E AMADURECIMENTO	31
1.3 AUXINAS E AMADURECIMENTO	35
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
3 JUSTIFICATIVA	46
4 OBJETIVO	48
5 ARTIGO	50
Introdução	51
Materiais e métodos	53
Frutos e tratamentos	53
Cor dos frutos	54
Estimativas da produção de etileno	54
Determinação de AIA livre	55
Determinação das formas conjugadas de AIA	56
Análise de compostos voláteis	57
Análises de carotenóides	58
Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real	59
Análises estatísticas	59
Resultados	60
Parâmetros do amadurecimento e níveis hormonais	60
Variação no perfil de compostos voláteis	64
Níveis de licopeno e β -caroteno, voláteis derivados de isoprenóides e níveis de transcritos de enzimas clivadoras de carotenóides	71
Expressões relativas de enzimas envolvidas na síntese de compostos voláteis derivados de ácidos graxos	73
Discussão	75
Interações entre etileno e auxina	75
Efeitos de etileno e auxina sobre a síntese de compostos voláteis do aroma ...	76
Contraste entre os efeitos do etileno e AIA sobre a cor e síntese de compostos voláteis derivados de isoprenóides	78
Conclusão	79
Material Suplementar	80
Referências bibliográficas	91

APRESENTAÇÃO

Este trabalho visa avaliar como o ácido indol-3-acético (AIA) e o etileno influencia a produção de compostos voláteis do aroma em frutos de tomateiro. Para tal, foram realizadas análises de compostos voláteis e de níveis de transcritos de enzimas envolvidas na síntese desses metabólitos, além de estimativas da produção de etileno, análises de carotenóides e dos níveis de AIA na forma livre e conjugada, após tratamento dos frutos com etileno separadamente e em conjunto com AIA.

A dissertação está constituída em sua primeira parte de INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA e OBJETIVOS. Em seguida, as METODOLOGIAS e RESULTADOS estão apresentados em formato de artigo científico que será enviado para publicação na revista *Plant Physiology and Biochemistry* (PPB) (ISSN: 0981-9428; estrato A2), sob o título e autoria:

The plant hormone indole-3-acetic acid regulates the synthesis of aroma compounds in fruits of tomato (*Solanum lycopersicum*)

Vanessa C. B. Bonato¹, Bruna L. Gomes¹, , Carolina P. Fernandes¹, Luciano Freschi², Eduardo Purgatto ¹.

¹Department of Food and Experimental Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil; Food Research Center (FoRC/CEPID/FAPESP), São Paulo, SP, Brazil. ²Department of Botany, Institute of Biosciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil.

A revista PPB publica trabalhos em diversas áreas da fisiologia vegetal, entre as quais a bioquímica, fisiologia e genética, seja em nível molecular, subcelular, celular, órgão, planta inteira ou ambiental, tendo como principal objetivo fornecer novas perspectivas sobre assuntos capazes de estimular novas perguntas relevantes para o avanço das Ciências de Plantas. Devido à essas características, a PPB foi selecionada para submissão após os devidos ajustes em relação ao formato específico da revista e língua.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O AMADURECIMENTO EM FRUTOS

O amadurecimento é um processo geneticamente programado através do qual ocorrem alterações bioquímicas e fisiológicas com consequentes alterações no sabor, cor, aroma e textura do fruto (ALEXANDER; GRIERSON, 2002) aumentando sua palatabilidade e favorecendo a dispersão das sementes (WHITE, 2002).

As mudanças na textura, com consequente amolecimento do fruto, ocorrem devido a perda de coesão entre as células, através da atividade de enzimas que atuam sobre importantes polissacarídeos constituintes da parede celular, tais como, as pectinas que são os alvos das poligalacturonases, pectina metil-esterases e β -galactosidases, assim como as hemiceluloses degradadas pelas celulases e galactosidases (AMMUAYSIN; JONES; SERAYPHEAP, 2012). Porém, o grau de amaciamento depende do fruto, pois existem aqueles que permanecem firmes mesmo no completo amadurecimento.

O acúmulo de açúcares solúveis no fruto (principalmente de glicose, frutose e sacarose) também é um evento do amadurecimento que influencia a qualidade sensorial e ocorre de forma bastante marcada em frutos que reservam carboidratos na forma de amido (banana, kiwi, Atemóia, manga) durante o crescimento. A mobilização do amido é viabilizada por enzimas como a β -amilase que hidrolisa ligações glicosídicas da extremidade não-redutora da amilose e amilopectina, removendo unidades de maltose (SMITH; ZEEMAN; SMITH, 2005). Açúcares também podem ser acumulados por meio da gliconeogênese que usa como substratos os ácidos orgânicos (principalmente malato e citrato).

A alteração da cor durante o amadurecimento ocorre por meio da biossíntese de pigmentos, entre os quais estão as antocianinas (pertencentes à classe dos fenilpropanóides, e que conferem coloração de amarelo-pálido a azul em folhas, flores, sementes, frutos, entre outros tecidos); e os carotenóides (isoprenóides responsáveis por cores entre amarela e vermelha em flores e frutos) (TANAKA; SASAKI; OHMIYA, 2008), sendo esta última classe de pigmentos sintetizada nos plastídios e essencial para a fotossíntese dos vegetais, apresentando, ainda, importante atividade antioxidante (FURTADO; SILES; CAMPOS, 2004). No tomate, por exemplo, a cor do fruto maduro é consequência do acúmulo de β -caroteno e,

principalmente, de licopeno nos plastoglóbulos e sacos membranares dos cromoplastos, após sua diferenciação a partir dos cloroplastos, que envolve a degradação de clorofila por uma via sintética complexa (EGEA et al., 2010).

A diferenciação plastidial (cloroplasto à cromoplasto; Figura 1), além de estar relacionada a modificação da cor em vários frutos, está envolvida na formação de compostos voláteis de aroma, por fornecer os principais substratos utilizados para sua biossíntese, o que inclui os ácidos graxos e aminoácidos gerados no desmonte das estruturas membranares do cloroplasto.

Figura 1 Representação esquemática da transição do cloroplasto à cromoplasto. A figura mostra o desarranjo dos grânulos de amido (1), assim como da grana e dos tilacóides (2); a síntese de novas estruturas de membrana forma a membrana interna do plastídio (3), conduzindo à formação sacos membranosos ricos em carotenóides (4); o aumento do número e tamanho dos plastoglobulos (5); o aparecimento de cristalóides contendo carotenóides (6); e o aumento do número de saliências que emanam do envelope do plasto, chamado estromulo (7). Adaptado de Egea et al. (2010).

Os carotenóides também estão entre os principais substratos presentes nos plastídios, após a diferenciação destes à cromoplastos. Os precursores mencionados são utilizados em diferentes vias de biossíntese e dão origem a compostos voláteis de diversas classes orgânicas, entre elas álcoois, cetonas, ésteres e aldeídos (Figura 2).

Figura 2 Principais precursores e vias de formação de compostos voláteis em plantas. Adaptado de Schwab, Rikanati e Lewinsohn (2008).

Os metabólitos voláteis tem grande importância para as plantas, destacando-se seu envolvimento em respostas relacionadas à defesa e comunicação (PICHESKY; GERSHENZON, 2002). Em frutos, a produção e acúmulo desses compostos, em sua grande maioria, estão associados à dispersão de sementes por animais e insetos. Na perspectiva do consumo humano, trata-se de uma importante característica sua aceitação, pois impacta diretamente em um complexo atributo de qualidade denominado pelo termo em inglês “flavor”, (DEFILIPPI, 2009). De acordo com Smith (2012) o termo “flavor”, é o resultado de uma mistura de três sensações: odor, paladar e tato. Assim, a formação do “flavor” dos alimentos é influenciada pelo aroma, gosto, textura e temperatura do alimento, entre outras características. O termo em português com definição similar é “sabor” (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

Como mencionado anteriormente, os carotenóides são importantes substratos para a formação de compostos voláteis constituintes do aroma. Os próprios terpenóides possuem a característica de compor o perfil do aroma em vários frutos e flores, particularmente os sesquiterpenos e diterpenos, (cujas moléculas são formadas por três e quatro unidades de isopreno, respectivamente)

(BUTTERY; LING, 1993). Os terpenóides são produtos do metabolismo secundário, cuja via biossintética está relacionada com a formação de uma variedade de substâncias envolvidas em processos como a fotossíntese, crescimento e desenvolvimento vegetal. Existem duas vias de formação de terpenóides: uma ocorre no citosol (via mevalonato), onde produtos como sesquiterpenos, fitoesteróis e ubiquinona são gerados e outra, nos plastídeos (via metileritritol-4-fosfato), onde ocorre a síntese de monoterpenos, giberelinas, ácido abscísico, carotenóides, entre outros produtos (ROHMER, 2003). Em ambos os casos, unidades de isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero, dimetilalil difosfato (DMAPP), são os substratos iniciais (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). Devido à presença de duplas ligações conjugadas, os carotenóides são susceptíveis a clivagem oxidativa, tendo como produtos da reação compostos voláteis com presença de carbonila, geralmente referidos como apocarotenóides (Figura 3). As enzimas da família das dioxigenases clivadoras de carotenóides (CCDs, do inglês *carotenoid cleavage dioxygenases*) são as responsáveis por catalizar a formação da maioria desses voláteis, inclusive de monoterpenóides, como geranial e neral, ambos compostos cuja mistura é comumente conhecida como citral (ILG et al., 2014; LEWINSOHN et al., 2005).

Figura 3 Possíveis precursores dos apocarotenóides e monoterpenos voláteis. À esquerda os carotenóides e à direita seus produto de degradação. Adaptado de Lewinsohn et al. (2005).

Em relação a via de biossíntese de compostos voláteis a partir de aminoácidos, as aminotransferases e descarboxilases estão envolvidas nas etapas iniciais das reações (Figura 4). Vários compostos podem ser obtidos a partir desses substratos, como, por exemplo, aqueles encontrados em várias frutas como tomate, uva, morango e banana, e incluem os derivados de leucina (3-metilbutanal, 3-metilbutanol e ácido 3-metilbutanóico), os que possuem fenilalanina como precursor (fenilacetaldeído e 2-feniletanol) ou ainda aqueles sintetizados a partir de álcoois e ácidos por esterificação (3-metil-butil-acetato e 3-metilbutil-butanoato). Para a formação dos aldeídos, por exemplo, é necessária a remoção dos grupos carboxila e amina. O aldeído formado, assim como outros produtos da reação, podem servir de substratos para a síntese de outros compostos voláteis (Figura 2). No entanto, a sequência das etapas envolvidas não são totalmente conhecidas. Em relação aos voláteis derivados de fenilalanina, uma pequena família de descarboxilases

chamada AADC's (*aromatic amino acid decarboxylases*) foi detectada em frutos de tomateiro (*LeAADC1A*, *LeAADC1B*, e *LeAADC2*) e está envolvida nas primeiras etapas da formação desses compostos (TIEMAN et al., 2006).

Figura 4 Biossíntese de compostos voláteis derivados de aminoácidos. O catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada leva à formação de compostos metil ramificados constituintes do aroma. A formação de aldeído a partir de aminoácidos requer a remoção de ambos os grupos carboxila e amina, porém, as sequências das reações não são totalmente conhecidas. Os aldeídos também podem ser formados diretamente por intermédio da enzima aldeído sintase. Adaptado de Schwab, Rikanati e Lewinsohn (2008).

Os voláteis derivados de ácidos graxos são sintetizados nos plastídios e possuem como precursores, principalmente, os ácidos linoleico e linolênico (SCHWAB; SCHREIER, 2002). Estes ácidos graxos são os mais abundantemente encontrados em vegetais, podendo ser armazenados na forma de triglicerídeos e fosfolipídios em biomembranas. A degradação de triglicerídeos e fosfolipídios pode ocorrer pela ação de triacilglicerol lipases e fosfolipase D, respectivamente, liberando ácidos graxos que, por sua vez, podem sofrer a ação da enzima 3-cetoacil-CoA-tiolase na via de β -oxidação e formar acil-CoAs (importantes precursores de várias vias metabólicas) (PALIYATH et al., 2008).

Na via da lipoxigenase (Figura 5), uma das principais vias de formação de voláteis no tomate, os ácidos graxos são convertidos a aldeídos, álcoois e ésteres, principalmente. Estes compostos compõem o sabor de vários frutos. O cis-3-hexenal, cis-2-pentenol e trans-2-heptenal, por exemplo, são encontrados no tomate em níveis significativos (KLEE; GIOVANNONI, 2011). Para citar outro exemplo, em

maças também são encontrados vários compostos voláteis derivados do mesmo substrato, como o hexanal e o trans-2-hexenal (DIXON; HEWETT, 2000).

Figura 05 Via catabólica de fosfolipídios e sua relação com o amadurecimento. Através da ligação com o receptor, o etileno induz vários genes, incluindo os que codificam enzimas envolvidas na formação de compostos voláteis derivados da degradação de ácidos graxos. A degradação de triglicerídeos e fosfolipídeos, via fosfolipase D, libera ácidos graxos que são convertidos a hidroperóxidos pelas lipoxigenases (LOXs). Em seguida as hidroperóxido liases (HPLs) convertem os produtos da oxigenação em aldeídos e ácidos graxos de cadeia curta. Os aldeídos formados são convertidos a álcoois através da ação de álcool desidrogenases (ADHs) e o álcool, por sua vez, pode juntamente com o grupo ácido de diversas acil-CoAs originar ésteres voláteis. Nesta última etapa da reação, o grupo acil é transferido para o álcool através da ação de álcool acil transferases (ATTs). Adaptado de Paliyath et al. (2008).

As substâncias voláteis também podem ser derivadas diretamente de carboidratos, como é o caso de algumas furanonas e piranonas que, embora gerem um número limitado desses produtos (BOOD; ZABETAKIS, 2002), estão presentes em quantidades apreciáveis em alguns frutos como o tomate e o morango (KLEIN et al., 2007).

Frutos de tomateiro são utilizados largamente como modelo de estudos sobre amadurecimento devido a sua simples genética diploide, pequeno genoma, facilidade na hibridação e na propagação das sementes, curto período de desenvolvimento, genótipo de genes mutantes bem definidos, além de possuir importância mundial devido às suas propriedades nutricionais e seu alto consumo *per capita* (MOORE et al., 2002). Ele é um dos frutos mais consumidos no mundo e

suas propriedades nutricionais estão intimamente relacionadas com a redução do risco de doenças crônicas degenerativas, especialmente em relação à propriedade antioxidante (PINELA et al., 2012). Apenas de 20 à 30 substâncias voláteis definem o aroma deste fruto (KLEE; GIOVANNONI, 2011), embora uma grande variedade, somando mais de 400 compostos, já tenham sido detectados. Todos estes responderiam por nuances de notas aromáticas responsáveis por diferenças sutis entre variedades, sejam elas silvestres ou cultivadas. Dentre os compostos que definem o aroma, o cis-3-hexenal é considerado o mais importante por possuir uma das maiores concentração e um baixo limiar de odor, aproximadamente 0,25 ppb (concentração mínima pela qual um composto é perceptível ao olfato humano) (BALDWIN et al., 2000). A detecção de baixos níveis não indica que o composto tenha baixo impacto sobre o aroma. Um exemplo é a β -ionona, composto derivado da clivagem de β -caroteno. Este apocarotenóide é o segundo mais impactante no tomate e está presente em uma das mais baixas concentrações no fruto. Em contrapartida, possui um dos menores limiares de odor, estimado em cerca de 35 vezes menor que o limiar do cis-3-hexenal (BALDWIN et al., 2000).

Dadas às características citadas, o tomate tem sido largamente utilizado nos estudos acerca dos mecanismos de controle da formação de compostos voláteis do aroma. Os genes e fatores que regulam as vias bioquímicas de formação desses compostos, principalmente durante o amadurecimento, ainda são pouco conhecidos. No entanto, sabe-se de longa data que o hormônio etileno possui uma íntima relação com os eventos relacionados com este processo.

1.2 ETILENO E AMADURECIMENTO

O etileno é um fitormônio envolvido na modulação de vários processos nos vegetais, como germinação de sementes, abscisão de órgãos, senescência de flores e frutos, respostas a estresse biótico (infecções de patógenos) e abiótico (lesões mecânicas, estresse hídrico, entre outros) e amadurecimento de frutos (COLLI; PURGATTO, 2008). Frutos climatéricos e não climatéricos exibem mecanismos diferentes de amadurecimento. Em frutos do grupo climatérico, entre os quais o tomate, maçã e banana, ocorre o aumento da taxa de respiração, acompanhada pelo aumento na taxa de síntese do etileno durante o amadurecimento. Em frutos não-climatéricos isto não ocorre (WHITE, 2002), sendo

observada a manutenção ou mesmo um leve decréscimo, tanto da respiração como da produção de etileno.

Em frutos climatéricos existem dois sistemas de regulação de síntese do etileno (Figura 6, modelo em tomate). O sistema 1 (etileno auto-inibitório) é responsável pelo nível basal do hormônio e é encontrado tanto em frutos climatéricos como em não-climatéricos. Já o sistema 2 ocorre quando a produção de etileno é auto catalítica, e está presente em frutos climatéricos, durante seu amadurecimento e senescência (NAKATSUKA et al., 1998). Nesses frutos, a transição do sistema 1 para o sistema 2 é regulada pela expressão diferencial de genes que codificam isoformas de aminociclopropano carboxilato (ACC) sintases (ACS) e ACC oxidades (ACO) (KUMAR; KHURANA; SHARMA, 2014).

Figura 6 Biossíntese de etileno durante o desenvolvimento e amadurecimento de tomate e os diferentes genes envolvidos no sistema 1 e 2 de produção de etileno. Embora varie no número de isoformas de ACS e ACO, a existência dos dois sistemas é considerada comum a maioria dos frutos climatéricos. SAM=S-adenosil-L-metionina; SAMS=SAM sintase; ACC=1-aminociclopropano-1-carboxílico; ACS=ACC sintase; ACO= ACC oxidase; MTA=5-metiloadenosina. Adaptado de Kumar, Khurana e Sharma (2014).

O etileno é percebido nos tecidos através de uma família de receptores que, no amadurecimento, são diferencialmente expressos. No tomate foram identificados seis receptores (*LeETR* 1 ao 6), que são expressos nos diferentes estágios de desenvolvimento e nos diversos órgãos da planta, levando, por consequência, ao estabelecimento de diferentes níveis de sensibilidade ao hormônio (BARRY; GIOVANNI, 2007). Os receptores estão localizados na membrana do retículo endoplasmático (RE) e possuem um domínio de ligação do etileno na região C-terminal (BINDER, 2008) e um domínio sensor, onde se encontra o íon cobre, que é imprescindível para que a ligação do hormônio ocorra adequadamente (RODRIGUEZ et al., 1999).

O modelo aceito para a sinalização do etileno (Figura 7) propõe que na ausência do hormônio os receptores inibem a transdução do sinal e, consequentemente, as respostas ao etileno. Na presença do hormônio, os receptores são desativados e os elementos seguintes na cascata de sinalização tornam-se ativos, levando a mudanças nos padrões de expressão de genes etileno responsivos. Este modelo indica que quanto maior o número de receptores, menor a sensibilidade dos tecidos ao hormônio e vice-versa. Trabalhos anteriores verificaram que os níveis das proteínas dos receptores diminuem no início do amadurecimento, estágio em que ocorre o aumento na produção de etileno e os tecidos estão sensíveis ao hormônio, porém os níveis de RNAm, que codificam essas proteínas, aumentam. Essa aparente divergência seria parte de um mecanismo pelo qual a ligação do etileno induz a degradação dos próprios receptores, possibilitando a transdução do sinal que leva, dentre várias consequências, à síntese de mais receptores (KEVANY et al., 2007). Assim, o sistema passaria por um aumento na sensibilidade ao hormônio, iniciando o climatério, disparo das respostas do amadurecimento e aparente volta ao nível de sensibilidade anterior ao climatério.

Figura 7 Modelo de sinalização do etileno: Na ausência do hormônio (A), a proteína CTR1 encontra-se acoplada ao receptor de etileno (na figura, representado pelo *SlETR3*) localizado na membrana do retículo endoplasmático (RE). O conjunto forma um complexo ativo que fosforila a porção C-terminal da proteína *Ethylene Insensitive 2* (EIN2), também localizada na membrana do RE, inibindo a migração desta porção para o núcleo. Desta forma, a sinalização do etileno encontra-se inibida. Na ausência do etileno, as proteínas F-box ETP1/2 marcam EIN2 para a degradação pelo sistema ubiquitina/proteossomo 26S. A ligação do etileno (B) ao receptor provoca uma alteração conformacional neste que leva ao desacoplamento da proteína CTR1 e, por consequência, a cessação da fosforilação da porção C-terminal de EIN2. Esta migra para o núcleo onde irá ativar as proteínas *Ethylene Insensitive 3* (EIN3) e *EIN3-like* (EIL). Estes mecanismos de migração e interação das proteínas ainda são desconhecidos. As proteínas EIN3/EILs também são marcadas por proteínas F-box (EBF1/2), na ausência de etileno, e são direcionadas a degradação. Os fatores EIN3/EILs ligam-se aos *Primary Ethylene Response Elements* (PERE), localizados nas regiões promotoras dos fatores de resposta a etileno (ERFs, do inglês *Ethylene Responsive Factors*) e promovem sua transcrição. Após a tradução, estes ERFs ligam-se nas regiões "GCC-box" dos genes responsivos a etileno (ex. fitoeno sintase, poligalacturonase, E8, etc.) promovendo sua transcrição e, por consequência, as respostas ao hormônio. Adaptado de Ju et al. (2012).

Dentre as respostas relacionadas ao amadurecimento, envolvendo o metabolismo de voláteis, as enzimas lipoxigenases (LOXs), hidroperóxido liases (HPLs), álcool desidrogenases (ADHs) e álcool acil transferases, são induzidas após o aumento dos níveis de etileno (DIXON; HEWETT, 2000) e em seguida são observados aumento na produção de aldeídos, álcoois e ésteres voláteis de seis carbonos (C₆-voláteis). Além das enzimas da via da LOX, as CCD's (*Carotenoid Cleavage Dioxygenases*) clivam carotenóides e formam os apocarotenóides (ILG et al., 2014), assim como uma família de descaboxilases, conhecida com AADC's (*Aromatic Amino Acid Decarboxylases*), degradam aminoácidos, dentre os quais a fenilalanina, gerando compostos voláteis como produtos da reação (TIEMAN et al., 2006). Essas são algumas das evidências de que o etileno está intimamente relacionado com alterações na biossíntese de compostos do aroma no amadurecimento.

No entanto, o etileno não é o único regulador dos eventos que ocorrem no amadurecimento pois há vários indícios de que outros hormônios também estão envolvidos neste processo. As auxinas, ácido abscísico e ácido jasmônico vem sendo propostos como necessários para uma regulação mais fina dos eventos neste estágio de desenvolvimento, e é provável que o modo através do qual essa regulação seja por meio de interações entre estes diferentes hormônios (KUMAR; KHURANA; SHARMA, 2014).

1.3 AUXINAS E AMADURECIMENTO

O ácido-indol-3-acético (AIA) é um hormônio da classe das auxinas, que influencia diversos aspectos do desenvolvimento e crescimento vegetal, entre eles a divisão celular, expansão e alongamento celular, diferenciação celular, abscisão foliar, desenvolvimento do eixo caulinar, formações dos primórdios foliares e filotaxia, formação do gancho apical, desenvolvimento de flores e frutos (através da indução da produção de etileno) e desenvolvimento radicular (KERBAUY, 2008).

As sementes são provavelmente o local de síntese *de novo* desse hormônio durante o desenvolvimento dos frutos, no entanto, as informações sobre as vias e os genes envolvidos não são totalmente conhecidos e quanto a biossíntese no fruto, nos tecidos que rodeiam as sementes, as informações são ainda mais escassas. Recentes estudos em *Arabidopsis thaliana* sugerem que a rota predominante parte

do aminoácido triptofano, o qual é convertido a ácido indol-3-pirúvico (AIP) pelas enzimas *Tryptophan Aminotransferase of Arabidopsis / Tryptophan Aminotransferase-Related* (TAA/TAR) seguida da formação de AIA catalisada pelas enzimas *Flavin-Containing Monooxygenases* (FMOs) usando o AIP como substrato. Em tomates, alguns genes que codificam enzimas destas famílias estão presentes nas sementes, como o *SITAR2* e *toFZY6*, pertencentes às famílias TAA/TAR e FMOs, respectivamente. No pericarpo de tomates também foram encontrados genes desta mesma família, como o *toFZY4* (PATTISON; CSUKASI; CATALÁ, 2014).

Além desta via, há outras também dependentes do mesmo aminoácido, sendo elas a via da indol-3-acetamida (IAM), a via da triptamina e a via da indole-3-acetaldoxima (IAOx) (WOODWARD; BARTEL, 2005).

Na rota independente de triptofano, o precursor do aminoácido (antralinato) é usado como substrato para a síntese da auxina (TROMAS; PERROT-RECHENMANN, 2010). Uma vez sintetizado, o hormônio é transportado através dos tecidos vegetais, sendo o mecanismo de distribuição essencial para o controle temporal e espacial da resposta auxínica. A direção do transporte através dos tecidos é em grande parte controlado por uma família de proteínas que facilitam o influxo e efluxo deste hormônio, as AUX/LAX e *Pin-Formed* (PIN), respectivamente (PETRÁSEK; FRIML, 2009).

A sinalização de AIA resulta da interação desse hormônio com um complexo constituído de um receptor pertencente à família *Transporter Inhibitor Response 1* (TIR1) ou a *Auxin Signaling F-Box* (AFB) e um membro da família de proteínas repressoras transcricionais Aux/AIA que são proteínas de resposta primária à auxina (Figura 8). Também foi aventada a possibilidade da sinalização através da proteína membrana *Auxin-Binding Protein-1* (ABP1) (HESSE et al., 1989), embora esta ainda esteja pouco clara em relação ao mecanismo pelo qual opera e os genes sob sua influência.

Figura 8 Sinalização de auxina mediada pela proteína *Transporter Inhibitor Response 1* (TIR1): na ausência de auxina as proteínas repressoras Aux/AIA ligam-se a ativadores transcricionais ARF (*Auxin Response Factor*) e com isso inibem a transcrição dos genes induzidos pelo hormônio (1). Através da interação de AIA com o receptor TIR1 de um complexo SCF, estes passam ao estado ativado e promovem a ubiquitinação das proteínas Aux/AIA (2), que por sua vez, são degradadas pelo proteossomo 26S (3) possibilitando que os fatores de transcrição ARF se liguem aos elementos de resposta à auxina (AuxRE) e estimulem ou inibam a transcrição dos genes auxina-responsivos (4). Adaptado de Teale, Paponov e Palme (2006).

Além da biossíntese e transporte de AIA, os mecanismos de conjugação e degradação mantêm as quantidades de AIA livre, a forma ativa biologicamente, em níveis ótimos, dependendo do tecido e estágio de desenvolvimento. Dois grupos de conjugados foram encontrados em várias espécies de plantas, sendo eles: (1) do tipo éster, em que o grupo carboxila do AIA está ligado através de ligações covalentes à hidroxila de açúcares (por exemplo, glicose) ou poli-álcoois cíclicos (como o inositol), formando um éster; e (2) do tipo amida, em que o grupo carboxila do AIA forma uma ligação amida com aminoácidos ou polipeptídeos. Uma das principais formas de conjugação do tipo amida envolve o ácido aspártico. Este conjugado, em particular, pode ser catabolizado pela via não descarboxilativa de degradação de auxinas, na qual o AIA-aspartato sofre oxidações seguidas de

glicosilação e geração de um 3-O-glicosídeo de OxIAA-aspartato. Este tipo de catabolismo pode também ocorrer com a forma livre, assim como o catabolismo envolvendo descarboxilação, no qual ocorre a modificação do anel indol e da cadeia lateral através de uma complexa reação que envolve peroxidases (LJUNG et al., 2002).

A conjugação de AIA com aminoácidos é catalisada pela família *Gretchen Hagen 3* (GH3) de amido sintetases (uma família de proteínas de resposta primária à auxina) (STASWICK et al., 2005), sendo que a expressão dos genes que codificam estas proteína tem sido associadas com o amadurecimento em vários frutos, possibilitando menor atividade de auxina neste estágio do desenvolvimento (PATTISON et al., 2014). Os níveis diminuídos da forma ativa da auxina parecem ser necessários para o desenvolvimento normal do amadurecimento, conforme indicam trabalhos com bananas (PURGATTO et al., 2001), peras (FRENKEL; DYCK, 1973), abacates (TINGWA; YOUNG, 1975), morangos (ARCHBOLD; DENNIS, 1984), entre outras frutas, face sua influência na expressão de genes que codificam enzimas relacionadas ao metabolismo de ácidos orgânicos, síntese e degradação de pigmentos e metabolismo do amido.

Evidências também indicam que as auxinas influenciam, como um fator regulador negativo, a expressão de genes envolvidos na biossíntese de compostos voláteis. A caracterização de uma enona oxidoredutase, que catalisa a formação da 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona (HDMF), composto característico do aroma de morango, indicou que esta enzima é regulada negativamente por auxina (KLEIN et al., 2007). Outro indício do envolvimento desse hormônio na regulação da biossíntese de voláteis foi observado pela inibição dos níveis transcritos de genes codificadores de isoformas de lipoxigenase (*LOX*), álcool desidrogenase (*ADH*) e uma hidroperóxido liase (*HPL*) durante o amadurecimento de pêssegos tratados com ácido naftaleno acético, uma auxina sintética (TRAINOTTI; TADIELLO; CASADORO, 2007).

Estes dados reforçam a hipótese na qual a auxina atuaria como regulador negativo durante o amadurecimento, atuando para prevenir a dispersão prematura das sementes antes do total desenvolvimento (SUNDBERG; ØSTERGAARD, 2009). Esse efeito pode estar relacionado diretamente aos genes envolvidos nos processos de amadurecimento, ou seja, genes que possuem elementos de ligação a fatores de resposta a auxinas (ARFs), impactando a via na qual participam. Existe

também a possibilidade desse hormônio atuar indiretamente, através de interações com outros hormônios, como o etileno.

Sabe-se que etileno e auxina agem sinergicamente em vários processos e antagonisticamente em outros. Essa interação (Figura 9) pode estar relacionada com as seguintes hipóteses: (I) alguns genes possuem elementos de ligação para fatores de transcrição dos dois hormônios em sua região promotora (interação primária) e/ou (II) alguns genes responsivos ao etileno controlam a expressão de outros genes que regulam a síntese, sinalização ou resposta de AIA, e vice-versa (interação secundária) (MUDAY; RAHMAN; BINDER, 2012).

Figura 9 Modelo de interações entre etileno e auxina. Adaptado de Muday, Rahman e Binder (2012).

Um exemplo de interação entre AIA e etileno é o acúmulo, durante o amadurecimento de tomates, do transcrito de um gene da família Aux/AIA, cuja proteína reprime genes de resposta à auxina, cuja indução é etileno-dependente (CHAABOUNI et al., 2009). Outro exemplo foi descrito por KUMAR et al. (2012) que reportou a indução de um membro da família GH3, envolvido na conjugação de auxina, após o tratamento exógeno de etileno em frutos de tomateiro.

Existe também a possibilidade da auxina influenciar indiretamente o amadurecimento através da alteração do conjunto de receptores de etileno expressos no tecido em amadurecimento, tendo como consequência perturbações nos diversos metabolismos influenciados pelo etileno, como na degradação de amido e acúmulo de sacarose, conforme descrito por Foresto (2012). Através da aplicação de AIA em fatias de bananas, foi observado o atraso na degradação de amido e o evento foi temporalmente relacionado a alterações induzidas pela auxina na expressão do receptor MaETR1.

Em suma, várias evidências sugerem que a interação entre etileno e auxina deva regular vários processos do amadurecimento de frutos, incluindo os vários metabolismos relacionados a formação de compostos voláteis. Porém há poucos detalhes sobre quais são os passos destas vias afetados pelos hormônios.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, Lucille; GRIERSON, Don. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 377, p. 2039-2055, 2002.

ARCHBOLD, D. D.; DENNIS JR, F. G. Quantification of free ABA and free and conjugated IAA in strawberry achene and receptacle tissue during fruit development. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 1984.

AMNUAYSIN, Nuankamol; JONES, Michelle L.; SERAYPHEAP, Kanogwan. Changes in activities and gene expression of enzymes associated with cell wall modification in peels of hot water treated bananas. **Scientia Horticulturae**, v. 142, p. 98-104, 2012.

BALDWIN, Elizabeth A. et al. Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. **HortScience**, v. 35, n. 6, p. 1013-1021, 2000.

BARRY, Cornelius S.; GIOVANNONI, James J. Ethylene and fruit ripening. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 26, n. 2, p. 143-159, 2007.

BINDER, Brad M. The ethylene receptors: complex perception for a simple gas. **Plant science**, v. 175, n. 1, p. 8-17, 2008.

BOOD, K. G. et al. The biosynthesis of strawberry flavor (II): Biosynthetic and molecular biology studies. **JOURNAL OF FOOD SCIENCE-CHICAGO-**, v. 67, n. 1, p. 2-9, 2002.

BUTTERY, Ron G.; LING, Louisa C. Volatile compounds of tomato fruit and plant parts: relationship and biogenesis. In: **ACS symposium series (USA)**. 1993.

CHAABOUNI, Salma et al. SI-IAA3, a tomato Aux/IAA at the crossroads of auxin and ethylene signalling involved in differential growth. **Journal of experimental botany**, v. 60, n. 4, p. 1349-1362, 2009.

COLLI, S., PURGATTO, E. Fisiologia vegetal (KERBAUY, G. B., 2ed.) Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, p. 271-295, 2008.

CROTEAU, Rodney; KUTCHAN, Toni M.; LEWIS, Norman G. Natural products (secondary metabolites). **Biochemistry and molecular biology of plants**, v. 24, p. 1250-1319, 2000.

DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L.; FENNEMA, Owen R. **Química de alimentos de Fennema**. Artmed, 2010. pp 900.

DEFILIPPI, Bruno G. et al. Aroma volatiles: biosynthesis and mechanisms of modulation during fruit ripening. **Advances in botanical research**, v. 50, p. 1-37, 2009.

DIXON, Jonathan; HEWETT, Errol W. Factors affecting apple aroma/flavour volatile concentration: a review. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 28, n. 3, p. 155-173, 2000.

EGEA, Isabel et al. Chromoplast differentiation: current status and perspectives. **Plant and Cell Physiology**, v. 51, n. 10, p. 1601-1611, 2010.

FORESTO, M. F. Influência da aplicação de ácido indol-3-acético na expressão dos receptores de etileno e na atividade de duas enzimas relacionadas ao metabolismo de amido em bananas. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

FRENKEL, Chaim; DYCK, Raymond. Auxin inhibition of ripening in Bartlett pears. **Plant Physiology**, v. 51, n. 1, p. 6-9, 1973.

FURTADO, Jeremy D.; SILES, Xinia; CAMPOS, Hannia. Carotenoid concentrations in vegetables and fruits common to the Costa Rican diet. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 55, n. 2, p. 101-113, 2004.

HESSE, T. et al. Molecular cloning and structural analysis of a gene from Zea mays (L.) coding for a putative receptor for the plant hormone auxin. **The EMBO journal**, v. 8, n. 9, p. 2453, 1989.

ILG, Andrea et al. Tomato carotenoid cleavage dioxygenases 1A and 1B: Relaxed double bond specificity leads to a plenitude of dialdehydes, mono-apocarotenoids and isoprenoid volatiles. **FEBS open bio**, v. 4, p. 584-593, 2014.

JU, Chuanli et al. CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 47, p. 19486-19491, 2012.

KERBAUY, G .B. **Fisiologia Vegetal**, 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 182-211.

KEVANY, Brian M. et al. Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. **The Plant Journal**, v. 51, n. 3, p. 458-467, 2007.

KLEE, Harry J.; GIOVANNONI, James J. Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. **Annual review of genetics**, v. 45, p. 41-59, 2011.

KLEIN, Dorothee et al. Functional characterization of enone oxidoreductases from strawberry and tomato fruit. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 16, p. 6705-6711, 2007.

KUMAR, Rahul et al. Genome-wide investigation and expression analysis suggest diverse roles of auxin-responsive GH3 genes during development and response to different stimuli in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Molecular Genetics and Genomics**, v. 287, n. 3, p. 221-235, 2012.

KUMAR, Rahul; KHURANA, Ashima; SHARMA, Arun K. Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 16, p. 4561-4575, 2014.

LEWINSOHN, Efraim et al. Carotenoid pigmentation affects the volatile composition of tomato and watermelon fruits, as revealed by comparative genetic analyses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 3142-3148, 2005.

LJUNG, Karin et al. Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in Arabidopsis thaliana. In: **Auxin Molecular Biology**. Springer Netherlands, 2002. p. 249-272.

MOORE, Shanna et al. Use of genomics tools to isolate key ripening genes and analyse

fruit maturation in tomato. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 377, p. 2023-2030, 2002.

MUDAY, Gloria K.; RAHMAN, Abidur; BINDER, Brad M. Auxin and ethylene: collaborators or competitors?. **Trends in plant science**, v. 17, n. 4, p. 181-195, 2012.

NAKATSUKA, Akira et al. Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. **Plant Physiology**, v. 118, n. 4, p. 1295-1305, 1998.

PALIYATH, Gopinadhan et al. **Postharvest biology and technology of fruits, vegetables, and flowers**. John Wiley & Sons, 2009.

PATTISON, Richard J.; CSUKASI, Fabiana; CATALÁ, Carmen. Mechanisms regulating auxin action during fruit development. **Physiologia plantarum**, v. 151, n. 1, p. 62-72, 2014.

PETRÁŠEK, Jan; FRIML, Jiří. Auxin transport routes in plant development. **Development**, v. 136, n. 16, p. 2675-2688, 2009.

PICHERSKY, Eran; GERSHENZON, Jonathan. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current opinion in plant biology**, v. 5, n. 3, p. 237-243, 2002.

PINELA, José et al. Nutritional composition and antioxidant activity of four tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) farmer varieties in Northeastern Portugal homegardens. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 3, p. 829-834, 2012.

PURGATTO, Eduardo et al. Inhibition of β -amylase activity, starch degradation and sucrose formation by indole-3-acetic acid during banana ripening. **Planta**, v. 212, n. 5-6, p. 823-828, 2001.

RODRIGUEZ, Fernando I. et al. A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. **Science**, v. 283, n. 5404, p. 996-998, 1999.

ROHMER, Michel. Mevalonate-independent methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. Elucidation and distribution. **Pure and applied chemistry**, v. 75, n. 2-3, p. 375-388, 2003.

SCHWAB, Wilfried; DAVIDOVICH-RIKANATI, Rachel; LEWINSOHN, Efraim. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 712-732, 2008.

SCHWAB, W.; SCHREIER, P. Enzymic formation of flavor volatiles from lipids. **Lipid biotechnology**, p. 293-318, 2002.

SMITH, Alison M.; ZEEMAN, Samuel C.; SMITH, Steven M. Starch degradation. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 56, p. 73-98, 2005.

SMITH, Barry. Perspective: complexities of flavour. **Nature**, v. 486, n. 7403, p. S6-S6, 2012.

STASWICK, Paul E. et al. Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. **The Plant Cell**, v. 17, n. 2, p. 616-627, 2005.

SUNDBERG, Eva; ØSTERGAARD, Lars. Distinct and dynamic auxin activities during reproductive development. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 6, p. a001628, 2009.

TANAKA, Yoshikazu; SASAKI, Nobuhiro; OHMIYA, Akemi. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 733-749, 2008.

TEALE, William D.; PAPONOV, Ivan A.; PALME, Klaus. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 11, p. 847-859, 2006.

TROMAS, Alexandre; PERROT-RECHENMANN, Catherine. Recent progress in auxin biology. **Comptes rendus biologies**, v. 333, n. 4, p. 297-306, 2010.

TIEMAN, Denise et al. Tomato aromatic amino acid decarboxylases participate in synthesis of the flavor volatiles 2-phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 21, p. 8287-8292, 2006.

TINGWA, Peter O.; YOUNG, Roy E. The effect of indole-3-acetic acid and other growth regulators on the ripening of avocado fruits. **Plant Physiology**, v. 55, n. 5, p. 937-940, 1975.

TRAINOTTI, Livio; TADIELLO, Alice; CASADORO, Giorgio. The involvement of auxin in the ripening of climacteric fruits comes of age: the hormone plays a role of its own and has an intense interplay with ethylene in ripening peaches. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 12, p. 3299-3308, 2007.

WHITE, Philip J. Recent advances in fruit development and ripening: an overview. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 377, p. 1995-2000, 2002.

WOODWARD, Andrew W.; BARTEL, Bonnie. Auxin: regulation, action interaction. **Annals of botany**, v. 95, n. 5, p. 707-735, 2005.

3 JUSTIFICATIVA

O etileno desempenha um papel chave nas alterações de expressão gênica e regulação enzimática que estão na origem das alterações do amadurecimento, especialmente nos frutos climatéricos. Contudo, o papel de outras classes hormonais, como as auxinas, vem ganhando corpo dado aos avanços técnicos em análise em larga escala (por exemplo: uso de tecnologias “ômicas”) e também ao estabelecimento de novos modelos de estudo, particularmente em frutos de tomateiro (*Solanum lycopersicum*).

Há muito poucos relatos que evidenciam a auxina como um regulador das alterações na produção dos compostos voláteis em frutos durante o amadurecimento. Apesar de ser conhecida a capacidade que esta classe hormonal possui em retardar diversos processos relacionados ao amadurecimento, pouco se sabe a respeito dos mecanismos envolvidos e em qual nível o etileno é capaz de se contrapor a tais efeitos.

O quadro emergente mostra uma ação coordenada entre as diversas classes hormonais, além de outros sinais químicos (açúcares, poliaminas, etc) e fatores do desenvolvimento, coordenando as complexas mudanças fenotípicas da transição do fruto do estágio “verde” para o “maduro”. Conhecer os possíveis agentes moleculares envolvidos nestas modulações e os genes afetados por um e outro hormônio, proverá uma base de conhecimento importante para possíveis intervenções tecnológicas que visem preservar a qualidade sensorial dos frutos após a colheita.

4 OBJETIVO

Investigar a influência do ácido indol-3-acético (AIA) na produção de compostos voláteis do aroma em frutos de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) em amadurecimento, assim como, possíveis mecanismos moleculares envolvidos.

5 ARTIGO

O ácido indol-3-acético regula a síntese de compostos do aroma em frutos de tomateiro (*Solanum lycopersicum*)

Resumo

O amadurecimento é um processo complexo e geneticamente programado através do qual o fruto adquire características próprias (níveis de açúcar e acidez, cor, amaciamento, sabor e aroma, entre outras) que o torna atraente aos consumidores. Os processos bioquímicos envolvidos no amadurecimento são bem compreendidos, mas pouco se sabe sobre os mecanismos de regulação envolvidos, especialmente em relação à produção de metabólitos voláteis. Há um conjunto de evidências que indicam a participação das auxinas no amadurecimento, de forma antagônica ao etileno. Assim, este trabalho visa avaliar como a interação entre AIA e o etileno influencia a produção do aroma em frutos de tomateiro. Para tal, tomates da cultivar Micro-Tom foram tratados com ácido indol-3-acético (AIA) e etileno, isoladamente e em conjunto. Os resultados mostraram que os grupos de frutos caracterizaram-se por possuir diferentes perfis de compostos voláteis. Os tratamentos com AIA e etileno+AIA ocasionaram atraso no acúmulo de compostos voláteis derivados de isoprenóides, assim como na transcrição de genes envolvidos na síntese desses compostos: *S/CCD1A* e *S/CCD1B*. A mudança da cor verde para a vermelha e o acúmulo de licopeno também foram atrasados em resposta a estes dois tratamentos. Foram também avaliados os níveis de transcritos de genes envolvidos na síntese de voláteis derivados de ácidos graxos, sendo eles *S/LOX*, *S/HPL* e *S/ADH*, além dos níveis da produção de etileno, e análises de AIA na forma livre e conjugados. Resultados semelhantes, em relação ao impacto na produção de compostos voláteis, foram encontrados em frutos de tomateiro da variedade Grape submetidos aos mesmos tratamentos hormonais. Os dados sugerem que a auxina possui importante papel na formação de compostos voláteis do aroma em frutos de tomateiro, regulando de forma negativa este metabolismo. Esse efeito modulador ocorre provavelmente por meio de interação com elementos da sinalização de etileno.

Palavras-chave: amadurecimento, compostos voláteis, frutos climatéricos, hormônios vegetais.

Introdução

As inter-relações hormonais são cada vez mais reconhecidas como importantes não apenas para a frutificação e crescimento do fruto, nas quais as auxinas, giberilinas e citocininas parecem ser os principais envolvidos, mas também durante a maturação e amadurecimento, estágios nos quais o etileno é o principal hormônio estudado, seja quanto a mudança na coloração, na estrutura da parede celular, no metabolismo de açúcares ou na produção de compostos de aroma. Apesar do etileno ser conhecido como o hormônio regulador do amadurecimento, vários indícios apontam para outros hormônios envolvidos neste processo, tais como as auxinas, ácido abscísico e ácido jasmônico, os quais seriam necessários para uma regulação fina dos eventos deste estágio de desenvolvimento (KUMAR et al., 2014).

A diminuição da forma ativa de auxina parece ser necessária para o desenvolvimento normal do amadurecimento, conforme indicam trabalhos com bananas (PURGATTO et al., 2001), peras (FRENKEL; DYCK, 1973), abacates (TINGWA; YOUNG, 1975), morangos (ARCHBOLD; DENNIS, 1984), entre outras frutas, face sua influência na expressão de genes que codificam enzimas relacionadas ao metabolismo de ácidos orgânicos, síntese e degradação de pigmentos e metabolismo do amido. Em frutos de tomateiro, Vendrell (1985) constatou que o amadurecimento foi atrasado em resposta ao tratamento com solução aquosa do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 - D), uma auxina sintética. Semelhante a esses resultados, Cohen (1996), utilizando um sistema de crescimento de tomateiros *in vitro*, sugeriu que o processo de amadurecimento pode ser atrasado em resposta ao tratamento com o hormônio natural: ácido indol-3-acético (AIA).

Em relação a influência de auxina na formação de compostos voláteis, Klein et al. (2007) mostraram em frutos de morangueiro, que uma enona oxidoreductase, que catalisa a formação da 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona (HDMF), composto característico do aroma do fruto maduro, é regulada negativamente por AIA. Outro indício é a inibição de transcritos de genes codificadores de enzimas envolvidas na formação de aldeídos, álcoois e ésteres durante o amadurecimento de pêssegos tratados com ácido naftaleno acético, uma auxina sintética (TRAINOTTI et al.,

2007). Os exemplos citados estão entre poucos encontrados na literatura, indicando que a influência hormonal na regulação da biossíntese de voláteis é um problema ainda pouco explorado apesar da sua relevância para a qualidade de frutos.

Os compostos voláteis tem sido amplamente estudados quanto às suas funções relacionadas à defesa e comunicação entre plantas (PICHERSKY; GERSHENZON, 2002). Em frutos, a produção e acúmulo dos compostos voláteis, em sua grande maioria, estão associados a atração de dispersores de sementes (animais e insetos). Além disso, trata-se de uma importante característica de aceitação para a dieta humana, pois impacta diretamente no sabor, um complexo atributo de qualidade determinado pelo aroma, gosto, textura e temperatura do alimento, entre outras características (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

A diferenciação plastidial (cloroplasto à cromoplasto), além de estar relacionada a modificação da cor em vários frutos, está envolvida na formação de compostos voláteis de aroma, por fornecer os principais substratos utilizados para sua biossíntese o que inclui os ácidos graxos e aminoácidos gerados no desmonte das estruturas membranares do cloroplasto. Os carotenóides também são importantes substratos presentes nos plastídios principalmente após a diferenciação destes à cromoplastos. Os precursores mencionados são utilizados em diferentes vias de biossíntese e originam compostos voláteis de diversas classes orgânicas, entre elas álcool, cetona, éster e aldeído (KLEE; GIOVANNONI, 2011).

Os terpenóides, particularmente os sesquiterpenos e diterpenos, compõem o perfil do aroma em vários frutos e flores (BUTTERY; LING, 1993). Devido à presença de duplas ligações conjugadas, esses compostos são susceptíveis a clivagem oxidativa, gerando os apocarotenóides. As enzimas da família de *carotenoid cleavage dioxygenases* (CCDs) catalisam a formação da maioria desses voláteis, incluindo monoterpenóides, como geranial e neral, cuja mistura é comumente referida como citral (ILG et al., 2014; LEWINSOHN et al., 2005).

Os compostos voláteis derivados de ácidos graxos são detectados em altos níveis em frutos de tomateiro. A via de biossínteses desses componentes de aroma é bem conhecida. A degradação de triglicerídeos e fosfolipídeos via fosfolipase D libera ácidos graxos que são convertidos a aldeídos, álcoois e ésteres, sendo as enzimas lipoxigenases (LOXs), hidroperóxido liases (HPLs) e álcool desidrogenases (ADHs), as principais envolvidas nesse processo (PALIYATH et al., 2008).

Com a finalidade de investigar o papel da interação entre auxina e etileno na

síntese de compostos voláteis e sobre a expressão de genes relacionados à esses metabólitos, frutos de tomateiro no estágio *mature green* foram submetidos aos tratamentos com ácido indol-3-acético (AIA), a auxina mais abundante e de maior relevância fisiológica em plantas, e etileno gasoso isoladamente ou em conjunto com AIA.

Materiais e métodos

Frutos e tratamentos

Frutos de tomateiro foram cultivados segundo condições padrões de casa de vegetação. Aproximadamente 400 frutos, provenientes de mais de 50 plantas, foram colhidos no estágio *mature green* (MG) e foram divididos em quatro grupos de 100 frutos de acordo com os tratamentos a seguir: tratamento com injeção de solução base (sorbitol 3% em tampão MES 10 mM, pH 5,6) acrescida de 100 μ M de AIA (grupo AIA); tratamento com etileno gasoso 100 ppm durante 12h seguido da injeção da solução base (grupo etileno); tratamento com injeção de AIA 100 μ M veiculada pela solução base após a exposição ao etileno gasoso durante 12 horas (grupo etileno+AIA); tratamento com injeção da solução base (grupo controle). As injeções foram aplicadas de modo similar ao descrito por Orzaez et al. (2006) (Figura S1 – Material suplementar).

Testes preliminares foram realizados para a seleção da concentração para o tratamento com AIA e etileno, utilizando a cor dos frutos como principal parâmetro para avaliação do efeito dos hormônios. A solução base foi preparada conforme descrito previamente (SU et al., 2015). Frutos foram injetados com solução aquosa do corante azul de bromofenol com o intuito de verificar a eficiência da injeção nos diferentes tecidos (Figura S2 – Material suplementar). Após os tratamentos, os frutos foram mantidos em câmara B.O.D. a 22°C +/- 2°C com foto período de 16 horas de luz (tipo incandescente e intensidade de 110 μ mol s⁻¹ m⁻²) para 8 horas de escuro e 80% de umidade relativa. Para ensaios posteriores, 10 frutos representativos de cada grupo experimental foram retirados da B.O.D em 6 diferentes estágios de amadurecimento ao longo de 14 dias e armazenados inteiros em ultrafreezer a -80 °C após o congelamento em N₂ líquido. Para posterior análise de compostos

voláteis, cinco frutos representativas de cada condição experimental foram fatiados e congelados a -20°C em solução de NaCl 30%. O experimento foi conduzido durante 14 dias, tempo necessário para o completo amadurecimento dos frutos, usando como referência as amostras do grupo controle (Figura S3 - Material suplementar). Além das amostras representativas do 14º dia após os tratamentos, foram analisadas amostras referentes ao 1º, 2º, 4º e 10º dias após tratamentos, sendo o 4º dia correspondente ao estágio “*breaker*” nos frutos do grupo controle. Para melhor interpretação de algumas análises, houve a necessidade de avaliar “pontos intermediários”.

Cor dos frutos

Para cada grupo experimental, 5 frutos foram coletados antes dos tratamentos e também em 1, 2, 4, 10 e 14 dias após os tratamentos com o intuito de medir a cor da superfície dos mesmos. As medidas foram feitas em quadruplicata em cada fruto. A cor foi mensurada através de um colorímetro (HunterLab ColorQuest XE) e expressa em relação ao valor de matiz (Hue) calculado pela fórmula $Hue = \tan^{-1}(b/a)$, onde “b” (quantidade de amarelo e azul) e “a” (quantidade entre vermelho e verde) são valores fornecidos pelo equipamento, levando em conta o plano de cores descrito pelo método Hunter (FABI et al., 2007).

Estimativas da produção de etileno

Para cada condição experimental, 3 frascos contendo 25g de frutos cada um (8 frutos), foram vedados e após 1 hora foram retiradas 10 alíquotas dos *headspaces* desses frascos. Estas amostras foram injetadas em um cromatógrafo a gás da Hewlett-Packard modelo GC-6890 equipado com detector por ionização de chama (FID, do inglês *flame ionization detector*). A coluna utilizada foi a HP-Plot Q (30 m, D.I. 0,53 mm). As condições de injeção foram: pressão de 20 psi por 2 minutos, fluxo de ventilação de 20 mL/min após 30 segundos de injeção e temperatura do injetor em 200°C. As demais condições cromatográficas empregadas foram: corrida isotérmica a 30°C empregando hélio como gás carregador em fluxo constante de 1 mL/min; temperatura do detector em 250°C, fluxo de ar e hidrogênio no detector em 450 mL/min e 50 mL/min, respectivamente. A estimativa da

quantidade de etileno produzida pelos frutos foi feita em relação à injeção de um padrão de 0,1 µL/L de etileno em ar sintético da Air Liquid.

Determinação de AIA livre

A determinação de ácido indol-3-acético (AIA) foi realizada segundo metodologia proposta por Ludwig-Müller et al. (2008) com modificações.

Em um microtubo de 2 mL, foram adicionados aproximadamente 500 mg de amostra triturada (frutos inteiros, incluindo as sementes) em N₂ líquido, 1 mL de solução extratora contendo isopropanol e ácido acético (95:5) e 2 µg de padrão marcado de AIA [¹³C₆] (Cambridge Isotopes, Andover, MA, EUA). Em seguida, a mistura foi agitada em vórtex por aproximadamente 1 minuto e o material incubado sob agitação a 4°C por 2 horas. O homogenato resultante foi então centrifugado na mesma temperatura por 10 minutos a 13000 X g e o sobrenadante transferido para um novo microtubo. O material foi concentrado em concentrador rotacional a vácuo (*SpeedVac*) até restar cerca de 50 µL de amostra. Em seguida, foi realizado o ajuste do pH entre 2,5 e 3,5 utilizando HCl 1N. Após isso, foram adicionados 500 µL de acetato de etila ao material, seguido de agitação em vórtex e centrifugação a 13000 X g por 5 min a 4°C para separação de fases. A fase orgânica (superior) foi coletada e transferida para um novo microtubo, enquanto a fase aquosa (inferior) foi submetida a mais duas etapas de extração com acetato de etila. Após combinação das extrações das fases orgânicas, foi efetuada a secagem completa em *SpeedVac*. As amostras foram ressuspensas em 100 µL de metanol e transferidas para um *insert* de *vial* de 300 µL. Após secagem completa destas em *SpeedVac*, foi adicionado 25 µL de piridina e 25 µL de N-terc-butil(dimetilsilil)-N-(metil)-trifluoroacetamida (MTBSTFA - Sigma-Aldrich - 375934) incubando em seguida por 1 hora a 92 °C.

Para a detecção e quantificação, foi utilizado o método de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, em modo de monitoramento seletivo de íons (GC-MS-SIM, do inglês *Chromatography Mass Spectrometry in the Selected Ion Monitoring Mode*). Para isso, foi utilizado um cromatógrafo gasoso (HP-6890, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, EUA) equipado com espectrômetro de massas (HP-5973), injetor automático (ALS 7693, Agilent, Santa Clara, CA, EUA) e coluna DB-5ms (30 m x 0,25 mm x 0,50 µm). Foi injetado 1 µL de cada amostra para análise do

AIA em modo *splitless*. O fluxo de hélio foi mantido a 0,83 mL/minuto e as condições da corrida foram: 100°C por 2 minutos; 100°C a 140°C a 10°C/minuto; 140°C a 160°C a 25°C/minuto, mantendo por 1 minuto; 160°C a 250°C a 35°C/minuto, mantendo por 1 minuto; 250°C a 270°C 20 °C/minuto, mantendo por 1 minuto; 270°C a 300°C a 30°C/minuto, mantendo por 2 minutos. Foram monitorados os íons com relação massa carga (m/z) em 130 e 232 (correspondentes ao AIA endógeno) e 136 e 238 (correspondentes ao padrão interno [$^{13}\text{C}_6$]-AIA). As concentrações foram obtidas pela relação entre as áreas dos picos dos cromatogramas extraídos em m/z 232 e 238.

Determinação das formas conjugadas de AIA

A determinação das frações conjugadas foi feita por extração em fase sólida, segundo método adaptado de Chen et al. (1988).

Em tubo de centrífuga (COREX®) de 15 mL, foram adicionados 2 mL de solução extratora (65% de isopropanol em tampão imidazol 0,2 M e pH 7,0), 500 mg de amostra (frutos inteiros, incluindo as sementes) triturada em N_2 líquido e 2 μg de padrão marcado de AIA [$^{13}\text{C}_6$] (Cambridge Isotopes, Andover, MA, EUA). A mistura foi homogeneizada por 3 minutos, centrifugada a 13000 X g por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado em tubo de plástico côncavo de 15 mL. Em seguida, foi evaporado o isopropanol, que corresponde a 65% do volume. Do volume restante, 500 μL foram transferidos para tubo de vidro resistente a altas temperaturas e o remanescente permaneceu no tubo de plástico. Ao tubo de vidro, foram adicionados 500 μL de NaOH 7N, com posterior incubação por 3 horas a 100°C, sendo esta etapa correspondente à extração da fração amida. Ao tubo de plástico, por sua vez, foram adicionados 500 μL de NaOH 1N, seguido de incubação por 1 hora a temperatura ambiente, correspondendo à extração da fração éster.

As resinas utilizadas para extração foram C_{18} (Supelclean – LC – C_{18}) e NH_2 (Supelclean – LC – NH_2). Cartuchos de 5 mL foram preenchidos com 500 mg de ambas as resinas. Antes da eluição das amostras, foi realizado o pré-condicionamento das colunas resultantes. Para a C_{18} , utilizaram-se nesta ordem: 5 mL de hexano, 5 mL de metanol, 5 mL de água Milli-Q, 5 mL de ácido acético 1%. Para a NH_2 : 2 mL de hexano, 2 mL de acetonitrila, 2 mL de água Milli-Q (2 vezes), 2 mL de tampão imidazol 0,2 M (pH 7,0) e 10 mL de água Milli-Q.

Antes de iniciar as eluições, o pH de todas as amostras, tanto das frações éster quanto das frações amida, foi ajustado para 2,5. As amostras passaram primeiramente pela coluna C₁₈, com posterior lavagem desta com água Milli-Q. Após isso, foram eluídos 2 mL de acetonitrila, coletando o extrato em tubos de plástico de 15 mL. Este extrato foi diluído utilizando 18 mL de tampão imidazol 0,02 M (pH 7,0) e, em seguida, foi vertido na coluna NH₂. Após isso, foram realizadas lavagens com 2 mL de hexano, 2 mL de acetato de etila, 2 mL de acetonitrila e 2 mL de metanol, nesta ordem. Finalmente, foram eluídos 3 mL de ácido acético 2% em metanol e coletados em tubos de plástico. Os extratos foram evaporados completamente em *SpeedVac* e ressuspensos em 100 µL de metanol.

Para a derivatização, as amostras foram transferidas para *vials*. Nestes, foram adicionados 100 µL de trimetilsilil diazometano (362832 – Sigma-Aldrich), seguido de incubação a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram secas em fluxo de nitrogênio, ressuspensas com acetato de etila e transferidas para *inserts* específicos para injeção no cromatógrafo.

A detecção e quantificação foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, em modo de monitoramento seletivo de íons (GC-MS-SIM). Utilizou-se cromatógrafo gasoso (HP-6890, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, EUA) equipado com espectrômetro de massas (HP-5973), injetor automático (ALS 7693, Agilent, Santa Clara, CA, EUA) e coluna HP 1701 (30 m x 0,25 mm x 0,50 µm). Foi injetado 1 µL de cada amostra para análise do AIA em modo *splitless* e o fluxo de hélio foi mantido a 1 mL/minuto. As condições da corrida foram: 150°C por 3 minutos; 150°C a 200°C a 4°C/minuto; 200°C a 300°C a 10°C/minuto. Foram monitorados os íons com relação massa carga (m/z) em 130 e 189 (correspondentes à AIA endógeno) e 136 e 195 (correspondentes ao padrão interno [¹³C₆]-AIA). As concentrações endógenas de AIA foram obtidas pela relação entre as áreas dos picos no cromatogramas extraídos em m/z 130 e 136.

Análise de compostos voláteis

As análises dos compostos voláteis foram realizadas em triplicata, utilizando o método de micro-extração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Microextraction*), de acordo com o método descrito por Pesis et al. (2009). A análise empregou uma resina de carboxeno, divinilbenzeno e polidimetilsiloxano de 100µm

de espessura da Supelco® (CAR/DVB/PDMS).

Aproximadamente 3g de frutos, provenientes de uma mistura de cinco frutos inteiros (incluindo as sementes), foram finamente fatiados com lâmina de aço inox e, em seguida, acrescidos de 7 mL de solução de NaCl a 30% (p/v) em *vials* de 20mL, com tampa de septo de silicone, que foram congelados a -20°C para análise posterior. O material foi descongelado a 40°C em banho-maria com agitação intensa a 600 rpm através de barra magnética. Os voláteis foram acumulados por 10 minutos no *headspace* do *vial*, onde a fibra de SPME foi introduzida por mais 50 minutos. Uma vez capturados, os compostos voláteis foram dessorvidos da fibra pela exposição ao calor do injetor do cromatógrafo (200°C) por 3 minutos. Foi utilizado o cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 6890 acoplado a um detector seletivo de massas da mesma empresa, modelo 5973. A coluna cromatográfica empregada foi a Supelcowax 10 (30 m, 0,25 mm de diam. interno, 0,25 µm de espessura do filme). O programa de temperatura utilizado foi: rampa de temperatura de 2°C/min de 40°C à 150°C. A temperatura da interface entre o cromatógrafo e o detector seletivo de massas foi de 230°C e a ionização foi feita por impacto de elétrons (70 eV) com a fonte de íons mantida a 150°C.

Testes preliminares foram feitos com diferentes quantidades de amostra (2 ou 3g), concentrações da solução de NaCl (10, 20 ou 30%), tempos de equilíbrio entre a amostra e os voláteis no *headspace* do *vial* (10 ou 15 minutos), temperaturas de aquecimento (30 ou 40°C), e tempos de exposição da fibra no *headspace* (30 ou 50 minutos). O critério utilizado para avaliação desses parâmetros foi baseada na qualidade dos cromatogramas gerados, considerando o número, tamanho e área dos picos. Dessa forma, foi possível determinar as melhores condições para o ensaio. As análises foram realizadas em triplicata para cada uma das amostras. Os espectros de massas obtidos foram comparados com os da biblioteca NIST versão 1.6 e considerados apenas aqueles com índice de similaridade acima de 70%.

Análises de carotenóides

Para análises de carotenóides, frutos inteiros (incluindo as sementes) foram moídos em nitrogênio líquido até formarem um pó e em seguida submetidas a extração pelo método descrito por Sérino et al. (2009).

Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real

Partindo dos frutos (inteiros, incluindo as sementes) triturados em N₂ líquido, o RNA foi extraído através do reagente para extração de RNA em plantas PureLink™ (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida as amostras foram tratadas com DNase seguindo o kit Ambion® DNA-free™ DNase Treatment & Removal Reagents (Invitrogen). A quantidade de RNA foi calculada por espectrofotometria (SAMBROOK et al., 1989) considerando que uma amostra contendo 40 µg/mL de RNA apresenta valor de absorbância igual a 1,0 a 260 nm. Somente amostras de RNA total com razões A260/A280 entre 1,8 e 2,0 foram utilizadas na síntese do DNA complementar (cDNA), para a qual foi utilizada a reação da transcriptase reversa conforme instruções contidas no kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega).

As reações em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real foram feitas a partir dos cDNAs, utilizando primers específicos para os genes: *S/LOX*, *S/HPL*, *S/ADH*, *S/CCD1A* e *S/CCD1B*. O kit empregado foi o Power Sybr® Green PCR Master Mix da Applied Biosystems e o equipamento da mesma empresa, seguindo todas as recomendações quanto aos controles da análise descritos nos manuais. Foram utilizados os genes constitutivos *TIP41* e uma “*Expressed Protein*” como controles endógenos e a expressão relativa foi obtida de acordo com Pfaffl (2001), utilizando o cálculo $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$. Foram adotadas como referência as amostras de frutos no dia em que foram coletados (antes dos tratamentos). As sequência dos primers estão listadas em Material suplementar: Tabela S1.

Análises estatísticas

Os dados referentes às áreas dos picos dos compostos voláteis, obtidos através dos cromatogramas, foram normalizados pela média. A partir das matrizes de correlações dos dados normalizados foram feitas análises de componentes principais (ACP, *biplot*) através do software XLSTAT. Para as análises de variância (ANOVA), teste de Fisher’s LSD (do inglês, *Least Significant Difference test*), análise FDR (do inglês, *False Discovery Rate*), agrupamento hierárquico e heatmap, os dados foram transformados em escala de Log₂ após a normalização, e o software utilizado foi o MetaboAnalyst 2.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>) (XIA et al., 2012). Os

dados foram processados separadamente, por dia após tratamentos. Os métodos utilizados para a análise de agrupamento hierárquico foram: distância euclidiana e algoritmo aglomerativo de Ward (WARD, 1963).

Resultados

Parâmetros do amadurecimento e níveis hormonais

Com a finalidade de caracterizar os estágios de amadurecimento dos frutos controle (C) e dos frutos tratados com os hormônios etileno (E), AIA (A) e etileno+AIA (E+A), parâmetros típicos do amadurecimento foram avaliados 6h e 1, 2, 4, 10 e 14 dia(s) após os tratamentos (D1, D2, D4, D10 e D14, respectivamente).

Os resultados indicam que a mudança da cor verde para vermelha foi acelerada pelo tratamento “E” (Figura 1). Por outro lado, os tratamentos “A” e “E+A”, proporcionaram efeito contrário e, dentro do período analisado, a cor vermelha não foi observada. No último dia do experimento (D14), os frutos “C” já haviam atingido o completo amadurecimento (Figura 1).

Figura 1 Efeitos de tratamentos hormonais sobre a coloração de tomates da cultivar Micro-Tom. Aparência dos frutos de tomateiro (esquerda) e cor da casca dos frutos em função do tempo após tratamentos com AIA, etileno e etileno+AIA, (grupo controle = não tratado). D1, D2, D4, D10 e D14 referem-se aos dias após tratamentos. D0= antes dos tratamentos. Os pontos e as barras correspondem a média + desvio padrão (n= 5).

Os níveis de etileno foram monitorados não apenas como um parâmetro do amadurecimento, que reflete os estágios fisiológicos e está subjacente às diferenças observadas na maturação, mas também com a finalidade de avaliar a eficácia do tratamento “E”, pois o mesmo pode ser considerado um controle positivo dos experimentos. Os frutos deste grupo apresentaram a produção de etileno aproximadamente quatro vezes maior quando comparados aos frutos “C” em D1 e revelaram concentrações acentuadamente maiores entre D2 e D4. Em resposta ao tratamento “E+A”, os níveis pouco variaram ao longo dos dias avaliados. O tratamento “A”, por sua vez, causou um adiantamento do pico da produção de etileno em relação ao grupo “C” (Figura 2A).

Figura 2 Perfis de variação de etileno, AIA livre e conjugados, em frutos de tomateiro da cultivar Micro-Tom em função dos tratamentos com AIA, etileno e etileno+AIA, (grupo controle = não tratado). **A)** Perfis de produção de etileno, **B)** níveis de AIA livre, **C)** e níveis dos conjugados AIA-éster e **D)** AIA-amida, após tratamentos hormonais. D1, D2, D4, D8, D10 e D14 referem-se aos dias após tratamentos. 6h= seis horas após os tratamentos. D0= antes dos tratamentos. Barras verticais indicam desvio padrão da média ($n=3$).

Conforme o esperado, os níveis de AIA livre e conjugados foram aumentados pelo tratamento “A” e nos frutos do tratamento “E+A” também foram detectados altos níveis desse hormônio nas três formas avaliadas (Figura 2B-D). Seis horas após os tratamentos, esses dois grupos de frutos apresentaram acúmulo da forma livre de aproximadamente seis e quatro vezes maior que os frutos “C”, respectivamente e, no grupo “A”, acompanhado também de altos níveis de conjugação das duas formas avaliadas. Após 6 horas do tratamento “E”, os frutos apresentaram baixo nível de AIA livre (dez vezes menor em relação aos frutos do grupo “C”) e níveis maiores de AIA-amida quando comparados ao grupo “C”.

Variação no perfil de compostos voláteis

Com o intuito de investigar possíveis impactos sobre componentes do aroma em resposta aos diferentes tratamentos hormonais, foram realizadas análises de compostos voláteis, pela técnica de SPME. Ao todo foram detectados 22 desses metabólitos voláteis (Tabela 1), sendo cada um deles contribuintes do aroma através de notas odoríferas e limiares de odor variados. Seis dos 22 compostos possuem como precursores os isoprenóides, dois derivam diretamente de carboidratos, oito são biossintetizados na via da lipoxigenase, tendo os ácidos graxos como precursores, e seis são obtidos através da degradação de aminoácidos.

Tabeta 1 – Descrição dos compostos voláteis emitidos por frutos de tomateiro (Micro-Tom) não tratados (C) e tratados com Etileno (E), AIA (A) e Etileno+AIA (E+A) e diferenças estatísticas dos grupos “E”, “A” e “E+A” em relação a “C”, quatro e quatorze dias (D4 e D14) após os tratamentos.

Composto volátil/ CAS *1	Estrutura	IR de Kovats (calculado) *2	IR de Kovats (literatura) *3	Notas de aroma *4	Limiar de odor (ppb) *5	Precursor *6	Diferenças em relação ao Grupo Controle*7					
							D4 E	D4 A	D4 E+A	D14 E	D14 A	D14 E+A
cis-3-hexenal 004440-65-7		1157	1146	Folha verde	0,25	Ácidos gráxos	↓	↓	↓	↓	↓	↓
nonanal 000124-19-6		1388	1385	Cítrico, floral	1	Ácidos gráxos	↑	↓	↓	↓	↓	↓
trans-2-octenal 002548-87-0		1425	1442	Folha verde	3	Ácidos gráxos	↓	↑	↓	↓	↓	↓
hexanal 000066-25-1		1085	1084	Folha verde	4,5	Ácidos gráxos	↓	↓	↓	↓	↓	↓
trans-2-heptenal 018829-55-5		1321	1336	Folha verde	13	Ácidos gráxos	↓	↑	↑	↓	↓	↓
trans-2-hexenal 006728-26-3		1222	1220	Verde, frutado	17	Ácidos gráxos	↓	↓	↓	↓	↓	↓
trans,trans-2,4-hexadienal 000142-83-6		1407	1337	Cítrico, verde	10 a 60	Ácidos gráxos	↓	↓	↓	ND	ND	ND
cis-3-hexenol 000928-96-1		1381	1386	Folha verde	70	Ácidos gráxos	↓	↓	↓	↓	↓	↓
2-isobutiltiazol 018640-74-9		1393	1396	Folha verde, tomate	2 a 3,5	Aminoácidos	↑	↓	↑	↓	↓	↓
metil heptanoato 000106-73-0		1284	1288	Frutado	4	Aminoácidos	↑	↑	↑	ND	ND	ND
metil salicilato 000119-36-8		1761	1745	Mentolado	40	Aminoácidos	↓	↓	↓	↓	↓	↓
estireno 000100-42-5		1248	1241	Floral adocicado	730	Aminoácidos	↓	↓	↓	ND	ND	ND
2-etilhexanol 000104-76-7		1487	1487	Floral	270000	Aminoácidos	↓	↓	↓	ND	ND	ND
BHT (2,6-di-terc-butil-4-metilfenol) 000128-37-0		1905	NC	Cânfora	NC	Aminoácidos	ND	ND	ND	↓	↓	↓
2-pentilfurano 003777-69-3		1211	1240	Frutado	6	Carboidratos	↓	↓	↓	ND	ND	ND
2-etilfurano 003208-16-0		NC	1701	Adocicado	NC	Carboidratos	↓	↓	↓	↓	↓	↓
β-ionona 014901-07-6		1924	1912	Frutado	0,007	Isoprenóides	↑	↓	↓	↓	↓	↓
β-ciclocitral 000432-25-7		1601	1598	Herbáceo	5	Isoprenóides	↓	↓	↓	↓	↓	↓
citral 005392-40-5		1726	1602	Cítrico	32	Isoprenóides	ND	ND	ND	↓	↓	↓
geraniol acetona 000689-67-8		1850	1840	Floral, frutado	60	Isoprenóides	ND	ND	ND	↓	↓	↓
2,2,6-trimetilciclohexanona 002408-37-9		1305	NC	amadeirado	100	Isoprenóides	↓	↓	↓	↓	↓	↓
α-copaeno 3856-25-5		1475	1488	Amadeirado	NC	Isoprenóides	↓	↓	↑	ND	ND	ND

*1 Número de registro único no banco de dados do *Chemical Abstracts Service*, uma divisão da *Chemical American Society*. *2 Índices de retenção de Kovats dos respectivos compostos voláteis, calculados em relação a n-alcenos (C8 a C20) considerando a coluna Sulpecowax 10. *3 Referências: Acree e Arn (2014) e El-Sayed (2014) *4 Referências: Burdock (2010) e The Good Scents Company, 2013. *5 Referência: Leffingwell and Associates. *6 Referências: Buttery e Ling (1993) e Schwab, Davidovich-Rikanati e Lewinsohn, 2008. *7 Seta para baixo indica diminuição, seta para cima indica aumento ($FDR < 0,05$), hífen indica sem diferença estatística, em relação ao grupo de amostras controle (frutos não tratados). NC=IR não calculado ou IR / limiar de odor não encontrado na literatura. ND=composto não detectado.

A fim de identificar os voláteis constituintes do aroma, cujos níveis aumentaram ou diminuíram após a aplicação dos hormônios e que podem ser responsáveis por possíveis mudanças no aroma após os tratamentos, foram aplicadas análises estatísticas (ANOVA, FDR e Fisher's LSD). Os níveis de todos os compostos voláteis detectados em D4 possuíam diferenças estatisticamente significantes ($FDR \leq 0,05$) ao menos entre três pares de grupos experimentais, com exceção do *cis*-3-hexenol (Tabela 1 e Tabela S2 – Material suplementar). Em contraste, apenas 6 dos 16 compostos no D14 apresentaram diferenças estatísticas relevantes ($FDR \leq 0,05$), entre eles o citral, composto característico do aroma em frutos maduros, o qual apresentou níveis diminuídos em frutos dos grupos “A” e “E+A” (Tabela 1 e Tabela S3 - Material suplementar).

Os dados também foram analisados utilizando métodos estatísticos multivariados não supervisionados (Análise de Componentes Principais [ACP], Análise de Agrupamento Hierárquico [AAH] visualizada por Heatmaps) com a finalidade de avaliar, de forma global, os impactos causados pelos tratamentos hormonais em relação às composições dos metabólitos voláteis. A ACP referente ao D4 (Figura 3A) revelou que os tratamentos proporcionaram aos frutos diferentes composições e/ou abundâncias de voláteis, pois os grupos projetaram-se em regiões distintas no plano. O primeiro componente principal (CP1), que explica 48,12% do total da variabilidade, claramente separou as amostras “C” na região positiva e os demais grupos de amostras na região negativa. Nesta mesma figura é possível identificar os principais metabólitos envolvidos nessa diferenciação: 3-hexenal, 2,4-hexadienal, 2-etilhexanol e estireno, próximos à extremidade positiva do CP1, enquanto os compostos isobutiltiazol e metil heptanoato na extremidade negativa. Isso sugere que as principais diferenças, entre os frutos do grupo “C” e aqueles tratados com hormônios, foram decorrentes dos maiores níveis em “C” dos compostos projetados na extremidade positiva e menores níveis daqueles projetados na extremidade negativa do CP1. O segundo componente principal

(CP2), que explica 24,00 % do total da variabilidade, separou as amostras do grupo “E” na região positiva e as demais amostras na região negativa, sendo que os compostos nonanal e β -ionona projetaram-se na extremidade da região positiva e os compostos 2-heptenal e 2-pentilfurano na região oposta do mesmo CP, indicando que os frutos tratados com etileno diferenciaram-se dos demais principalmente pela presença de elevados níveis de nonanal e β -ionona e pelos baixos níveis acumulados dos compostos 2-heptenal e 2-pentilfurano em comparação aos demais grupos. É notável que as amostras de frutos do grupo “E+A” projetaram-se no mesmo quadrante das amostras do grupo “A”, indicando similaridade entre elas.

Figura 3 Análises multivariadas de compostos voláteis emitidos por frutos de tomateiro (Micro-Tom), 4 dias após tratamentos hormonais. **A)** Análise de Componentes Principais (*Biplot*) e **B)** Análise de Agrupamento Hierárquico e Heatmap. Em B, as cores vermelha e azul indicam altos e baixos níveis dos compostos, respectivamente. Cada símbolo é uma amostra independente. C=grupo controle, E=grupo etileno, A=grupo AIA e E+A=grupo etileno+AIA.

As tendências observadas através da análise dos componentes principais foram confirmadas através do dendograma obtido pela AAH e Heatmap (Figura 3B). Na AAH as amostras de um mesmo grupo agruparam-se, totalizando 4 agrupamentos. Uma das mais proeminentes diferenças entre os grupos envolvem compostos do agrupamento 1, cujos níveis estavam aumentados principalmente nos frutos do grupo “C” e expressivamente diminuídos em resposta aos tratamentos “A” e “E+A”. O agrupamento 2 representa compostos que não eram abundantes nos frutos do grupo “C”. Os agrupamentos 4 e 5, por sua vez, representam os voláteis que estavam mais concentrados nos frutos submetidos ao tratamento “E”, enquanto os agrupamentos 6 e 7, compostos cujos níveis eram mais acentuados nos frutos do grupo “E+A”. Não há agrupamento de voláteis que claramente se relacione com elevadas concentrações em amostras pertencentes ao tratamento “A”, indicando que este proporcionou aos frutos, baixos níveis da maioria dos metabólitos avaliados. Também semelhante à ACP, amostras dos grupos “A” e “E+A” foram separadas por uma pequena distância, sendo o motivo dessa proximidade mencionada anteriormente: níveis baixos dos compostos pertencentes ao agrupamento 1.

Contrariamente às análises de D4 (Figura 3) e D10 (Figura S4 – Material suplementar), cujos resultados mostraram uma nítida diferença entre os grupos de frutos em relação ao perfil de voláteis, no D14 as análises multivariadas refletem que todos eram semelhantes entre si, pois não se detecta uma clara segregação entre os grupos de amostras (Figura 4). No entanto, é possível observar um agrupamento (marcado com um asterisco na figura) que inclui voláteis pouco abundantes nas amostras do grupo “A”. Entre os 7 voláteis pertencentes a este agrupamento, os compostos 2-heptenal, nonanal (derivados de ácidos graxos), citral (derivado de isoprenóides) e metil salicilato (derivado de aminoácido) estavam em níveis diminuídos nas amostras do grupo “A” em relação aos outros três grupos de frutos, sendo essas diferenças estatisticamente significantes (FDR <0,05), com exceção do citral em relação ao grupo “E+A”, para os quais não houve diferenças estatísticas (Tabela S3 – Material suplementar).

Figura 4 Análises multivariadas de compostos voláteis emitidos por frutos de tomateiro (Micro-Tom), 14 dias após tratamentos hormonais. **A)** Análise de Componentes Principais (*Biplot*) e **B)** Análise de Agrupamento Hierárquico e Heatmap. Em B, as cores vermelha e azul indicam altos e baixos níveis dos compostos, respectivamente. Cada símbolo é uma amostra independente. C=grupo controle, E=grupo etileno, A=grupo AIA e E+A=grupo etileno+AIA.

Níveis de licopeno e β -caroteno, voláteis derivados de isoprenóides e níveis de transcritos de enzimas clivadoras de carotenóides

Com a finalidade de aprofundar o entendimento em relação aos efeitos dos tratamentos hormonais, foram analisados os níveis de transcritos de enzimas envolvidas na síntese de compostos voláteis derivados de isoprenóides. Em resposta ao tratamento “E”, os níveis dos transcritos das enzimas CCD1A e CCD1B aumentaram mais rapidamente quando comparado ao grupo “C”. Entre D1 e D4, os tratamentos “A” e “E+A” proporcionaram efeito contrário (Figura 5A).

Os níveis de licopeno, isoprenóide utilizado como substrato pelas enzimas CCD1's, foram induzidos em resposta ao tratamento “E” e inibidos principalmente em D10 pelos tratamentos “A” e “E+A”, quando comparados aos frutos “C”. O β -caroteno, outro substrato das mesmas enzimas, pouco variou entre os grupos experimentais (Figura 5B).

O acúmulo de um dos produtos voláteis de degradação do licopeno, o citral, ocorreu mais rapidamente nos frutos do grupo “E”, e os frutos dos grupos “A” e “E+A” apresentaram níveis menores quando comparados aos demais.

Os compostos voláteis 2,2,6-trimetilciclohexanona, β -ionona, e geranil acetona são sintetizados também pelas enzimas CCD1's; para os dois primeiros casos utilizando o β -caroteno como substrato, o qual pode também ser convertido ao monoterpeno volátil β -ciclocitral na via alternativa catalizada pelas mesmas enzimas (ILG et al., 2014; LEWINSOHN et al., 2005). Os três últimos compostos mencionados também foram induzidos pelo tratamento “E”, especialmente a β -ionona (Figura 5C). Opostamente ao tratamento “E”, o tratamento “A” e “E+A” inibiu o acúmulo de β -ionona, no entanto, os níveis foram recuperados no D10 (Figura 5C), no mesmo dia em que se detectou uma indução na expressão das enzimas CCD1's (Figura 5A). O acúmulo de 2,2,6-trimetilciclohexanona foi drasticamente atrasado em resposta ao tratamento “A”. Este efeito também ocorreu com β -ciclocitral em resposta aos tratamentos “A” e “E+A” (Figura 5C). Em relação ao α -copaeno, sesquiterpeno volátil presente no estágio *mature green* em frutos de tomateiro (BUTTERY e LING, 1993), o acúmulo foi maior nos frutos dos grupos “A” e “E+A” (Figura 5C).

Figura 5 **A)** Expressões relativas de enzimas clivadoras de carotenóides (*CCD's*, do inglês, *carotenoid cleavage dioxygenases*), **B)** concentrações de carotenóides em função do tempo e **C)** perfil comparativo das áreas normalizadas de compostos voláteis derivados de isoprenóides, obtidas através de cromatogramas, após tratamentos hormonais em frutos de tomateiro (Micro-Tom). D1, D2, D4, D10 e D14 referem-se aos dias após tratamentos. D0= antes dos tratamentos. MF=massa fresca. Barras verticais indicam erro padrão da média (n=9) na figura A e n=3 na figura B e C.

Expressões relativas de enzimas envolvidas na síntese de compostos voláteis derivados de ácidos graxos

Compostos aldeídicos são conhecidamente abundantes em frutos de tomateiro e são biossintetizados através da atividade catalítica de duas principais enzimas: LOXC e HPL. O tratamento “E” induziu a expressão de LOXC principalmente em D4, no mesmo dia em que o tratamento “A” ocasionou efeito contrário, enquanto o tratamento combinado com os dois hormônios resultou em um nível intermediário, alcançando níveis similares aos frutos “C” (Figura 6). Ainda em relação aos efeitos causados pelo tratamento “E+A”, os níveis em relação ao transcrito de HPL eram intermediários (entre D1 e D14) em comparação aos níveis dos frutos tratados com os hormônios separadamente.

Figura 6 Perfil comparativo das expressões relativas de enzimas envolvidas na síntese de compostos voláteis derivados de ácidos graxos em frutos de tomateiro da cultivar Micro-Tom em função dos tratamentos com AIA, etileno e etileno+AIA, (grupo controle = não tratado). *LOX* = lipoxigenase, *HPL* = hidroperóxido liase, *ADH* = álcool desidrogenase. D1, D2, D4, D10 e D14 referem-se aos dias após tratamentos. Barras verticais indicam erro padrão da média (n=9).

A partir de aldeídos, formados subsequentemente a ação das enzimas LOXC e HPL sobre ácidos graxos, álcoois voláteis podem ser sintetizados através da atividade catalítica da ADH2, cuja expressão foi regulada positivamente em resposta ao tratamento “E”, e negativamente em decorrência do tratamento “A” e “E+A” (Figura 6).

Tomates da variedade Grape foram submetidos aos mesmos tratamentos hormonais com a finalidade de verificar se os efeitos em resposta aos tratamentos com a auxina seriam os mesmos ou, em caso contrário, tratariam-se de uma particularidade da cultivar Micro-Tom. Entre os 26 compostos detectados, 21 possuíam diferenças estatisticamente significantes ($FDR < 0,05$) ao menos entre três pares de grupos experimentais (Tabela S4 – Material suplementar). Assim como em tomates da variedade Micro-Tom, os resultados também revelaram uma inibição na síntese de vários compostos voláteis do aroma, inclusive voláteis derivados de isoprenóides, característicos do fruto maduro (Figuras S5 e S6 – Material suplementar), além do atraso na mudança da cor verde para vermelha em resposta ao tratamento com AIA (Figura S7 – Material suplementar).

Discussão

Interações entre etileno e auxina

A rápida queda da concentração de AIA livre que foi observada no grupo “C” (Figura 2B) sugere ser este um requisito para o início do amadurecimento, o que está em acordo com trabalhos prévios que observaram um perfil semelhante (KUMAR et al., 2014). É provável que a diminuição deva-se aos mecanismos, tais como conjugação e catabolismo do hormônio, que contribuem para regular as concentrações de auxina, temporal e espacialmente (LJUNGL et al., 2002). De fato, não somente o grupo “C”, mas o tratamento “A” e “E+A” levou, ao acúmulo de níveis elevados do hormônio livre, os quais diminuiriam rapidamente, acompanhado da elevação das concentrações das formas conjugadas (Figuras 2 B-D). Apesar disso, nos frutos do grupo “A”, os níveis deste hormônio permaneceram maiores em comparação aos encontrados nos frutos do grupo “C”.

Por outro lado, o tratamento “E” levou a uma rápida diminuição dos níveis de AIA-livre (Figura 2B), o que pode estar relacionado ao amadurecimento acelerado

nestes frutos, sugerindo também que o etileno é capaz de provocar alterações nos níveis de AIA, por meio da conjugação do hormônio livre com aminoácidos (Figura 2D). Esta atividade é catalisada por proteínas da família *Gretchen Hagen 3* (GH3). Resultados precedentes mostraram que os níveis de expressão de vários genes codificadores dessa família de auxina-conjugases são influenciados, não apenas pela própria auxina, mas por outros hormônios, dentre os quais o etileno. Em tomates (*Solanum lycopersicum* cv *Pusa Ruby*) Kumar et al. (2012), constataram que o tratamento com etileno exógeno influenciou positivamente a indução de conjugados do tipo amida, através da expressão aumentada de isoformas da proteína GH3 e sugeriram, juntamente com outros indícios da literatura, a hipótese de que esses genes estariam entre os mediadores das interações auxina-etileno, considerando também a presença de elementos de ligação à auxina (AuxRe) na região promotora de alguns dos genes da família.

Outro indício da interação entre etileno e AIA foi o aumento na produção de etileno em D1 em resposta ao tratamento com AIA (Figura 2). Resultados prévios de nosso grupo verificaram que o tratamento com auxina em tomates induziu genes que codificam isoformas de enzimas envolvidas na produção de etileno pré-climatérico (1-aminociclopropano-1-carboxílico sintase [ACS6]) e isto poderia justificar os níveis maiores do etileno no D1, enquanto que as isoformas que participam da biossíntese climática foram inibidas. Além disso, observou-se o atraso no início da produção de etileno do Sistema II também em resposta ao tratamento “A”. No entanto, o maior pico da produção de etileno ocorreu no grupo “A” até mesmo um pouco antes do grupo “C”, indicando que os efeitos causados pelo excesso de auxina podem estar relacionados com alterações na percepção ao etileno e não com uma forte inibição ou atraso da biossíntese do hormônio.

Efeitos de etileno e auxina sobre a síntese de compostos voláteis do aroma

Os resultados obtidos quanto a formação de compostos voláteis nos tomates do grupo “E” estão em acordo com dados da literatura (KLEE; GIOVANNONI, 2011) que indicam este hormônio como um regulador positivo das alterações no aroma características de fruto maduro. Os resultados evidenciaram que não apenas o tratamento com etileno, mas também o tratamento com AIA impactou o perfil de compostos voláteis derivados das principais vias bioquímicas, no segundo caso de

forma contrária ao primeiro. Quase todos os compostos foram claramente inibidos em resposta ao tratamento “A” no D4 (Figura 3) e, embora o tratamento “E+A” não tenha causado igual inibição, o perfil de compostos voláteis deste grupo se aproximou mais ao perfil dos frutos tratados somente com AIA, sugerindo, ao menos parcialmente, a sobreposição da ação de AIA em relação ao etileno. O mecanismo envolvido nesta inibição pode ser relacionado à inibição parcial da expressão de genes associados às vias metabólicas em questão (Figuras 5A e 6).

Particularmente, vale ressaltar a intensidade do efeito obtido no tratamento com AIA. Apenas uma injeção foi capaz de levar a alterações na formação de componentes de aroma que se estenderam por 10 dias (Figura S4 - Material suplementar). Contudo, no D14 (Figura 4) as alterações na composição de voláteis dos frutos foram menos evidentes não permitindo uma clara distinção entre os grupos de frutos. Pode-se dizer a partir desta observação que o fruto é capaz de “reajustar” para retomar seu “programa de amadurecimento” bruscamente alterado pela injeção de uma alta dose de auxina. Um indício que apóia esta hipótese foi os altos níveis de conjugados detectados a partir das primeiras horas do tratamento com AIA e a rápida diminuição dos níveis de auxina livre nos tecidos dos frutos (Figura 2). Notoriamente, é possível atrasar, até mesmo de forma drástica, a progressão do amadurecimento por meios físicos (baixa temperatura, por exemplo) ou químicos (uso de inibidores de ação de etileno). Porém, uma vez retirado o agente inibitório, o fruto retoma a maior parte do seu “programa” de amadurecimento (alterações de cor, textura, sabor, etc). O aroma é particularmente sensível a este tipo de intervenção (KONDO et al, 2015), mas os dados aqui apresentados indicam que mesmo este também pode ser em boa parte recuperado. Assim, diante do observado pode-se dizer que mesmo um forte estímulo hormonal, aparentemente contrário a boa parte das mudanças necessárias para o amadurecimento, mas aplicado em um momento no qual o fruto está plenamente apto a seguir nesta direção, não parece ser capaz de interromper por completo o processo.

Os resultados mostraram-se robustos em relação aos impactos nos perfis de compostos voláteis, causados pelos mesmos tratamentos hormonais, em frutos de tomateiro da variedade Grape, evidenciando inclusive, a sobreposição da ação de AIA em relação ao etileno (Figura S5 - Material suplementar). Os resultados também indicam que os efeitos inibitórios, observados pelos tratamentos com auxina, não

são uma particularidade da variedade Micro-Tom.

Contraste entre os efeitos do etileno e AIA sobre a cor e síntese de compostos voláteis derivados de isoprenóides

A mudança da cor verde para a vermelha foi alterada em resposta ao tratamento “A” e “E+A” (Figura 1), sugerindo efeito na diferenciação plastidial (transição cloro-cromoplasto) e no acúmulo de pigmentos, sendo o último evidenciado pelos baixos níveis de licopeno, principal pigmento que confere a cor vermelha em frutos de tomateiro maduros (Figura 5B). Com esses efeitos somados aos atrasos, em resposta aos mesmos tratamentos, de genes envolvidos na degradação de isoprenóides, pode-se inferir que a auxina modulou negativamente o acúmulo de pigmentos e de enzimas envolvidas na degradação dos mesmos. Essas alterações devem estar relacionadas às mudanças observadas na formação de compostos voláteis derivados de isoprenóides que dependem do aporte de pigmentos e/ou de enzimas que os utilizam como substrato.

A regulação positiva exercida pelo etileno na diferenciação plastidial e na mudança da cor verde para a vermelha foi evidenciada em tomates derivados de linhagens transgênicas deficientes em elementos da cascata de transdução de sinal do etileno, como o receptor NR (*Never-Ripe*), cuja pigmentação dos frutos foi alterada (EGEA et al., 2010). No presente trabalho, a mudança da coloração e acúmulo de licopeno, assim como de compostos voláteis característicos do fruto maduro e enzimas relacionadas, foram induzidos em resposta ao tratamento com etileno, estando de acordo com os vários indícios na literatura sobre a regulação positiva exercida pelo etileno durante o amadurecimento. Comparando estes resultados àqueles obtidos em resposta ao tratamento “A”, podemos inferir um antagonismo entre etileno e auxina.

Apesar dos indícios que apontam os sesquiterpenos voláteis como compostos regulados positivamente pelo etileno, Tohge et al. (2014) verificaram que abacates tratados com um inibidor de etileno, o 1-metilciclopropeno (1-MCP), tiveram níveis significativamente maiores de α -copaeno em comparação aos frutos não tratados e então, sugeriram que o etileno pode participar da regulação negativa deste sesquiterpeno. Os resultados do presente trabalho também revelaram um acúmulo significativamente maior deste sesquiterpeno em resposta ao tratamento

com AIA e etileno+AIA. Isto sugere, juntamente com evidências apresentadas anteriormente, que semelhante aos frutos tratados com 1-MCP, cuja percepção ao etileno é deficiente, os frutos tratados com AIA e etileno+AIA também tiveram a sensibilidade ao etileno comprometida.

Conclusão

Os dados sugerem que a auxina possui importante papel na formação de compostos voláteis do aroma em frutos de tomateiro, regulando de forma negativa este metabolismo, principalmente em relação aos compostos derivados de isoprenóides, os quais são característicos do fruto maduro. Esse impacto pode ser relacionado as influências sobre transcritos de enzimas envolvidas na síntese desses metabólitos. Além deste efeito, os níveis diminuídos de licopeno, também em resposta aos tratamentos com auxina, podem ser relacionados ao atraso na mudança da coloração verde para a vermelha e a formação de voláteis que possuem esse carotenóide como substrato.

As análises de produção de etileno, e AIA na forma livre e conjugados, contribuíram para a formulação da hipótese de que o mecanismo possível para os efeitos inibitórios em resposta aos tratamentos com AIA e etileno+AIA deve residir na influência de um hormônio sobre genes ligados ao metabolismo, e/ou sinalização do outro, durante o amadurecimento, atuando, principalmente, de forma antagônica.

Os resultados também indicam que os efeitos inibitórios, observados pelos tratamentos com auxina, não são uma particularidade da cultivar Micro-Tom, pois foram também observados na variedade Grape.

Material Suplementar

Tabela S1 – Primers utilizados nas análises de qRT-PCR

NOME DO GENE	SÍMBOLO	SGN-UNIGENE*	SEQUÊNCIA DOS PRIMERS 5' - 3' (Forward/ Reverse)	Referências bibliográficas
<i>Expressed unknown protein</i>	S/EX	SGN-U346908	GCTAAGAACGCTGGACCTAATG	QUADRANA et al., 2013
			TGGGTGTGCCTTTCTGAATG	
<i>TIP41-like family protein</i>	S/TIP41	SGN-U321250	ATGGAGTTTTTGAGTCTTCTGC	QUADRANA et al., 2014
			GCTGCGTTTCTGGCTTAGG	
<i>Carotenoid Cleavage Dioxygenase</i>	S/CCD1A	SGN-AY576001	ATGGGGAGAAAAGAAGATGATGGA	ILG et al., 2014
			ATTCAAGAACAAGCCAAACTGTGA	
<i>Carotenoid Cleavage Dioxygenase</i>	S/CCD1B	SGN-AY576002	ATGGGGATGAATGAAGAAGATGGA	ILG et al., 2015
			ATTCAGGAGCAAGCCAAAATGTGA	
<i>Lipoxygenase C</i>	S/LOXC	SGN-U572041	GAGTTTGGAGTTCCAGGAGCAT	QIN et al., 2011
			CATCTTCGAGTGTGAGTGA CTTGA	
<i>Alcohol Dehydrogenase 2</i>	S/ADH2	SGN-U579420	TGAGTACACCGTGGTTCATGTTG	QIN et al., 2011
			TCCAAGGCCTGTCGAAATTC	
<i>Hydroperoxide Lyase</i>	S/HPL	SGN-AF230372	GTCCACCAGTACCAAGTCAATATGC	BAI et al., 2011
			GCTCCCCTTTCTTGATTTCGTAA	

*Número de identificação SGN do banco de dados de genes de tomate *Sol Genomics Network* (SGN) (<http://solgenomics.net>)

Tabela S2 - Análise de variância (ANOVA) e testes *post-hoc* (FDR e Fisher's LSD) de compostos voláteis em frutos de tomateiro (Micro-Tom), 4 dias após tratamentos com AIA (A), etileno (E) e etileno+AIA (E+A). Grupo C=não tratado.

Compostos	p.value	FDR	Fisher's LSD*				
nonanal	0,00	0,00	E - A	E - C	E - E+A		
3-hexenal	0,00	0,00	C - A	C - E	C - E+A		
metil heptanoato	0,00	0,00	A - C	A - E	A - E+A	E - C	E+A - C
estireno	0,00	0,00	C - A	C - E	C - E+A		
2 4-hexadienal	0,00	0,00	C - A	C - E	C - E+A		
2-etilfurano	0,00	0,00	C - A	E - A	C - E	C - E+A	E - E+A
isobutiltiazol	0,00	0,00	E - A	E+A - A	E - C	E+A - C	E - E+A
α -copaeno	0,00	0,00	E+A - A	E+A - C	E+A - E		
2-etilhexanol	0,00	0,00	C - A	C - E	C - E+A		
β -ciclocitral	0,00	0,00	C - A	E - A	C - E+A	E - E+A	
2-heptenal	0,00	0,00	A - C	A - E	E+A - C	E+A - E	
β -ionona	0,00	0,00	E - A	E - C	E - E+A		
2-pentilfurano	0,00	0,00	A - E	C - E	E+A - E		
226-trimetilciclohexanona	0,00	0,00	C - A	E+A - A	C - E	E+A - E	
hexanal	0,00	0,00	C - A	E - A	E+A - A		
metil salicilato	0,00	0,00	C - A	C - E	C - E+A		
2-hexenal	0,01	0,01	C - A	E+A - A	C - E		
2-octenal	0,02	0,02	C - A	E - A	E+A - A		
2-hexenol		NE					

*O traço separa dois grupos de tratamentos e indica que o grupo da esquerda possui níveis maiores do respectivo composto. FDR = *False Discovery Rate*; LSD = *Least Significant Difference test*. NE=não possui diferenças estatisticamente significantes entre grupos de tratamento.

Tabela S3 - Análise de variância (ANOVA) e testes *post-hoc* (FDR e Fisher's LSD) de compostos voláteis em frutos de tomateiro (Micro-Tom), 14 dias após tratamentos com AIA (A), etileno (E) e etileno+AIA (E+A). Grupo C=não tratado.

Compostos	p.value	FDR	Fisher's LSD				
2-heptenal	0,00	0,00	C - A	E - A	E+A - A	C - E	C - E+A
BHT	0,00	0,00	C - A	C - E	C - E+A		
nonanal	0,00	0,00	C - A	E - A	E+A - A		
metil salicilato	0,00	0,00	C - A	E - A	E+A - A	C - E+A	E - E+A
3-hexenal	0,01	0,02	A - E+A	C - E+A	E - E+A		
citral	0,01	0,03	C - A	E - A	C - E+A	E - E+A	
hexanal	0,05	0,10	A - C	A - E			
β-ciclocitral		NE					
2-octenal		NE					
geranil acetona		NE					
2-isobutiltiazol		NE					
226-trimetilciclohexanona		NE					
β-ionona		NE					
3-hexenol		NE					
2-etilfurano		NE					
3-hexenal		NE					

*O traço separa dois grupos de tratamentos e indica que o grupo da esquerda possui níveis maiores do respectivo composto. FDR = *False Discovery Rate*; LSD = *Least Significant Difference test*. NE=não possui diferenças estatisticamente significantes entre grupos de tratamento. BHT=2,6-di-terc-butil-4-metilfenol.

Tabela S4 - Análise de variância (ANOVA) e testes *post-hoc* (FDR e Fisher's LSD) de compostos voláteis em frutos de tomateiro (Grape), 4 dias após tratamentos com AIA (A), etileno (E) e etileno+AIA (E+A). Grupo C=não tratado.

Compostos	p.value	FDR	Fisher's LSD				
1-hexanol	0,00	0,00	A - C	A - E	A - E+A	C - E	C - E+A
2-etilfurano	0,00	0,00	C - A	C - E	C - E+A		
4-metil-1-pentanol	0,00	0,00	E - A	E - C	E - E+A		
benzeno acetaldéido	0,00	0,00	E - A	E - C	E - E+A		
1-pentanol	0,00	0,00	C - A	E+A - A	C - E	E+A - E	
2-pentenol	0,00	0,00	C - A	E - A	C - E+A	E - E+A	
1-heptanol	0,00	0,00	A - C	E - C	E+A - C		
2-octenal	0,00	0,00	C - A	E - A	E+A - A	C - E+A	E - E+A
linalol	0,00	0,00	A - C	A - E	A - E+A	E - C	E+A - C
acetato de etila	0,00	0,00	C - A	E - A	C - E	C - E+A	E - E+A
heptanal	0,00	0,00	E - A	E - C	E - E+A		
fenil etil álcool	0,00	0,00	E - A	E+A - A	E - C	E+A - C	E - E+A
trans,3-hexenol	0,00	0,00	A - C	A - E	C - E	E+A - C	E+A - E
6-metil-5-hepten-2-ona	0,00	0,00	E - A	E+A - A	E - C	E+A - C	
2,4-hexadienal	0,00	0,00	C - A	E - A	E+A - A		
cis,3-hexenol	0,00	0,00	A - E	C - E	E+A - E		
5-metil-2(5H)-furanona	0,01	0,01	A - C	A - E	A - E+A		
benzaldeído	0,01	0,01	E - A	E - C	E - E+A		
3-hexenal	0,01	0,01	C - A	E - A	E - E+A		
2-pentenol	0,03	0,04	A - E	C - E	E+A - E		
hexanal	0,05	0,06	E - A	E - C	E - E+A		
2-hexenal		NE					
2-etil-1-hexanol		NE					
1-octen-3-ol		NE					
2-heptenal		NE					
2-metil butanal		NE					

*O traço separa dois grupos de tratamentos e indica que o grupo da esquerda possui níveis maiores do respectivo composto. FDR = *False Discovery Rate*; LSD = *Least Significant Difference test*. NE=não possui diferenças estatisticamente significantes entre grupos de tratamento.

Figura S1 Modelo de injeção direta de solução de hormônios em frutos de tomateiro.

Figura S2 Teste de injeção com solução de azul de bromofenol em fruto de tomateiro (Micro-Tom).

Figura S3 Representação esquemática do experimento. Após a colheita, os frutos dos grupos controle e AIA foram submetidos à infiltração de solução base e solução base contendo AIA, respectivamente. Os frutos dos grupos etileno e etileno+AIA foram submetidos ao tratamento com etileno gasoso e posterior infiltração da solução base e da solução base contendo AIA, respectivamente. A solução base corresponde a uma solução de sorbitol 3% em tampão MES 10 mM, pH 5,6. Amostras de cada grupo de frutos foram congeladas em vários estágios de amadurecimento durante um período de 14 dias. D14= 14 dias após os tratamentos.

Figura S4 Análise de Componentes Principais (*Biplot*) de compostos voláteis emitidos por frutos de tomateiro (Micro-Tom), 10 dias após tratamentos hormonais. Cada símbolo é uma amostra independente.

Figura S5 Análises multivariadas de compostos voláteis emitidos por frutos de tomateiro (Grape), 4 dias após tratamentos hormonais. **A)** Análise de Componentes Principais (*Biplot*) e **B)** Análise de Agrupamento Hierárquico e Heatmap. Em B, a cor vermelha e azul indicam altos e baixos níveis dos compostos, respectivamente. Cada símbolo é uma amostra independente. C=grupo controle, E=grupo etileno, A=grupo AIA e E+A=grupo etileno+AIA.

Figura S6 Perfil comparativo das áreas normalizadas de compostos voláteis derivados de isoprenóides, obtidas através de cromatogramas, após tratamentos hormonais em frutos de tomateiro (Grape). D1, D4, D6 e D8 referem-se aos dias após tratamentos. Barras verticais indicam erro padrão da média (n=3).

Figura S7 Efeitos de tratamentos hormonais sobre a aparência de tomates (Grape) em função do tempo após tratamentos hormonais. C=grupo controle, E=grupo etileno, A=grupo AIA e E+A=grupo etileno+AIA. D1, D4, D6 e D8 referem-se aos dias após tratamentos.

Referências bibliográficas

ACREE, T., ARN, H. Flavornet and human odor space: Gas chromatography – olfactometry (GCO) of natural products. Disponível em <<http://www.flavornet.org/flavornet.html>>. Acesso em 08.04.2014.

ARCHBOLD, D. D.; DENNIS JR, F. G. Quantification of free ABA and free and conjugated IAA in strawberry achene and receptacle tissue during fruit development. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 1984.

BAI, Jinhe et al. Chilling and heating may regulate C6 volatile aroma production by different mechanisms in tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 60, n. 2, p. 111-120, 2011.

BURDOCK, G. A. Fenaroli's handbook of flavor ingredients. CRC press, 2010.

BUTTERY, R. G., LING, L. C. Volatile compounds of tomato fruit and plant parts: relationship and biogenesis. In: **ACS symposium series (USA)**. p. 23-34, 1993.

CHAABOUNI, S., JONES, B., DELALANDE, C. WANG, H., LI, Z., MILA, I., FRASSE, P., LATCHE, A., PECH, J. C., BOUZAYEN, M. SI-IAA3, a tomato Aux/IAA at the crossroads of auxin and ethylene signalling involved in differential growth. **Journal of experimental botany**, v. 60, n. 4, p. 1349-1362, 2009.

CHEN, K. H., MILLER, A. N., PATTERSON, G. W., COHEN, J. D. A rapid and simple procedure for purification of indole-3-acetic acid prior to GC-SIM-MS analysis. **Pl. Physiol.** 86, 822-825, 1988.

COHEN, Jerry D. In vitro tomato fruit cultures demonstrate a role for indole-3-acetic acid in regulating fruit ripening. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 121, n. 3, p. 520-524, 1996.

EGEA, I., BARSAN, C., BIAN, W., PURGATTO, E., LATCHÉ, A., CHERVIN, C., BOUZAYEN, M., PECH, J. Chromoplast differentiation: current status and perspectives. **Plant and Cell Physiology**, v. 51, n. 10, p. 1601-1611, 2010.

EL_SAYED, A. M. The Pherobase: Database of Insect Pheromones and Semiochemicals. 2003-2015. Disponível em <<http://www.pherobase.com>> Acesso em 08.04.2014.

FABI, J. P., CORDENUNSI, B. R., BARRETO, G. P. M., MERCADANTE, A. Z., LAJOLO, F. M., NASCIMENTO, J. R. O. Papaya fruit ripening: response to ethylene and 1-methylcyclopropene. **J. of Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 6118-6123, 2007.

FRENKEL, Chaim; DYCK, Raymond. Auxin inhibition of ripening in Bartlett pears. **Plant Physiology**, v. 51, n. 1, p. 6-9, 1973.

DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L.; FENNEMA, Owen R. **Química de alimentos de Fennema**. Artmed, 2010. pp 900.

ILG, Andrea et al. Tomato carotenoid cleavage dioxygenases 1A and 1B: Relaxed double bond specificity leads to a plenitude of dialdehydes, mono-apocarotenoids and isoprenoid volatiles. **FEBS open bio**, v. 4, p. 584-593, 2014.

KLEE, H. J., GIOVANNONI, J. J. Genetics and control of tomato fruit ripening and quality

attributes. **Annual review of genetics**, v. 45, p. 41-59, 2011

KLEIN, D., FINK, B., AROLD, B., EISENREICH, W., SCHWAB, W. Functional characterization of enone oxidoreductases from strawberry and tomato fruit. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 16, p. 6705-6711, 2007.

KONDO, S., et al. Aroma volatile biosynthesis in apples affected by 1-MCP and methyl jasmonate. **Postharvest Biol. Technol.** 36:61-68, 2005.

KUMAR, R., AGARWAL, P., TYGI, A. K., SHARMA, A. K. Genome-wide investigation and expression analysis suggest diverse roles of auxin-responsive GH3 genes during development and response to different stimuli in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Mol Genet Genomics**, v. 287, p. 221–235, 2012.

KUMAR, R., KHURANA, A., SHARMA, A. K. Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 16, p. 4561-4575, 2014.

Leffingwell and Associates <http://www.leffingwell.com/>

LEWINSOHN, E., SITRIT, Y., BAR, E., AZULAY, Y., MEIR, A., ZAMIR, D., TADMOR, Y. Carotenoid pigmentation affects the volatile composition of tomato and watermelon fruits, as revealed by comparative genetic analyses. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 8, p. 3142-3148, 2005.

LJUNG, K., HULL, A. A. K., KOWALCZYK, M., MARCHANT, A., CELENZA, J., COHEN, J., SANDBERG, G. Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 249–272, 2002.

LUDWIG-MÜLLER, J., GEORGIEV, M., BLEY, T. Metabolite and hormonal status of hairy root cultures of Devil's claw (*Harpagophytum procumbens*) in flasks and in a bubble column bioreactor. **Process Biochemistry**, 43, 15–23, 2008.

MOORE, S., VREBALOV, J., PAYTON, P., GIOVANNI, J. Use of genomics tools to isolate key ripening genes and analyse fruit maturation in tomato. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 377, p. 2023-2030, 2002.

MUDAY, G. K., RAHMAN, A., BINDER, B. M. Auxin and ethylene: collaborators or competitors? **Plant Science**, v. 17, n. 4, p. 181-195, 2012.

ORZAEZ, Diego et al. Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. **Plant Physiology**, v. 140, n. 1, p. 3-11, 2006.

PALIYATH, G., et al. **Postharvest biology and technology of fruits, vegetables, and flowers**. Iowa: Wiley-Blackwell, 2008.

PESIS, E., IBAÑEZ, A. M., PHU, M.L., MITCHAM, E. J., EBELER, S.E., DANDEKAR, A. M. Superficial scald and bitter pit development in cold-stored transgenic apples suppressed for ethylene biosynthesis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 7, p. 2786-2792, 2009.

PFÄFFL MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.** 29, 45, 2001.

Pichersky, E. and Gershenzon, J. The formation and function of plant volatiles: Perfumes for

pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology** 5, 237–243, 2002.

PURGATTO, Eduardo et al. Inhibition of β -amylase activity, starch degradation and sucrose formation by indole-3-acetic acid during banana ripening. **Planta**, v. 212, n. 5-6, p. 823-828, 2001.

QIN, Guozheng et al. Unraveling the regulatory network of the MADS box transcription factor RIN in fruit ripening. **The Plant Journal**, v. 70, n. 2, p. 243-255, 2012.

QUADRANA, Leandro et al. Transcriptional regulation of tocopherol biosynthesis in tomato. **Plant molecular biology**, v. 81, n. 3, p. 309-325, 2013.

SAMBROOK J, FRITSCHI EF AND MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

SCHWAB, W., RIKANATI, R.D., LEWINSOHN, E. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. **The Plant Journal**, v. 54, p. 712-732, 2008.

SÉRINO, Sylvie 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, 2009.

SU, Liyan et al. Carotenoid accumulation during tomato fruit ripening is modulated by the auxin-ethylene balance. **BMC plant biology**, v. 15, n. 1, p. 114, 2015.

The Good Scents Company, 2013. Disponível em: <<http://www.thegoodscentscompany.com/search.html>>. Acesso em: 06. 05. 2014.

THOMAS, A., PERROT-RECHENMANN, C. Progrès récents dans la biologie de l'auxine. **Comptes Rendus Biologies**, v. 333, p. 297–306, 2010.

TINGWA, Peter O.; YOUNG, Roy E. The effect of indole-3-acetic acid and other growth regulators on the ripening of avocado fruits. **Plant Physiology**, v. 55, n. 5, p. 937-940, 1975.

TOHGE, T., ALSEEKH, S., FERNIE, A. R. On the regulation and function of secondary metabolism during fruit development and ripening. **Journal of experimental botany**, p. ert 443, 2014.

TRAINOTTI, L., TADIELLO, A., CASADORO, G. The involvement of auxin in the ripening of climacteric fruits comes of age: the hormone plays a role of its own and has an intense interplay with ethylene in ripening peaches. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 12, p. 3299–3308, 2007.

VENDRELL, Miguel. Dual effect of 2, 4-D on ethylene production and ripening of tomato fruit tissue. **Physiologia Plantarum**, v. 64, n. 4, p. 559-563, 1985.

WARD JR, Joe H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. **Journal of the American statistical association**, v. 58, n. 301, p. 236-244, 1963.

Xia J, Mandal R, Sinelnikov IV, Broadhurst D, Wishart DS (2012) MetaboAnalyst 2.0-a comprehensive server for metabolomic data analysis. **Nucleic Acids Res** 40: W127–133.