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

Influência do ácido abscísico, ácido-indol-3-acético, metil-jasmonato e etileno
na formação de compostos voláteis do aroma em morangos (*Fragaria x*
ananassa)

Carolina Prado Fernandes

Dissertação para
obtenção do Título de MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Purgatto

São Paulo
2017

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

Influência do ácido abscísico, ácido-indol-3-acético, metil-jasmonato e etileno
na formação de compostos voláteis do aroma em morangos (*Fragaria x*
ananassa)

Carolina Prado Fernandes

Versão Original

Dissertação para
obtenção do Título de MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Purgatto

São Paulo

2017

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

F363i Fernandes, Carolina Prado
Influência do ácido abscísico, ácido-indol-3-
acético, metil-jasmonato e etileno na formação de
compostos voláteis do aroma em morangos (*Fragaria x*
ananassa) / Carolina Prado Fernandes. - São Paulo,
2017.
75 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Purgatto, Eduardo

1. Compostos voláteis do aroma . 2. Ciências dos
alimentos. 3. Hormônios vegetais. 4. Frutos pós-
colheita. I. T. II. Purgatto, Eduardo , orientador.

Carolina Prado Fernandes

Influência do ácido abscísico, ácido-indol-3-acético, metil-jasmonato e etileno
na formação de compostos voláteis do aroma em morangos (*Fragaria x*
ananassa)

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Eduardo Purgatto
Orientador/Presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2017

*À minha mãe e ao meu falecido pai, por
sempre acreditarem no meu potencial e
me apoiarem em todas as escolhas.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Eduardo Purgatto, por todo ensinamento, auxílio e compreensão durante essa jornada.

À minha mãe, Glaucilena, que fez muito além do que estava ao seu alcance para que eu pudesse concluir essa etapa.

Aos meus irmãos, Glauci e Renato, pelo suporte emocional e motivação para continuar minha pesquisa.

A todos os membros da família Prado e da família Fernandes.

Aos grandes amigos que fiz em São Carlos e Rio Claro, por todas as risadas, broncas e paciência, que aliviaram o peso do dia a dia e me tornaram uma pessoa melhor. Em especial: Alvaro, Amanda, Bruno, Fabíola, João, Karla, Murilo, Naiane e Walter.

Aos companheiros de laboratório, principalmente às minhas amigas Gabriela, Isabel, Jéssica, Laís, Silvia e Vanessa, pelas conversas, pelos desabafos e apoio em todos os momentos.

À Krissia Zawadzki pela incomensurável ajuda com minhas análises para a qualificação.

Aos professores Beatriz Rosana Cordenunsi, Gustavo Teixeira e Maria Aurineide Rodrigues, pelas contribuições em minha banca de qualificação.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

FERNANDES, C.P. **Influência do ácido abscísico, ácido-indol-3-acético, metil-jasmonato e etileno na formação de compostos voláteis do aroma em morangos (*Fragaria x ananassa*)**. 2017. 75p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O amadurecimento é um processo geneticamente controlado em que ocorrem alterações bioquímicas e fisiológicas no fruto, modificando suas características sensoriais (sabor, cor, aroma e textura). Não existe um modelo exato de estudo para frutos não-climatéricos e os fatores regulatórios envolvidos na maturação desses frutos ainda são pouco claros. Muitos estudos tem focado em diferentes classes hormonais como possíveis fatores regulatórios do amadurecimento de frutos não-climatéricos, incluindo a produção de compostos voláteis do aroma. No morango, o ácido abscísico (ABA) exógeno provavelmente efetua a maturação do fruto. Esse hormônio também exibe um padrão de mudança semelhante ao do etileno em estádios finais do desenvolvimento. Já os jasmonatos, especialmente o metil-jasmonato (MJ), são capazes de induzir a biossíntese de diversos compostos voláteis, que podem apresentar notas aromáticas. Trabalhos com diversas frutas, dentre elas o morango, sugerem a participação das auxinas no amadurecimento, mais especificamente, o ácido indol acético (AIA). Embora existam várias evidências da interação desses hormônios vegetais com o etileno, há poucos detalhes sobre quais são as vias metabólicas e quais etapas são afetadas pelos hormônios citados. Por isso, nesse projeto foram avaliados os efeitos dos hormônios etileno, ABA, AIA e MJ na produção de compostos voláteis do aroma em frutos não-climatéricos, utilizando o morango (*Fragaria X ananassa*) como modelo. Os morangos foram obtidos no ponto branco de maturação e as aplicações hormonais seguiriam protocolos já otimizados e testados em laboratório. Em todos os casos, os resultados dos tratamentos foram comparados com grupos controle tratados apenas com solução tampão. A maioria de compostos voláteis produzidos foi identificada como ésteres, sendo estes já conhecidos pela importância no *flavor* dos morangos. Outros compostos voláteis do aroma também foram formados ao longo dos dias, tais como: álcoois, aldeídos, cetonas, furanonas, monoterpenos. Também foram avaliados os efeitos dos hormônios ABA e AIA sobre genes ligados a biossíntese de voláteis. Desse modo, foi possível obter informações sobre as interações hormonais relacionadas à formação de voláteis do aroma, gerando base de conhecimento importante para futuras intervenções tecnológicas que visem aprimorar a qualidade sensorial dos frutos. A aplicação exógena dos hormônios vegetais influenciou a biossíntese de compostos voláteis do aroma, quando comparados ao controle, principalmente em relação à via da LOX, devido à maior formação de compostos voláteis C₆, que são precursores de compostos típicos do aroma em morangos. A modulação dos níveis de hormônio no morango ao longo do amadurecimento pode ser útil para ajudar a arquitetar abordagens que melhorem a qualidade do fruto e prolonguem sua vida útil. Os resultados obtidos até o momento reforçam a hipótese de existir uma ação dos hormônios estudados em frutos não-climatéricos, com variados graus de impacto sobre os diferentes aspectos do amadurecimento, principalmente sobre a formação de compostos voláteis do aroma.

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

ABSTRACT

FERNANDES, C.P. **Influence of abscisic acid, indole-3-acetic acid, methyl jasmonate and ethylene on the formation of volatile aroma compounds in strawberries (*Fragaria x ananassa*)**. 2017. 75p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The fruit ripening is a genetically controlled process in which biochemical and physiological changes occur, modifying its sensory characteristics (taste, color, aroma and texture). There is no exact study model for non-climacteric fruits and the regulatory factors involved in the maturation of these fruits are still unclear. Many studies have focused on different hormonal classes as possible regulatory factors for the maturation of non-climacteric fruits, including the production of volatile aroma compounds. In the strawberry, the exogenous abscisic acid (ABA) probably effects the maturation of the fruit. This hormone also exhibits a pattern of change similar to that of ethylene in late stages of development. However, jasmonates, especially methyl jasmonate (MJ), are capable of inducing the biosynthesis of various volatile compounds, which may have aromatic notes. Several studies about fruits development, among them the strawberry, suggest the participation of auxins in ripening, more specifically indole acetic acid (AIA). Although there is a lot of evidence of the interaction of these plant hormones with ethylene, there are few details about what metabolic pathways are and which steps are affected by the hormones mentioned. Therefore, the effects of the ethylene, ABA, AIA and MJ hormones on the production of volatile aroma compounds in non-climacteric fruits, using strawberry (*Fragaria X ananassa*) as a model, were evaluated in this project. The strawberries were obtained at the white point of maturation and the hormonal applications would follow protocols already optimized and tested in the laboratory. In all cases, treatment results were compared to control groups treated with buffer alone. Most volatile compounds produced were identified as esters, which are already known for their importance in the flavor of strawberries. Other volatile aroma compounds have also been formed over the course of days, such as alcohols, aldehydes, ketones, furanones, and monoterpenes. We also evaluated the effects of ABA and AIA hormones on genes linked to volatile biosynthesis. Thus, it was possible to obtain information about the hormonal interactions related to the formation of aroma volatiles, generating an important knowledge base for future technological interventions aimed at improving the sensorial quality of the fruits. The exogenous application of plant hormones influenced the biosynthesis of volatile aroma compounds when compared to the control, mainly in relation to the LOX pathway due to the higher formation of C6 volatile compounds, which are precursors of typical strawberry aroma compounds. Modulation of the levels of the hormone in the strawberry during maturation can be useful to help design approaches that improve the quality of the fruit and prolong its useful life. The results reinforce the hypothesis that there is an action of the hormones studied in non-climacteric fruits, with varying degrees of impact on the different aspects of maturation, mainly on the formation of volatile aroma compounds.

Keywords: ripening, aroma, volatile compounds, non-climacteric fruits, plant hormones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mudanças de tamanho e cor do morango durante o desenvolvimento.....	1
Figura 2: Principais precursores e vias de formação de compostos voláteis em plantas.....	3
Figura 3. Via catabólica de fosfolipídios e sua relação com o amadurecimento.....	5
Figura 4. Biossíntese de compostos voláteis derivados de aminoácidos.....	6
Figura 5. Biossíntese de terpenos pela via do mevalonato e pela via do gliceraldeído-3-fosfato/piruvato.....	7
Figura 6. Modelo de Sinalização do etileno.....	9
Figura 7. Modelo esquemático da síntese de etileno.....	10
Figura 8. Modelo esquemático da síntese de ácido abscísico.....	10
Figura 9. Modelo esquemático da síntese de metil-jasmonato.....	11
Figura 10. Síntese de AIA a partir do triptofano.....	12
Figura 11. Síntese de AIA independente do triptofano.....	13
Figura 12. Sinalização de auxina mediada pela proteína TRANSPORTER INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1).....	14
Figura 13. Representação do receptáculo floral e dos aquênios.....	15
Figura 14. Representação esquemática do experimento.....	19
Figura 15. Representação esquemática da extração de compostos voláteis por SPME.....	20
Figura 16. Análise de cor em morangos (<i>Fragaria X ananassa</i>), cultivar Albion.....	25
Figura 17. Fotos dos morangos da cultivar Albion.....	26
Figura 18. Perfil de produção de etileno.....	27
Figura 19. Perfil da taxa de CO ₂	28

Figura 20A-D: Caracterização, através da Análise de Componentes Principais dos dias 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D), das amostras em relação aos compostos voláteis de morangos, da cultivar Albion, submetidos aos tratamentos hormonais.....	32
Figura 21. Perfil comparativo de área normalizada de 1-Hexanol.....	34
Figura 22. Perfil comparativo de área normalizada de 2-Hexanal.....	35
Figura 23. Perfil comparativo de área normalizada de tran-2-hexenol.....	36
Figura 24. Perfil comparativo de área normalizada de cis-e-Hexenol.....	37
Figura 25. Perfil comparativo de área normalizada de Acetato de hexila.....	38
Figura 26. Representação simplificada da síntese de compostos voláteis do aroma pela via da Lipoxigenase (LOX).....	38
Figura 27. Perfil comparativo de área normalizada de Linalol.....	39
Figura 28. Perfil comparativo de área normalizada de Óxido de Linalol-(Z).....	40
Figura 29. Perfil comparativo de área normalizada de 2-metil,etil-butanoato.....	41
Figura 30. Perfil comparativo de área normalizada de Fenil-metil-acetato.....	42
Figura 31. Perfil comparativo de área normalizada de α -Terpineol.....	43
Figura 32. Perfil comparativo de área normalizada de Nerolidol.....	43
Figura 33. Perfil comparativo de área normalizada de Furanona.....	44
Figura 34. Expressão relativa do gene álcool aciltransferase (AAT).....	46
Figura 35. Expressão relativa do gene álcool aciltransferase (SAAT).....	46
Figura 36. Expressão relativa do gene álcool aciltransferase (FaAAT2).....	47
Figura 37. Expressão relativa do gene <i>Fragaria vesca</i> monoterpene sintase.....	47
Figura 38. Expressão relativa do gene <i>Fragaria vesca</i> sesquiterpene sintase.....	48
Figura 39. Expressão relativa do gene <i>Fragaria x ananassa</i> nerolidol sintase1.....	48
Figura 40. Expressão relativa do gene Lipoxigenase.....	49

Figura 41. Expressão relativa do gene *Fragaria x ananassa* O-metiltransferase.....49

Figura 42. Expressão relativa do gene *Fragaria × ananassa* quinona oxidoreductase em morangos da cultivar Albion.....50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: *Primers* utilizados nas análises de qRT PCR.....23

Tabela 2: Descrição dos compostos voláteis do aroma encontrados em morangos dos grupos controle e tratados.....29

Tabela 3. Principais compostos voláteis do aroma detectados ao longo do experimento.....33

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
<i>1.1. Amadurecimento e síntese de compostos voláteis em frutos</i>	<i>1</i>
<i>1.2. Regulação da biossíntese de compostos voláteis</i>	<i>8</i>
<i>1.3. O morango</i>	<i>15</i>
2. OBJETIVO.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
<i>3.1. Amostras e tratamentos hormonais</i>	<i>18</i>
<i>3.2. Produção de CO₂ e etileno</i>	<i>19</i>
<i>3.3. Análise de cor</i>	<i>20</i>
<i>3.4. Análise do perfil de compostos voláteis</i>	<i>20</i>
<i>3.4.1 Otimização do método (SPME)</i>	<i>21</i>
<i>3.5. Análise de expressão gênica por qRT-PCR</i>	<i>22</i>
<i>3.5.1. Extração de RNA, purificação e síntese de cDNA.....</i>	<i>22</i>
<i>3.5.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)</i>	<i>22</i>

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
<i>4.1. Colorimetria</i>	<i>24</i>
<i>4.2. Produção de CO₂ e etileno</i>	<i>27</i>
<i>4.3. Perfil de compostos voláteis</i>	<i>28</i>
<i>4.3.1. Análise de Componentes Principais (ACP)</i>	<i>31</i>
<i>4.3.2. Gráficos com áreas normalizadas</i>	<i>34</i>
5. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA	45
6. CONCLUSÕES.....	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. Introdução

1.1. Amadurecimento e síntese de compostos voláteis em frutos

O amadurecimento é considerado um processo complexo, no qual ocorrem diversas alterações bioquímicas e fisiológicas, modificando as características sensoriais dos frutos, tais como sabor, cor, aroma e textura (ALEXANDER; GRIERSON, 2002). Por ser um processo geneticamente controlado, o aprimoramento das características sensoriais do fruto, que o tornam muito mais palatável, ocorre de modo sincronizado (WHITE, 2002). A alteração da cor (figura 1), por exemplo, é um dos sinais mais claramente associados ao amadurecimento, sendo que ela ocorre devido à degradação da clorofila e à biossíntese de pigmentos como as antocianinas e os carotenoides (TANAKA; SASAKI; OHMIYA, 2008). Nos morangos, as antocianinas estão presentes principalmente na epiderme e aquênios (AABY *et al.*, 2005), e suas tonalidades são influenciadas pela substituição dos grupos hidroxila e metoxila nas moléculas destes pigmentos. A acentuação da cor para o vermelho tende a ser decorrente do aumento no número de metoxilas (T. J. LOPES *et al.*, 2007).

Figura 1. Mudanças de tamanho e cor do fruto durante o processo de desenvolvimento, dividido em sete estágios: verde pequeno (SG), verde grande (BG), "desverdecimento" (DG), branco (Wt), vermelho inicial (IR), vermelho parcial (PR), vermelho total (FR). Proposto por H. Jia, Y. Chai, C. li *et al.*, 2011.

Dentre os eventos observados ao longo do amadurecimento está a mudança de textura, com consequente amolecimento do fruto. Isso ocorre devido à atuação de enzimas em pectinas e hemiceluloses, polissacarídeos constituintes da parede celular, fazendo com que a coesão entre as células diminua (AMMUAYSIN *et al.*, 2012). Mesmo com tal ação enzimática, existem frutos que permanecem firmes até o início de sua senescência.

O amadurecimento também depende do padrão da atividade respiratória, classificando os frutos em climatéricos e não-climatéricos, e apresenta correlação quanto à produção do hormônio etileno, envolvido na modulação dos diversos processos do desenvolvimento vegetal (KERBAUY, 2008; KLEE, 2002). Frutos climatéricos, como tomate e mamão, apresentam aumento na taxa respiratória, acompanhada de um pico na taxa de síntese de etileno, o que não é observado nos frutos não-climatéricos (WHITE, 2002), como o morango e a framboesa. Nestes, a respiração geralmente diminui durante o amadurecimento, e as transformações bioquímicas ocorrem quando o fruto ainda está ligado à planta (WILLS *et al.*, 1998).

Outro evento importante é o acúmulo de açúcares solúveis: glicose, frutose e sacarose. Esse processo ocorre principalmente em frutos com reserva de carboidrato na forma de amido, como a banana e a manga. Tal mecanismo é viabilizado pela ação de enzimas como a β -amilase, que hidrolisa ligações glicosídicas da extremidade não-redutora da amilose e amilopectina, removendo unidades de maltose (SMITH *et al.*, 2005) que, por sua vez, são precursoras da formação desses açúcares. Eles também podem ser acumulados através da gliconeogênese, que utiliza como substrato ácidos orgânicos. Assim, a concentração de ácidos orgânicos pode diminuir ao longo do amadurecimento, contribuindo para o equilíbrio entre doçura e acidez, que influenciam o sabor dos frutos e, por isso, são considerados importantes padrões de qualidade.

A combinação de sabor e aroma, chamada de *flavor*, provém de uma mistura complexa de ácidos, açúcares, sais, compostos amargos (alcaloides e flavonoides) e compostos voláteis (SONG; FORNEY, 2008). Segundo Smith (2012), o *flavor* pode ser explicado como uma junção de 3 sentidos: odor, paladar e tato. Por impactar diretamente na qualidade do fruto, o *flavor* é a característica mais importante quando nos referimos a um fruto que pode ser consumido. Os compostos voláteis sintetizados, responsáveis principalmente pelo odor, também agem como mecanismo de defesa contra o ataque de microrganismos e herbívoros, além de participarem da comunicação entre as plantas e da atração de agentes dispersores (MARÍNLOAIZA; CÉSPEDES, 2007).

Um estudo realizado pela Universidade de Ghent, Bélgica, com duas cultivares diferentes de morangos, mostrou que os compostos voláteis produzidos pela planta influenciam na polinização feita por abelhas (*Bombus terrestris*). Esse tipo de abelha é um polinizador geral na Europa, muito importante para várias culturas hortícolas, como tomate, pimentão ou morango. As *B. terrestris* preferem as flores da cultivar Sonata sobre as da

cultivar Elsanta, quando co-cultivadas. Essa preferência pode ser atribuída à maior proporção de voláteis de folhas verdes nas flores de Elsanta, pois esses compostos geram uma resposta repelente às abelhas (CEUPPENS *et al.*, 2015).

Os diversos compostos voláteis presentes em frutos e hortaliças pertencem a diferentes classes orgânicas, tais como: álcoois, cetonas, aldeídos e ésteres (figura 2). E são derivados de ácidos graxos, aminoácidos, carboidratos e carotenoides (KADER, A., 2008).

Figura 2: Principais precursores e vias de formação de compostos voláteis em plantas (Adaptado de Schwab *et al.* 2008).

A maioria dos voláteis provém de ácidos graxos saturados e insaturados, principalmente dos ácidos linoleico e linolênico. Isso ocorre através de duas vias: a da beta oxidação e a da lipoxigenase. Essas reações produzem diferentes compostos voláteis, como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, lactonas, entre outros (SCHWAB; SCHREIER, 2002). Esses ácidos graxos derivam de biomembranas, que se encontram na forma de triglicerídeos e fosfolipídios. A degradação de triglicerídeos e fosfolipídeos pode ocorrer pela ação de triacilglicerol lipases e via fosfolipase D, respectivamente, liberando ácidos graxos que, por sua vez, sofrem a ação da enzima 3-cetoacil-CoA-tiolase, na via de β-oxidação, formando acil-CoA (PALIYATH *et al.*, 2008), entre outros produtos.

Aldeídos voláteis saturados e insaturados de seis e nove carbonos (C6 e C9) e álcoois são importantes para as características do *flavor* em frutos, vegetais e folhas verdes. Esses

componentes são amplamente utilizados como aditivos alimentares devido ao seu odor fresco. Pelo menos quatro enzimas estão envolvidas nessa via biossintética: a lipoxigenase (LOX), hidroperóxido-liase (HPL), (3Z):(2E)-*enal isomerase* e álcool desidrogenase (ADH). Nessa via, há formação de hidroperóxidos, que são gerados na primeira etapa da reação, catalisada pelas lipoxigenases (LOXs). Em seguida, a hidroperóxido-liase (HPL) converte os produtos da oxigenação em cadeias curtas de aldeídos e de ácidos graxos (figura 3). O aldeído formado pode ser convertido a álcool através da ação de álcool desidrogenases (ADHs) (MATSUI, 2006); o álcool, por sua vez, juntamente com o grupo ácido do Acil-CoA pode originar ésteres voláteis. Nesta última etapa da reação o grupo acil é transferido para o álcool através da ação da álcool acil transferase (ATTs) (DUDAREVA; PICHERSKY; GERSHENZON, 2004). Em tecidos vegetativos, a lipoxigenase fornece Z,E-hidroperóxidos que podem ser metabolizados em compostos cruciais na defesa da planta. Aldeídos C6 e C9 podem ser ainda metabolizados por ADH para formar os álcoois correspondentes.

Lipoxigenases e hidroperóxido-liases podem ser classificadas em dois grupos, de acordo com a especificidade de substrato (NOORDERMEER *et al.*, 2001). HPL é um membro da família CYP74B citocromo P450 / C e atua sobre uma funcionalidade hidroperoxi em um peróxido lipídico sem qualquer cofator. Um hemi-acetal foi identificado como o produto primário de HPL (MATSUI, 2006). A regulação negativa de HPL foi realizada em plantas de batata (SALAS *et al.*, 2005) e tal silenciamento induziu aumento na atividade de LOX, mas diminuição da maior parte dos produtos voláteis C6. Os produtos da HPL são propensos a isomerização, que pode ser catalisada por uma enzima 3Z,2E-enal isomerase ou ser não enzimaticamente catalisada.

Figura 3. Via catabólica de fosfolipídios e sua relação com o amadurecimento. Através da ligação com o receptor, o etileno induz genes responsivos a ele, como aqueles que codificam para enzimas que estão 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 em hidroperóxidos pelas lipoxigenases (LOXs). Em seguida as hidroperoxidolases (HPLs) convertem os produtos da oxigenação em cadeias curtas de aldeídos e de ácidos graxos. O aldeído formado é convertido à álcool através da ação de álcool desidrogenases (ADHs), o álcool por sua vez pode juntamente com o grupo ácido do AcilCoA 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).

Outra via de síntese de compostos do aroma é a rota de obtenção de voláteis a partir de aminoácidos (figura 4), ou de seus substratos (SCHWAB *et al.*, 2008), na qual as aminotransferases atuam na catálise inicial da reação de aminoácidos a 2-cetoácidos, que são convertidos a ácidos carboxílicos, 2-hidroxiácidos e aldeídos, através de reações de descarboxilação oxidativa, redução e descarboxilação, respectivamente. Os ácidos e álcoois formados podem sofrer reação de esterificação, formando outros compostos voláteis. Pode ocorrer, também, a produção de álcoois e aldeídos a partir da descarboxilação direta de aminoácidos, que são convertidos a aminas e, pela ação da enzima MAO (monoamina oxidase), são formados aldeídos. Através dessas vias são sintetizados, entre outros compostos voláteis, os derivados de leucina (3-metilbutanal, 3-metil-butanol e ácido 3-metilbutanóico), os que apresentam fenilalanina como precursor (fenilacetaldeído e 2-feniletanol) e os produzidos a partir de ácidos por esterificação e álcoois (acetato de 3-metil-butilo e 3-

metilbutil-butanoato). Esses compostos estão presentes em frutos como o morango, o tomate e a banana.

Figura 4. Biossíntese de compostos voláteis derivados de aminoácidos. O catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada leva à formação de compostos metil-ramificados. A formação de aldeído a partir de aminoácidos requer a remoção de ambos os grupos carboxila e amina. Os aldeídos também podem ser formados diretamente pela ação da enzima aldeído sintase (Adaptado de Schwab et al., 2008).

Também há a rota de biossíntese que deriva diretamente dos carboidratos, mas apenas um número limitado de produtos voláteis é sintetizado, sendo as furanonas e piranonas, presentes em frutos como o morango, os principais produtos (BOOD; ZABETAKIS, 2002). Em morango e tomate, algumas hexoses-difosfato são convertidas por uma enzima ainda desconhecida para 4-hidroxi-5-metil-2-metileno-3 (2H) - furanona, que atua como substrato para uma oxidoredutase expressa em frutos maduros (KLEIN *et al.*, 2007; RAAB *et al.*, 2006). Também no morango, o furaneol é metabolizado por uma O-metiltransferase (FaMOT) (WEIN *et al.*, 2002). A transformação genética de morango com a sequência FaOMT na orientação anti-sentido sob o controle de um promotor constitutivo, resultou numa perda quase total de methoxifuraneol, demonstrando a metilação *in vivo* de furaneol, um dos principais compostos no aroma frutado morango (FARINE *et al.*, 1994), por FaOMT (LUKENBEIN *et al.*, 2006). Foi proposto que a função biológica evolutiva das furanonas seria atuar como moléculas de sinal inter-organismo em vários sistemas, sendo que as 4-hidroxi-3(2H)-furanonas associadas com aromas, agem para atrair os animais para o fruto, garantindo a dispersão de sementes (SLAUGHTER, 1999).

Os compostos derivados da via dos terpenóides apresentam grande diversidade. Os terpenóides são produtos do metabolismo secundário e sua rota biossintética relaciona-se à formação de diversas substâncias responsáveis pelo desenvolvimento vegetal, além de produzir, através dos precursores dessa via, uma variedade expressiva de componentes voláteis de aroma presentes no tomate, na melancia e em outros frutos (LEWINSOHN *et al.*, 2005). São conhecidas duas vias de síntese de terpenóides (figura 5): a citosólica (via mevalonato), na qual produtos como sesquiterpenos, fitoesteróis e ubiquinona são gerados; e a plastidial (via metileritritol-4-fosfato), na qual ocorre a formação de monoterpenos, giberelinas, ácido abscísico, carotenoides, entre outros (ROHMER, 2003). Nessas vias citadas, unidades de isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero, dimetilalil difosfato (DMAPP), são os substratos iniciais (CROTEAU *et al.*, 2000). Os apocarotenóides voláteis, como os encontrados no tomate (β -ionona, 6-metil-5-hepten-2-ona e geranilacetona), são derivados da clivagem de carotenoides (VOGEL *et al.*, 2010).

Figura 5. Biossíntese de terpenos pela via do mevalonato e pela via do gliceraldeído-3-fosfato/piruvato (adaptado de Seigler, 1998).

As vias de síntese de compostos voláteis do aroma citadas, normalmente coexistem tanto em frutos climatéricos como em não-climatéricos, mas a regulação de sua biossíntese difere não somente nesses dois grupos, mas também de fruto para fruto.

1.2. Regulação da biossíntese de compostos voláteis

O etileno é um hormônio vegetal que regula o amadurecimento dos frutos através da coordenação da expressão gênica responsável pelos diversos processos característicos desta fase do desenvolvimento: mudanças da aparência, da textura, do aroma e do sabor dos frutos; dentre outros (KERBAUY, 2008; KLEE, 2002). O etileno liga-se ao seu receptor no retículo endoplasmático, formando um complexo proteico-enzimático, e desencadeia uma série de transformações bioquímicas, que resultam em amadurecimento e senescência dos frutos (BRACKMANN *et al.*, 2004). A taxa de produção de etileno pelos tecidos é normalmente baixa, e a concentração necessária para induzir o amadurecimento varia de acordo com a espécie e o estágio de maturação do fruto (YANG, 1985). Em morangos, embora classificados como não-climatéricos, há um significativo aumento da respiração após a colheita (PEREZ *et al.*, 1996) e, sob ação do etileno, um incremento da síntese de antocianinas, além de redução da acidez (AHARONI *et al.*, 2000).

Durante o amadurecimento, ocorre a expressão diferencial de receptores de etileno (figura 6). Eles possuem um domínio de ligação na região C- terminal (BINDER, 2008) e um domínio sensor, em que o íon cobre é imprescindível para a ligação acontecer corretamente (RODRIGUEZ *et al.*, 1999). Além disso, existe a interação de receptores com a proteína CTR1, que apresenta similaridade com proteínas da família RAF serina/treonina MAP kinase, e atua como um regulador negativo da resposta ao etileno, quando este não está ligado ao receptor (BLEECKER; KENDE, 2000). Assim que o complexo etileno-receptor é formado, ocorre o desacoplamento da CTR1 (GAO *et al.*, 2008), o que possibilita a ativação da cascata de sinalização desse hormônio. Essa cascata prossegue através da ativação dos genes que codificam fatores de transcrição da família EIN3 (*ethylene-insensitive 3*) ou EILs (*EIN3-like*) pela proteína EIN2 (ZHU *et al.*, 2006). Uma vez ativados, os fatores se ligam a elementos chamados PERE (*Primary Ethylene Responsive Element*), que estão em regiões promotoras de genes codificadores de outros fatores de transcrição, os ERFs (*Ethylene Response Factors*), bem como nos promotores de outros genes, como por exemplo o gene que codifica para a enzima aminociclopropano carboxilato oxidase (ACO). Os ERFs têm como alvo as regiões GCC-box de uma ampla gama de genes que são etileno dependentes e envolvidos em respostas a mudanças ambientais, infecções patogênicas (BARRY; GIOVANNI, 2007) e nos processos do amadurecimento (síntese de carotenóides, síntese de compostos voláteis, entre vários outros eventos).

Figura 6. Modelo de Sinalização do Etileno: na ausência do hormônio (A), a proteína CTR1 encontra-se acoplada ao receptor de etileno (*S/ETR3*) 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. Assim, a sinalização do etileno é 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 que leva ao desacoplamento da proteína CTR1 e ao término da fosforilação da porção C-terminal de EIN2, que migra para o núcleo onde irá ativar as proteínas *Ethylene Insensitive 3* (EIN3) e *EIN3-like* (EIL). As proteínas EIN3/EILs também são marcadas por proteínas F-box (EBF1/2), na ausência de etileno, e são direcionadas à 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, os ERFs ligam-se nas regiões “GCC-box” dos genes responsivos a etileno, promovendo sua transcrição e, por consequência, as respostas ao hormônio (Adaptado de Jua et al., 2012).

O etileno é sintetizado (figura 7) a partir da metionina, que é convertida em S-adenosil-L-metionina (AdoMet) pela enzima AdoMet sintase. Em seguida há a formação de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) e 5-metiltioadenosina (MTA), ambos catalisados pela enzima ACC sintase. O etileno é formado a partir de ACC pela enzima ACC oxidase (ACO). O produto MTA é utilizado para reciclar a metionina, possibilitando que a síntese de etileno continue mesmo em baixas concentrações de metionina (JAFARI; HADDAD; HOSSEINI; GAROOSI, 2013).

Figura 7. Modelo esquemático da síntese de etileno.

A relação do etileno com as mudanças no aroma pode ser demonstrada através do metabolismo de ésteres voláteis, no qual as enzimas LOX, ADH e álcool acil transferases (AATs) são induzidas após o aumento dos níveis do hormônio (DIXON; HEWETT, 1992), aumentando a concentração de ésteres, aldeídos e álcoois derivados desta via bioquímica. A concentração endógena de etileno varia conforme a espécie e cultivar, sendo que existe uma interação com outros biorreguladores como ácido abscísico (ABA), auxinas, giberelinas, e citocininas, controlando o processo de maturação (KLUGE et al., 2002). Vários compostos e condições ambientais também interferem na atividade enzimática de síntese de etileno. Alguns hormônios, como o ácido abscísico (ABA), ainda não foram estudados com um alto grau de detalhamento sobre as vias metabólicas que influenciam.

O ABA é um hormônio vegetal cujo precursor, isopentenil fosfato, é um derivado carotenoide (figura 8). Está envolvido no processo de dormência de sementes, induzindo um retardamento temporal no mecanismo de germinação, ou inibindo a germinação sob condições desfavoráveis (TAIZ & ZEIGER, 2004). Sementes em desenvolvimento raramente germinam e, quando isso ocorre, provavelmente há deficiências na produção ou sensibilidade a esse hormônio (BLACK, 1991; HILHORST, 1995; KARSSSEN, 1995). Sementes de tomate com deficiência nesse hormônio apresentam um tegumento menos resistente, contribuindo para uma germinação mais rápida do que em sementes normais (DOWNIE *et al.*, 1999). Também foi observado que o efeito do ABA na germinação e pós-germinação poderia estar relacionado com a absorção de água e com a mobilização de reservas pelo embrião em crescimento (POTOMATI & BUCKERIDGE, 2002).

Figura 8. Modelo esquemático da síntese de ácido abscísico. Adaptado do Grupo de Estudo e Pesquisa em Estaquia (GEPE), UFPR, K.C. Zuffellato-Ribas.

Em estudos com tomates, o ABA endógeno foi acumulado antes da produção de etileno. Os resultados sugerem que o aumento na síntese de ABA endógeno é um ponto crítico para o início do amadurecimento e que o ABA exógeno acelera o amadurecimento do fruto (MEI *et al.*, 2009).

No morango, a aplicação de ABA induz a maturação do fruto (KANO & ASAHIRA, 1981; MANNING, 1994; PERKINS-VEAZIE, 1995; JIANG & JOYCE, 2003). Esse hormônio também exibe um padrão de mudança semelhante ao do etileno em estágios finais de desenvolvimento. Alguns pesquisadores consideram o ABA como um hormônio crucial, talvez ainda mais importante do que o etileno, na maturação e senescência (HAI-FENG *et al.*, 2011). Porém, ainda não há uma base molecular sólida que dê suporte aos mecanismos de regulação do amadurecimento de frutos não-climatéricos.

Outro hormônio vegetal de grande importância no desenvolvimento é o metil-jasmonato. Jasmonatos definem uma classe de compostos derivados de lipídios (figura 9) e estão envolvidos em processos como: senescência, florescimento e ação contra estresses (CID, 2005), através da expressão (CREELMAN *et al.*, 1992) de genes de defesa. Alguns estudos sugerem que os jasmonatos atuam como uma rede complexa de sinalização, com efeitos interativos (SCHMELZ *et al.*, 2003). Essas interações ajustam as respostas químicas e moleculares, podendo agir de modo sinérgico ou antagônico. Sinais sistêmicos e locais causam o acúmulo de jasmonatos, que, em conjunto com o etileno, ativam a expressão de genes em resposta a injúrias mecânicas. Mas pouco se conhece sobre os elementos intracelulares que interagem após essa cascata de regulação da expressão gênica.

Figura 9. Modelo esquemático da síntese de metil-jasmonato.

Além dessa atuação, os jasmonatos, principalmente o metil-jasmonato, são capazes de aumentar a produção de várias classes de compostos voláteis, através da expressão de genes que codificam as enzimas relacionadas às suas vias de biossíntese. Os jasmonatos também são capazes de induzir a síntese de diversos voláteis que podem apresentar notas aromáticas, sendo os possíveis reguladores da formação do aroma de flores e frutos, em conjunto com o etileno.

A aplicação de metil-jasmonato em morangos pode aumentar a produção de ésteres e a capacidade antioxidante, além de reduzir o índice de podridões nos frutos (AYALA-ZAVALA *et al.* 2005). Os efeitos desse hormônio sobre a síntese de compostos voláteis em maçãs, cultivar “Golden Delicious”, foram igualmente demonstrados. Quando o hormônio

foi aplicado em conjunto com 1-MCP, segundo os autores, tais efeitos foram inibidos. Isso indica que a produção de compostos voláteis do aroma, induzida pelo metil-jasmonato, deve ser mediada pelo etileno nos frutos climatéricos (KONDO *et al.*, 2005). Nesse mesmo estudo, o tratamento com metil-jasmonato não influenciou a formação de ésteres, classe de compostos cuja síntese após é induzida pelo tratamento com etileno, em frutos climatéricos.

Em pesquisas pós-colheita verificou-se que o metil-jasmonato promove a biossíntese de outros metabólitos secundários (KONDO *et al.*, 2005). Sua aplicação em nêspira, fruto não-climatérico, mostrou uma redução considerável na taxa respiratória (CAO *et al.*, 2009), apresentando menor gasto de açúcar e ácidos orgânicos, e aumento nos níveis de antioxidante, como consequência da formação de maiores teores de compostos fenólicos e flavonoides, o que influenciou a aparência geral do fruto. Em peras, a aplicação desse hormônio controlou o crescimento de mofo cinzento e reduziu a senescência (ZHANG *et al.*, 2009).

O ácido-indol-3-acético (AIA), da classe das auxinas, também é um hormônio importante para a formação de compostos voláteis do aroma. Suas ações mais estudadas, contudo, incluem a influência no desenvolvimento vegetal, atuando, por exemplo, na diferenciação, no alongamento celular e na abscisão foliar (KERBAUY, 2008) e no amadurecimento dos frutos. Estudos em *Arabidopsis* sugerem que a rota predominante acontece a partir do triptofano, que é convertido em ácido indol-3-pirúvico para posterior formação de AIA (figura 10).

Figura 10. Síntese de AIA a partir do triptofano. Adaptado do Grupo de Estudo e Pesquisa em Estaquia (GEPE), UFPR, K.C. Zuffellato-Ribas.

Também há uma via de formação de AIA que é independente do triptofano. Nela, o antralinato é o substrato utilizado (figura 11). Após ser produzido, o hormônio é transportado através dos tecidos vegetais e seu mecanismo de distribuição é essencial para o controle

temporal e espacial dos níveis de ácido-indol-3-acético. As proteínas que controlam a direção do transporte de AIA são: AUX/LAX e PIN-FORMED (PIN), respectivamente (PETRASEK e FRIML, 2009).

Figura 11. Síntese de AIA independente do triptofano. Adaptado do Grupo de Estudo e Pesquisa em Estaquia (GEPE), UFPR, K.C. Zuffellato-Ribas.

A sinalização de AIA ocorre através da interação desse hormônio com um complexo constituído de um receptor pertencente à família TRANSPORTER INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1) ou à AUXIN SIGNALING F-BOX (AFB) e um membro da família de proteínas repressoras transcricionais Aux/IAA, que faz parte do grupo de proteínas de resposta primária à auxina (figura 12). Também foi proposto que a sinalização possa acontecer através da proteína AUXIN-BINDING PROTEIN-1 (ABP1) (HESSE *et al.*, 1989), uma proteína localizada na membrana celular, mas cujo papel ainda não foi elucidado.

Figura 12. 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 por este hormônio (1). Através da interação de AIA com proteínas Aux/AIA e o receptor TIR1 de um complexo SCF, estes passam ao estado ativado e conectam moléculas de ubiquitina às proteínas Aux/AIA (2), que por sua vez, são degradadas pelo proteossomo 26S (3), possibilitando que os fatores de transcrição ARF, ligados a elementos de resposta à auxina (AuxRE), estimulem ou inibam a transcrição dos genes regulados por este hormônio (4). Os ARF são fatores de transcrição que contêm um domínio de ligação N-terminal DBD (DNA-BINDING DOMAIN) possibilitando sua ligação a um elemento de resposta à auxina denominado ARE (*Auxin-Responsive Element*) no promotor de genes responsivos ao hormônio, cuja sequência nucleotídica é TGTCTC (adaptado de Teale et al., 2006).

Algumas evidências indicam que as auxinas agem como um fator regulatório negativo na expressão dos genes envolvidos na biossíntese de compostos voláteis. A caracterização de uma enona oxidoredutase (FaEO), 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 em relação à inibição de 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 *et al.*, 2007).

O AIA também atua em oposição à regulação positiva exercida durante o desenvolvimento do fruto, prevenindo o amadurecimento e a dispersão antecipada de sementes (SUNDBERG & ØSTERGAARD, 2009). Estudos realizados com diversos frutos, dentre os quais o morango, sugerem a participação de auxinas no processo de amadurecimento, através da influência na expressão de genes que codificam enzimas que

participam de diversos eventos bioquímicos, como: metabolismo de ácidos orgânicos, síntese e degradação de pigmentos, e metabolismo do amido (PURGATTO *et al.*, 2001).

Os fatores regulatórios envolvidos no amadurecimento de frutos não-climatéricos ainda são pouco claros. Contudo, sabe-se que o etileno deve exercer um papel menor quando comparado ao observado em frutos climatéricos. Assim, muitos estudos visam outros hormônios vegetais como possíveis reguladores dessa classe de frutos e da produção de compostos voláteis do aroma.

1.3. O Morango

Um dos frutos não-climatéricos mais estudados é o morango, junto à uva, devido ao seu alto valor comercial. Com aparência atraente, sabor e aroma agradáveis, e propriedades nutritivas; o morango é um fruto apreciado no mundo inteiro, sendo uma ótima fonte de vitamina C e flavonoides, além do alto teor de antocianinas (TAIZ, ZEIGER, 2007).

Pseudofruto proveniente da família *Rosacea*, gênero *Fragaria*, com cerca de 12 espécies atualmente conhecidas e caracterizadas, sua parte comestível é originária do receptáculo floral, que se torna carnoso e suculento (figura 13). Os frutos verdadeiros são os pequenos aquênios, popularmente chamados de sementes. É um fruto não-climatérico e de clima temperado, exigindo em sua conservação produtos que não alterem suas características sensoriais (NEVES FILHO, 1986; HENRIQUE & CEREDA, 1999). Tem sido comercializado *in natura*, congelado ou desidratado (PASSOS *et al.*, 2004; GIMENEZ, ANDRIOLO & GODOI, 2008) e os principais açúcares encontrados no receptáculo são glicose, frutose e sacarose.

Figura 13. Representação do receptáculo floral (origem do pseudofruto) e dos aquênios (fruto verdadeiro).

A produção de morangos no Brasil possui grande importância social, pois atrai um grande contingente de mão de obra e tem incorporando tecnologias que favorecem à produção de frutos com melhor qualidade e possibilidade de exportação. Na última década, verificou-se um interesse crescente pela implantação da cultura, justificado pela grande rentabilidade quando comparada a outros cultivos. No Estado de Minas Gerais (MG), por exemplo, em toda a cadeia produtiva estão envolvidas, direta e indiretamente, mais de 30 mil pessoas (CARVALHO, 2006).

Os programas brasileiros de melhoramento genético de morangueiro tiveram início em 1941, no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Ao final da década de 60 a produção havia aumentado seis vezes, em função dos novos clones e das técnicas de produção de matrizes isentas de vírus (CASTRO, 2004). Mas, atualmente, não existe um programa semelhante em andamento no país. As últimas variedades introduzidas e cultivadas no país derivam de pesquisas realizadas nos Estados Unidos, especialmente nas universidades da Califórnia e da Flórida.

A colheita do morango é a operação mais delicada de todo o ciclo da cultura. Os pseudofrutos são muito perecíveis e pouco resistentes devido à epiderme delicada, à grande porcentagem de água e ao alto metabolismo respiratório. Caso não sejam utilizadas técnicas corretas de colheita e pós-colheita, as perdas podem ser elevadas. Se os frutos forem colhidos muito maduros, poderão chegar em decomposição ao mercado; se forem colhidos ainda “verdes”, terão alta acidez, alta adstringência e ausência de aroma. Em ambos os casos, o produto chega ao mercado com baixo valor comercial (CANTILLANO, 2008).

A produção comercial do morango ocorre em vários estados brasileiros graças à adaptabilidade dos diversos cultivares introduzidos no país. Esse cultivo, cuja safra possibilita produção de março a dezembro, apresenta-se com um mercado bastante atrativo para seu consumo *in natura*, ou através de diferentes modos de processamento (SATO & ASSUMPÇÃO, 2002). As regiões produtoras brasileiras iniciam o plantio durante os meses de março a maio, com a produção concentrando-se nos meses de junho a novembro (CAMARGO FILHO *et al.*, 1994). Normalmente o plantio do morangueiro, para a produção de frutos, deve ser feito de fevereiro a maio (GROPPO, TESSARIOLI NETO & BLANCO, 1997).

O maior produtor mundial são os Estados Unidos, sendo que a Califórnia concentra 80% da produção norte-americana de morango. Os maiores exportadores desse fruto são Espanha, Itália e Estados Unidos; e a Alemanha é o maior importador. No Brasil, a produção é voltada ao mercado interno tanto para o consumo *in natura* quanto para a industrialização, tendo os Estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul como os principais produtores. A produção de morango gera grandes oscilações de preços devido à oferta irregular do produto ao mercado. Estima-se que a produção nacional de morangos seja de aproximadamente 105 mil toneladas por ano (ANTUNES *et al.*, 2014).

As principais cultivares provêm dos Estados Unidos, destacando-se: “Aromas”, “Camarosa”, “Dover”, “Oso Grande” e “Sweet Charlie”, sendo a cultivar “Milsei-Tudla” proveniente da Espanha. As cultivares “Bürkley”, “Santa Clara” e “Vila Nova” foram produzidas pela Embrapa Clima Temperado, através de melhoramento genético e a cultivar “Campinas” provêm do Instituto Agrônomo de Campinas (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

O aroma do morango é uma de suas principais características sensoriais, um critério importante para a definição de seu valor de mercado. Seu *flavor* característico contribui significativamente para o seu sabor e se deve à presença de compostos voláteis sintetizados principalmente nos estágios finais de maturação. Tais compostos resultam de uma complexa

interação entre diversas substâncias, principalmente entre açúcares, ácidos orgânicos e compostos voláteis (AWAD, 1993).

Os principais compostos voláteis do aroma nos morangos são os ésteres e pequenas quantidades de álcoois, cetonas, lactonas e aldeídos (FORNEY *et al.*, 2000). Os ésteres mais encontrados são: acetato de etila, butanoato de etila e hexanoato de etila. Esses compostos formam o aroma típico do morango (SILVA & NEVES, 1999). Outros, como cinamatos, metil-cinamatos, furanonas, furaneol, mesifurano e butiratos influenciam o aroma do fruto, provendo características específicas de cada cultivar (UBEDA *et al.*, 2012).

No processo de formação do aroma estão implicadas isoformas de lipoxigenases (LOXs), álcool desidrogenases (ADHs) e álcool aciltransferase (AAT), que foram caracterizadas como relevantes para a formação dos ésteres nos frutos (AHARONI *et al.*, 2000). A taxa de produção de compostos voláteis depende da atividade e especificidade das enzimas quanto a seus substratos. Essas enzimas não foram completamente descritas, mas há indícios de que essa via opere como em outros frutos, exceto quanto ao grau de dependência da sinalização do etileno para sua indução.

[EP1]

Ésteres voláteis são a maior classe de compostos que contribuem para o aroma de diversos frutos. Apresentam como precursores os ácidos graxos e são sintetizados a partir das álcool aciltransferases (AAT). Apenas uma álcool aciltransferase de morango (SAAT) foi clonada, purificada e caracterizada (AHARONI *et al.*, 2000), até o momento. Em experimentos realizados com morango e banana houve uma correlação entre especificidade do substrato e os ésteres voláteis presentes no aroma, sugerindo o papel determinante da AAT no *flavor* desses frutos (PEREZ *et al.*, 1996; DIXON & HEWETT, 2000). No morango, esse gene é exclusivamente expresso no tecido do receptáculo e a sua expressão aumenta de modo significativo durante a transição do estágio rosa para o vermelho total, durante o amadurecimento.

Os ácidos graxos são catabolizados por duas vias principais: β -oxidação e o sistema de lipoxigenase (LOX). Entre as funções associadas com o amadurecimento dos frutos, LOX está envolvida na geração de álcoois e aldeídos C6, que constituem os principais componentes aromáticos voláteis durante a fase de amadurecimento (CHEN *et al.*, 2004), e no desenvolvimento dos morangos. Os genes da via da lipoxigenase foram identificados em diversas espécies de frutas.

As informações aqui expostas são alguns dos poucos exemplos encontrados na literatura. Ainda existem várias lacunas a serem preenchidas, sobretudo quanto à influência desses hormônios ao longo do amadurecimento de frutos não-climatéricos, como o morango, alvo de estudo desse projeto. Do ponto de vista científico, o morango foi escolhido, pois existe uma vasta literatura em pós-colheita sobre esse fruto e um grande número de sequências gênicas em bases de dados de acesso aberto, fundamentais para o desenvolvimento do projeto, no tocante a análises de expressão dos genes envolvidos na produção de compostos voláteis do aroma.

Portanto, conhecer os possíveis fatores envolvidos nas interações bioquímicas que ocorrem no morango, e os genes afetados pelos diferentes hormônios vegetais, proverá uma base de conhecimento sólida para prováveis intervenções tecnológicas que visem aprimorar sua qualidade sensorial, já que a síntese de compostos voláteis influencia diretamente o *flavor* dos frutos.

2. Objetivo

Este projeto teve como objetivo avaliar os efeitos dos hormônios etileno, ácido abscísico (ABA), ácido-indol-3-acético (AIA) e metil-jasmonato (MJ) na produção de compostos voláteis do aroma, e identificar as vias metabólicas afetadas pelos principais grupos de hormônios vegetais no morango (*Fragaria x ananassa*).

3. Material e Métodos

3.1. Amostras e tratamentos hormonais

Os morangos (*Fragaria X ananassa*), cultivar Albion, foram obtidos em Senador Amaral - MG, e fornecidos pela empresa MAPE Frutas. A colheita ocorreu no ponto branco de maturação e os frutos foram transportados para o Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos da FCF-USP em caixas de isopor contendo barras de gel térmico. Os frutos foram lavados em água corrente e mantidos em solução de hipoclorito de sódio, 1% (v/v), durante 1 minuto. Em seguida, foram lavados novamente com água e secos. Após esse processo, foi feita a seleção dos frutos no ponto correto de maturação para o experimento. Houve descarte de morangos com injúrias e/ou em estágio de maturação avançado, para que pudéssemos efetuar as aplicações hormonais.

Os tratamentos seguiram protocolos otimizados anteriormente em nosso laboratório, com base na literatura. A aplicação de etileno ocorreu através da exposição dos frutos a 10 ppm, em imersão gasosa, durante 24h. As concentrações utilizadas para ABA, AIA e MJ foram testadas em ensaios prévios de dose-resposta, 100µM. Esses hormônios foram aspergidos nos morangos e, após 12h, houve nova aspersão. O grupo controle foi aspergido apenas com solução tampão, também com duas aplicações ao longo de 24h (figura 14).

O armazenamento foi feito em caixas acrílicas, a 20°C, que permaneceram abertas para a devida circulação de ar, com umidade relativa de 80%. Todos os grupos tiveram suas polpas congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -80°C para análises posteriores. O experimento foi conduzido até os primeiros sinais de senescência e/ou utilização de todos os frutos para as coletas diárias. Assim, o experimento foi dividido em grupos, com cerca de 110 morangos para cada: Controle, Ácido Abscísico (ABA), Ácido-Indol-3-Acético (AIA), Etileno e Metil Jasmonato (MJ).

Figura 14. Representação esquemática do experimento. Após a colheita, os frutos dos grupos ABA, AIA e MJ foram submetidos a aspersão de solução com o respectivo hormônio diluído, com duas aspersões no total, sendo uma a cada 12h. O grupo CONTROLE foi aspergido com solução tampão pelo mesmo método, e o grupo ETILENO foi exposto ao etileno gasoso por 24h. Amostras de cada tratamento foram congeladas diariamente para análises posteriores.

3.2. Produção de CO₂ e etileno

A estimativa da produção de etileno foi realizada através de amostras de ar coletadas do interior de frascos devidamente vedados e com volume conhecido, contendo uma massa também conhecida de frutos, após o período de 1 hora de equilíbrio do *headspace* do frasco. Estas amostras foram injetadas em um cromatógrafo a gás da Hewlett-Packard modelo GC-6890 equipado com detector por ionização de chama (FID). A coluna utilizada foi a HP-Plot Q (30 m, D.I. 0,53 mm). O volume de injeção foi de 1 mL e para injetar tal quantidade de ar, foi empregado o modo de injeção *pulsed splitless*, desenvolvido pela Hewlett-Packard, opcional das válvulas de injeção com EPC (*Electronic Pressure Control*) utilizadas nos modelos de cromatógrafo a gás desta empresa.

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, Air Liquid.

3.3. Análise da cor

A cor dos frutos foi analisada conforme descrito por Murti et al. (2013), através do colorímetro Chroma Meter CR-400/410, Konica Minolta, com medições diárias. O aparelho foi calibrado para o espaço de cores $L^* a^* b^*$, em que “L” representa o grau de luminosidade das cores medidas, “a” expressa o grau de variação entre vermelho e verde, e “b” expressa o grau de variação entre o azul e o amarelo. Os valores a^* e b^* foram utilizados para calcular o ângulo Hue ($^{\circ}h^* = \arctg(b^*/a^*)$), que corresponde a uma circunferência cujos ângulos 0° , 90° , 180° e 270° representam, respectivamente, as cores vermelha, amarela, verde e azul. Foram utilizados três frutos por grupo com 6 medições em cada um.

3.4. Análise do perfil de compostos voláteis

A análise de voláteis baseou-se no método de micro-extração em fase sólida (SPME) proposto por Pesis et al. (2009). Essa técnica requer uma resina de carboxeno, divinilbenzeno e polidimetilsiloxano de $100\mu\text{m}$ de espessura, Supelco® (CAR/DVB/PDMS). Aproximadamente 5g de polpa de uma mistura de cinco frutos foram acrescidos de 7 mL de solução de NaCl a 30% (p/v) em *vial* de 20mL com tampa magnética e septo de silicone. Os *vials* foram congelados a -20°C para posterior análise via CG-MS. Para cada tratamento, fez-se coletas em triplicata.

Os *vials* ficaram em agitação magnética durante 15 minutos, a 40°C , para o descongelamento da polpa e acumulação de voláteis do aroma. Após esse período, a fibra para SPME foi introduzida no *vial* e ficou exposta ao *headspace* por 30 minutos (figura 15), para a efetiva adsorção dos voláteis de aroma presentes. Após a captura, os voláteis foram dessorvidos da fibra pela exposição ao calor do injetor do cromatógrafo, durante 3 minutos a 200°C .

Figura 15. Representação esquemática da extração de compostos voláteis do aroma por SPME.

Foi utilizado o cromatógrafo Hewlett-Packard, modelo 6890, acoplado a um detector seletivo de massas, modelo 5973 (CG-MS). O método de análise aplicado no cromatógrafo

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. Os espectros de massa obtidos foram comparados com os da biblioteca NIST, versão 1.6, e considerados apenas aqueles com índice de similaridade acima de 70%.

3.4.1 Otimização do método (SPME)

Para tornar a análise de voláteis do aroma mais eficiente, adquirimos morangos comercializados em ponto de maturação próximo ao ponto em que seriam colhidos, e os seguintes testes foram realizados:

- i. Quantidade de amostra no *vial*: 3 e 5g.
- ii. Concentração da solução de NaCl: 20 e 30%.
- iii. Tempo de equilíbrio entre a amostra e os voláteis no *headspace* do *vial*: 10 e 15 minutos.
- iv. Tempo de exposição da fibra no *headspace*: 30, 40 e 50 minutos
- v. Temperatura de aquecimento: 25, 30 e 40°C.

O critério utilizado para a avaliação desses parâmetros foi baseado na qualidade dos cromatogramas gerados, considerando número, tamanho e área dos picos. A temperatura e o tempo de exposição da fibra no *headspace* foram os parâmetros que mais contribuíram para a qualidade dos picos: quanto maior a temperatura e o tempo, melhor foi a qualidade observada.

A solução de NaCl também foi um fator importante nesta técnica, pois além de facilitar a liberação dos voláteis, contribuiu para a prevenção da degradação de compostos da amostra, através da inativação enzimática.

Através dos testes efetuados para a extração de voláteis do morango via SPME, os seguintes parâmetros foram selecionados:

- i. Quantidade de amostra no *vial*: 5g.
- ii. Concentração da solução de NaCl: 30%.
- iii. Tempo de equilíbrio entre a amostra e os voláteis no *headspace* do *vial*: 15 minutos.
- iv. Tempo de exposição da fibra no *headspace*: 30 minutos.
- v. Temperatura de aquecimento: 40°C.

3.5. Análise de expressão gênica por qRT-PCR

3.5.1. Extração de RNA, purificação e síntese de cDNA

A extração de RNA total do morango foi feita a partir de amostras armazenadas a -80°C. O fruto foi triturado em nitrogênio líquido e, em seguida, utilizou-se o Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen™) gelado, conforme protocolo do fabricante. A verificação da qualidade do RNA extraído foi feita através de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com GelRed™ concentrado, diluição 1:500 (v/v), e visualizado sob luz ultravioleta. Observou-se a integridade das bandas 18S e 28S do RNA ribossomal. A extração foi feita em triplicata técnica, para cada tratamento.

Para purificação e eliminação de contaminantes de DNA genômico, as amostras foram tratadas com DNase seguindo o kit Ambion® DNA-free™ DNase Treatment & Removal Reagents, Invitrogen, e o manual fornecido pelo fabricante.

A quantidade de RNA foi calculada por espectrofotometria (SAMBROOK *et al.*, 1989), considerando que uma amostra com 40 µg/mL de RNA apresenta valor de absorbância de 1 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 síntese do cDNA, o protocolo utilizado foi o do kit ImProm-II™ Reverse Transcription System, Promega, baseado na utilização de uma transcriptase reversa e de Oligo(dT)₁₅ como *primer*. A reação iniciou-se a partir de 500 ng de RNA total, quantificado nas amostras.

3.5.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Inicialmente, foram realizadas análises para testar a especificidade dos *primers* com a amostra, assim como uma otimização das condições, como concentração de cDNA e *primers*, para as amplificações de cada fragmento para os genes escolhidos (tabela 1). Para as reações de PCR em Tempo Real, utilizou-se o kit SYBR® Green RTPCR da Applied Biosystems, sendo as amplificações realizadas em um termociclador QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System, Applied Biosystems. As amostras foram aplicadas em triplicata, juntamente com um controle positivo da reação (pool de amostras). As condições da corrida seguiram as recomendações de Wang *et al* (2016), com modificações. O equipamento foi programado para 95°C por 5min, 60 ciclos de 95°C por 15s, 60°C por 30s e 72°C por 30s. Os valores de Ct para todos os genes foram normalizados utilizando-se os valores de Ct na leitura do gene constitutivo (GAPDH) de cada amostra.

Tabela 1. *Primers* utilizados nas análises de qRT-PCR

GENE	SENTIDO	SEQUÊNCIA
ADH	FORWARD	5'-CCAGCTATGATTTCAACCAACGTGTA-3'
	REVERSE	5'-CCAAAAACCACTCATTGATTCCAGTT-3'
AAT	FORWARD	5'-CAAGTCAACGTTTTTCGATTCTGGAA-3'
	REVERSE	5'-GATATTTTCACGACACCCTCGAAA-3'
SAAT	FORWARD	5'-ATGCCGTCACTGGTTTTCTC-3'
	REVERSE	5'-GTGCCCACCAGAACAAGTTT-3'
FaAAT2	FORWARD	5'-TGTGGAGGTGAGAGGACGACCCC-3'
	REVERSE	5'-TGGCAAGCATACTGGCACCAAGATTTC-3'
LOX	FORWARD	5'-ACAAGGGTCCAGAATATGAACG-3'
	REVERSE	5'-AAACTTCACGTGGCCAAACC-3'
FvPINS	FORWARD	5'-AGGAGCTGACAAAGCAAGGA-3'
	REVERSE	5'-AAAGACACGACGGAAAGCAT-3'
PINS1	FORWARD	5'-TGAATACGGGGTTTCAGAGC-3'
	REVERSE	5'-TCATCAGTTTTCCGACATGC-3'
FaNES1	FORWARD	5'-TGGGACGATTTAGGAAGTGC-3'
	REVERSE	5'-TGAATGATGCTGGAAATGGA-3'
FaOMT	FORWARD	5'-GACGGAGCAGGAATTTGAAG-3'
	REVERSE	5'-GCAAAACCAAGACCAGTCTCTT-3'
FaQR	FORWARD	5'-CTTCCCTTGGCTATTGAAACTG-3'
	REVERSE	5'-CACCCAAGGTTCTCAAGAAATC-3'
ACT	FORWARD	5'-GGGATGACATGGAGAAGATTTGGC-3'
	REVERSE	5'-TCTCACGATTAGCCTTGGGATTTCAG-3'

DBP	FORWARD	5'-TTGGCAGCGGGACTTTACC-3'
	REVERSE	5'-CGGTTGTGTGACGCTGTCAT-3'
GAPDH	FORWARD	5'-CCAAGGCTGTCTCGGAAAGGTT-3'
	REVERSE	5'-CAACATCATCTTCGGTGTAACCC-3'
HISTH4	FORWARD	5'-GTGGCGTCAAGCGTATCTCC-3'
	REVERSE	5'-TGTCCTTCCCTGCCTCTTGA-3'

Para o cálculo de expressão gênica relativa, utilizou-se como referência o dia da colheita dos frutos (dia zero). Através da equação: $R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ e $R = 2^{-[\Delta C_t \text{ amostra} - \Delta C_t \text{ controle}]}$, em que $\Delta C_t \text{ amostra}$ é a diferença entre o C_t do gene alvo e o C_t do gene constitutivo nas amostras de cada ponto analisado; $\Delta C_t \text{ controle}$ é a diferença entre o C_t do gene alvo e o C_t do gene constitutivo nas amostras de referência.

4. Resultados e Discussão

4.1. Colorimetria

Os morangos foram colhidos entre os pontos branco e rosa de maturação. Quando totalmente verde, ao ser retirado da planta, o morango não consegue dar continuidade ao seu desenvolvimento, apresentando altas taxas de acidez e adstringência, além de ausência de aroma. Mas, ao ser colhido no ponto branco, por ser a primeira etapa do seu amadurecimento, o fruto atinge os estádios de maturação normalmente.

Após cinco dias, o morango apresentou coloração característica de fruto sobremaduro e perda de firmeza, principalmente no controle. Isso ocorre devido à diminuição da luminosidade e do ângulo de matiz (figura 16), tornando os frutos mais escuros e avermelhados.

Figura 16. Análise de cor em morangos (*Fragaria X ananassa*), cultivar Albion, para os tratamentos controle (C), ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), etileno (E) e metil jasmonato (MJ), armazenados por 5 dias, contando o dia zero (D. Zero), a 20°C.

No primeiro dia após o tratamento, os grupos estavam semelhantes, com tonalidade ligeiramente rosada e ângulo hue abaixo de 70°. No segundo dia todos os grupos se aproximaram um pouco da cor vermelha, com ângulo hue entre 30° e 45°, mas os frutos tratados com AIA apresentaram proximidade menor e ângulo hue em torno de 65°. No terceiro dia ocorreu o mesmo evento do dia anterior. Já no quarto dia após o tratamento, todos os frutos ficaram vermelhos, com variações de tonalidade e ângulo hue entre 20° e 30°.

Em relação ao controle, a diferença mais significativa ocorreu no terceiro dia, pois o grupo AIA apresentou aumento do ângulo de matiz, provavelmente devido à diferença de luminosidade ao longo do amadurecimento. Os morangos tratados com ABA e etileno também estavam com ângulo hue maior do que o do controle, no dia citado.

Os frutos tenderam para a cor vermelha ao longo do experimento em todos os grupos (figura 17). Isso ocorre pela presença de antocianinas, sendo a pelargonidina-3-glucosídeo e a cianidina-3-glicosídeo as mais abundantes no morango (AZEVEDO, 2007).

Figura 17. Fotos dos morangos da cultivar Albion, grupos Dia zero, Controle, ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), etileno (E) e metil jasmonato (MJ).

4.2. Produção de Etileno e CO₂

O perfil de produção de etileno (figura 18) foi semelhante em todos os grupos até o dia três, quando o grupo MJ apresentou um pico maior de produção em relação aos outros tratamentos. Isso indica que o metil-jasmonato pode induzir a síntese de etileno em frutos não-climatéricos. O mesmo foi verificado em estudos com morangos chilenos (*Fragaria chiloensis*). Ao sofrerem aplicação de metil-jasmonato, no estágio branco de maturação, houve um aumento na atividade da ACC oxidase (ACO), envolvida na etapa final da biossíntese de etileno (CONCHA *et al.*, 2013).

Figura 18. Perfil de produção de etileno.

A intensidade respiratória é uma medida importante do metabolismo do fruto, sendo muitas vezes considerado um parâmetro para a avaliação do tempo de armazenamento, pois altas taxas respiratórias indicam uma curta vida pós-colheita (HARLLER *et al.*, 1941). Os padrões respiratórios (figura 19) dos frutos tratados foram diferentes do controle, principalmente no dia três, quando houve um pico da produção de CO₂ apenas nesse grupo. O tratamento com MJ, apesar do alto estímulo na produção de etileno, não induziu alterações na respiração. O mesmo padrão foi encontrado em estudo que relaciona a aplicação de metil-jasmonato com a capacidade antioxidante de morangos (AYALA-ZAVALA *et al.*, 2005).

Figura 19. Perfil da taxa de CO₂.

4.3. Perfil de Compostos Voláteis

O aroma típico do morango resulta, principalmente, do conteúdo de ésteres voláteis formados ao longo do amadurecimento. A maioria dos compostos voláteis detectados durante todo o experimento deriva da transformação de ácidos graxos. Foram identificados 65 compostos voláteis do aroma (tabela 2) e cada composto recebeu uma codificação para facilitar a leitura dos gráficos de Análise de Componentes Principais (ACP), que permitem uma visualização global dos efeitos hormonais sobre o tipo e quantidade de cada composto.

Tabela 2. Descrição dos compostos voláteis do aroma encontrados em morangos dos grupos controle e tratados com hormônios. (*)

Composto Volátil	CAS	Fórmula molecular	Formação orgânica	Nota aromática	Precursor	Legenda
<i>Butanoato de metila</i>	623-42-7	C ₅ H ₁₀ O ₂	Éster	Frutado	Ácidos graxos	A
<i>Butanoato de etila</i>	105-54-4	C ₆ H ₁₂ O ₂	Éster	Frutado	Ácidos graxos	B
<i>Hexanoato de metila</i>	106-70-7	C ₇ H ₁₄ O ₂	Éster	Frutado	Ácidos graxos	C
<i>Hexanoato de etila</i>	123-66-0	C ₈ H ₁₆ O ₂	Éster	Frutado	Ácidos graxos	D
<i>Acetato de hexila</i>	142-92-7	C ₈ H ₁₆ O ₂	Éster	Frutado	Ácidos graxos	E
<i>Propanoato de 3-hexila-(Z)</i>	33467-74-2	C ₉ H ₁₈ O ₂	Éster	Herbáceo	Ácidos graxos	G
<i>Óxido de Linalol – (E)</i>	34995-77-2	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	Álcool (monoterpeno)	Adocicado, amadeirado, floral	Carotenoides	H
<i>Linalol</i>	78-70-6	C ₁₀ H ₁₈ O	Álcool (monoterpeno)	Floral	Carotenoides	I
<i>Fenil-metil-acetato</i>	140-11-4	C ₉ H ₁₀ O ₂	Éster	Floral, frutado	Aminoácidos	J
<i>Heptanoato de metila</i>	106-73-0	C ₈ H ₁₆ O ₂	Éster	Floral, frutado	Ácidos graxos	K
<i>Butanoato de hexila</i>	2639-63-6	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	Éster	Frutado	Ácidos graxos	L
<i>Butanoato de 2-hexenila</i>	53398-83-7	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	Éster	Frutado, verde	Ácidos graxos	M
<i>Butanoato de propila</i>	105-66-8	C ₇ H ₁₄ O ₂	Éster	Frutado	Ácidos graxos	N
<i>2-metil-etil-butanoato</i>	7452-79-1	C ₇ H ₁₄ O ₂	Éster	Frutado, verde	Aminoácidos	O
<i>Hexanal</i>	66-25-1	C ₆ H ₁₂ O	Aldeído	Frutado, verde	Ácidos graxos	P
<i>Acetato de 3-metil-1-butila</i>	123-92-2	C ₇ H ₁₄ O ₂	Éster	Frutado	Aminoácidos	Q
<i>Acetato de pentila</i>	628-63-7	C ₇ H ₁₄ O ₂	Éster	Frutado	Ácidos graxos	R
<i>2-Hexenal</i>	505-57-7	C ₆ H ₁₀ O	Aldeído	Frutado, verde	Ácidos graxos	S
<i>1-Pentanol</i>						T
<i>Acetato de cis-3-hexenila</i>	3681-71-8	C ₈ H ₁₆ O ₂	Éster	Frutado, verde	Ácidos graxos	V
<i>Acetato de trans-2-hexenila</i>	2497-18-9	C ₈ H ₁₆ O ₂	Éster	Frutado	Ácidos graxos	W
<i>1-Hexanol</i>	111-27-3	C ₆ H ₁₄ O	Álcool	Herbáceo, amadeirado, frutado	Ácidos graxos	X
<i>2-Butanoato de, 3-hexenila</i>	65405-80-3	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	Éster	Frutado, verde	Ácidos graxos	Y
<i>3-Octenol</i>	3391-86-4	C ₈ H ₁₆ O	Álcool	Terroso, herbáceo	Ácidos graxos	Z

Composto Volátil	CAS	Fórmula molecular	Formação orgânica	Nota aromática	Precursor	Legenda
<i>alfa-Terpineol</i>	98-55-5	C ₁₀ H ₁₈ O	Álcool (monoterpeno)	Floral	Carotenoides	A1
<i>Álcool benzílico</i>	100-51-6	C ₇ H ₈ O	Álcool	Frutado, picante	Aminoácidos	B1
<i>2(3H)-Furanona, 5-dihidro-hexila</i>	706-14-9	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	Furanona	Frutado	Carboidratos	C1
<i>2-Heptenal</i>	2463-63-0	C ₇ H ₁₂ O	Aldeído	Verde	Ácidos graxos	D1
<i>cis-3-Hexenol</i>	928-96-1	C ₆ H ₁₂ O	Álcool	Folha verde	Ácidos graxos	E1
<i>trans-2-Hexenol</i>	2305-21-7	C ₆ H ₁₂ O	Álcool	Frutado, verde, adocicado	Ácidos graxos	F1
<i>Benzaldeído</i>	100-52-7	C ₇ H ₆ O	Aldeído	Amendoado	Aminoácidos	G1
<i>2-Acetil-5-metil-furano</i>	1193-79-9	C ₇ H ₈ O ₂	Cetonas	Nozes	Ácidos graxos	H1
<i>Nonanal</i>	124-19-6	C ₉ H ₁₈ O	Aldeído	Frutado, floral	Ácidos graxos	I1
<i>2-Octenal</i>	2363-89-5	C ₈ H ₁₄ O	Aldeído	Folha verde, frutado, floral	Ácidos graxos	J1
<i>Propanoato de 2-metil, 3-hexenila</i>	61444-38-0	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	Éster	Grama e tomate verdes	Aminoácidos	K1
<i>Salicilato de metila</i>	119-36-8	C ₉ H ₈ O ₃	Éster	Mentolado, picantem adocicado	Aminoácidos	L1
<i>Acetato de etila</i>	141-78-6	C ₆ H ₁₀ O ₂	Éster	Frutado	Ácidos graxos	N1
<i>Nerolidol</i>	7212-44-4	C ₁₅ H ₂₆ O	Álcool (sesquiterpeno)	Fresco, floral, frutado	Carotenoides	O1
<i>Óxido de Linalol – (Z)</i>	5989-33-3	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	Álcool (monoterpeno)	Floral, adocicado, amadeirado, terroso	Carotenoides	P1
<i>2-metil, butil, -propanoato</i>	97-87-0	C ₉ H ₁₈ O ₂	Éster	Fresco, frutado, floral	Aminoácidos	Q1
<i>Benzotiazol</i>	95-16-9	C ₇ H ₅ NS	Composto aromático heterocíclico	Floral	Aminoácidos	R1
<i>4-metil, metil-pentanoato</i>	2412-80-8	C ₇ H ₁₄ O ₂	Éster	Frutado	Aminoácidos	S1
<i>Acetato de metila</i>	79-20-9	C ₅ H ₈ O ₂	Éster	Frutado	Ácidos graxos	T1
<i>Propanoato de 2-Hexenila-(E)</i>	53398-80-4	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	Éster	Frutado	Ácidos graxos	U1
<i>2-Butanoato de metila-(E)</i>	623-43-8	C ₆ H ₁₀ O ₂	Éster	Frutado, verde	Ácidos graxos	V1
<i>Acetato de butila</i>	123-86-4	C ₈ H ₁₆ O ₂	Éster	Frutado	Ácidos graxos	X1
<i>3-Pentenona</i>	1629-58-9	C ₅ H ₈ O	Cetonas	Mostarda	Ácidos graxos	W1

2-metil, 2-metil, propil-propanoato	97-85-8	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	Éster	Frutado	Aminoácidos	Y1
2-metil, 3-metil, butyl-propanoato	2050-01-3	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	Éster	Frutado	Aminoácidos	Z1
1-Octanol	111-87-5	C ₈ H ₁₈ O	Álcool	Fresco, frutado	Ácidos graxos	A2
Isobutirato de 3-hexenila-(Z)	41519-23-7	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	Éster	Frutado, verde	Aminoácidos	B2
3(2H)-Furanona, 4-metoxi-2,5-dimetil	4077-47-8	C ₇ H ₁₀ O ₃	Furanona	Adocicado	Carboidratos	C2
3-Heptanona	106-35-4	C ₇ H ₁₄ O	Cetonas	Frutado, verde, adocicado	Ácidos graxos	D2
Butanoato de 3-hexenila	16491-36-4	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	Éster	Frutado, verde, amanteigado	Ácidos graxos	E2
3-Hexenol	4798-44-1	C ₆ H ₁₂ O	Álcool	Verde	Ácidos graxos	F2
Etil-2-butanato-(E)	623-70-110544-63-5	C ₈ H ₁₆ O ₂	Éster	Frutado, caramelizado, adocicado	Ácidos graxos	G2
Tiglato de etila	5837-78-5	C ₇ H ₁₂ O ₂	Éster	Frutado, adocicado	Aminoácidos	H2
3-metil, 1-butil-acetato	1191-16-8	C ₇ H ₁₂ O ₂	Éster	Frutado	Aminoácidos	I2
Benzoato de etila	93-89-0	C ₈ H ₁₀ O ₂	Éster	Frutado, floral	Aminoácidos	K2
2-fenil, etil-acetato	103-45-7	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	Éster	Floral, adocicado	Aminoácidos	L2
alfa-Murolene	10208-80-7	C ₁₅ H ₂₄	Hidrocarboneto (sesquiterpênico)	Amadeirado	Carboidratos	M2
Álcool fenil etílico	60-12-8	C ₈ H ₁₀ O	Álcool	Floral	Aminoácidos	N2
2-etil-hexanol	104-76-7	C ₈ H ₁₈ O	Álcool	Floral, adocicado	Aminoácidos	O2
2,6-Octadienoil, 3,7-dimetil-, acetato, (Z)	141-12-8	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	Éster	Floral, adocicado	Aminoácidos	P2
Fenilbenzeno	92-52-4	C ₁₂ H ₁₀	Hidrocarboneto aromático	Floral	Aminoácidos	Q2

(*) Identificação pela biblioteca NIST 2011. Descrição de acordo com *The Good Scents Company* e *Fenaroli's – Handbook of Flavor (2011)*.

4.3.1. Análise de Componentes Principais (ACP)

As ACPs foram calculadas através do software *XLSTAT*, a partir da matriz de correlação dos dados referentes às áreas normalizadas dos picos dos cromatogramas.

Os resultados dessa análise foram representados de forma bidimensional, pois os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2) são os que apresentam as informações mais relevantes. As variáveis que mais influenciam os CPs são as que se aproximam das extremidades dos eixos. Através desse parâmetro, foram escolhidos alguns componentes para a plotagem de histogramas e visualização detalhada dos efeitos dos tratamentos (tabela 3).

Figura 20A-D: Caracterização, através da Análise de Componentes Principais dos dias 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D), das amostras em relação aos compostos voláteis de morangos, da cultivar Albion, submetidos aos tratamentos hormonais. Grupo controle (C), grupo ácido abscísico (ABA), grupo ácido-indol-3-acético (AIA), grupo etileno (E), grupo metil jasmonato (MJ). Na figura A-D, as abreviações das amostras foram feitas da seguinte forma: nome do grupo, seguido de um número de 1 a 3, que representa uma das três replicatas técnicas. Exemplo: C1, primeira replicata técnica da análise de frutos do grupo controle.

Os compostos voláteis mais significativos para cada tratamento e cada dia, foram organizados na tabela abaixo.

GRUPO	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
Controle	Butanoato de metila Propanoato de 3-hexila-(Z) Óxido de Linalol (E) Linalol	Butanoato de metila Propanoato de 3-hexila-(Z) Linalol	Propanoato de 2-Hexenila-(E) 3-Pentenona	Hexanoato de metila Linalol, 2-Butanoato de Hexila
ABA	2-metil-etil butanoato, Acetato de trans-2-hexenila	2-Hexenal 1-Hexanol trans-2-Hexenol	Hexanoato de metila Acetato de hexila 3(2H)-Furanona, 4-metoxi-2,5-dimetil -	Etil-2-butanoato-(E) Tiglatato de etila 3-metil, 1-butil-acetato Benzoato de etila
AIA	1-Hexanol, Hexenal, 2-Hexenol	Metil-fenil-acetato cis-3-Hexenol	Óxido de Linalol (E) 1-Pentanol, Acetato de etila, Óxido de Linalol (Z) 3-Heptanona	Óxido de Linalol (E) Hexenal, 1-Hexanol trans-2-Hexenol Óxido de Linalol (Z) 3-Heptanona
Etileno	Hexanoato de etila Acetato de hexila Acetato de pentila	2-Hexenal 1-Hexanol cis-3-Hexenol	Butanoato de hexila Hexenal 1-Hexanol trans-2-Hexenol cis-3-Hexenol Acetato de metila	Butanoato de hexila 3-Octenol Benzotiazol, Fenilbenzeno
Metil Jasmonato	2-Acetil-5-metil-furano Nonanal	Hexanoato de etila 2-metil,etil-butanoato Acetato de cis-3-hexenila 4-metil,etil-pentanoato	Hexanoato de metila Acetato de hexila Alfa-Terpineol Benzaldeído, 3(2H)-Furanona, 4-metoxi-2,5-dimetil	Acetato de 3-metil-1-butila 2-fenil,etil-acetato

Tabela 3. Principais compostos voláteis do aroma detectados ao longo do experimento nos grupos controle, ácido abscísico (ABA), ácido-indol-3-acético (AIA), etileno e metil jasmonato (MJ).

Apenas o perfil de compostos voláteis do controle ficou diferente, quando comparado aos outros grupos. Isso mostra que, provavelmente, todos os tratamentos hormonais influenciaram o metabolismo de compostos voláteis do aroma de alguma maneira.

No dia quatro após o tratamento, o grupo AIA ficou na extremidade oposta ao controle, indicando a formação de compostos voláteis diferentes. Possivelmente o impacto causado pela auxina nas vias bioquímicas deve ser negativo em relação ao amadurecimento do fruto, pois o principal composto formado nesse dia foi o 1-hexanol (também presente em altos níveis no em AIA no dia um), que é um álcool C₆ proveniente da via da LOX. Esse álcool apresenta aroma herbal, não característico de morangos maduros, e é um precursor da formação de compostos aromáticos típicos de morangos, como o acetato de hexila.

Já no grupo controle ocorreu o oposto: o linalol, derivado da via de isoprenoides, foi o composto mais representativo no dia quatro. Ele apresenta um aroma doce e floral, característico de frutos maduros. Essa mesma ação do AIA foi observada em trabalhos feitos com tomate *Solanum lycopersicum* (BONATO, 2015), evidenciando que a atuação desse hormônio em frutos climatéricos e não-climatéricos pode afetar as mesmas vias bioquímicas relacionadas aos voláteis do aroma.

4.3.2. Gráficos com Áreas Normalizadas

Com o intuito de apresentar maiores detalhes sobre os efeitos dos hormônios nas vias de biossíntese de compostos voláteis do aroma, dados de áreas normalizadas de alguns dos componentes mais representativos nesse experimento, foram plotados em gráficos de barras (figuras 21 a 31), com base nos resultados apresentados nas ACPs.

Figura 21. Perfil comparativo de área normalizada de 1-Hexanol, ao longo dos 4 dias após os tratamentos hormonais para os grupos controle, ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), etileno e metil jasmonato (MJ). Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

O composto 1-hexanol é um álcool C₆ formado a partir de ácidos graxos, pela via da lipoxigenase, e apresenta odor herbal. Esse composto não foi detectado apenas no controle (figura 21). Sua maior produção ocorreu no grupo AIA nos dias um, três e quatro, após o tratamento, mostrando um possível atraso no amadurecimento do morango em relação à produção de compostos voláteis.

Figura 22. Perfil comparativo de área normalizada de 2-Hexenal, ao longo dos 4 dias após os tratamentos hormonais para os grupos controle, ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), etileno e metil jasmonato (MJ). Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

O composto 2-hexenal é um aldeído formado a partir de ácidos graxos, também pela via da lipoxigenase. Também não foi detectado no controle (figura 22). No primeiro dia após os tratamentos, foi encontrado em altos níveis no grupo AIA. Sua produção diminuiu nos outros dias, mas se manteve sempre em maior nível em AIA, com exceção do dia 2, em que foi ultrapassado pelo ABA. Esse resultado reforça a influência do AIA na via da LOX, pois, provavelmente, induziu a formação de 2-hexenal, diferentemente do que ocorre em tomate, por exemplo, como foi mostrado por Bonato (2015).

Nesse estudo com tomate, o aldeído citado foi identificado apenas no controle ao longo de todo experimento. Tal observação sugere uma diferença de atuação do AIA quanto à formação de aldeídos em frutos climatéricos e não-climatéricos, em uma das principais vias bioquímicas de síntese de compostos voláteis do aroma.

Figura 23. Perfil comparativo de área normalizada de trans-2-Hexenol, ao longo dos 4 dias após os tratamentos hormonais para os grupos controle, ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), etileno e metil jasmonato (MJ). Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

O composto trans-2-hexenol é um álcool C_6 derivado de ácidos graxos, pela via da LOX. Presente no dia zero, não aparece no controle (figura 23). Os frutos tratados com AIA apresentaram a maior produção desse álcool, principalmente nos dias um e quatro. No dia dois, os maiores níveis foram detectados nos grupos ABA e etileno. No dia três, os valores de AIA e etileno estavam parecidos. Novamente em contraste com o estudo de aroma em tomates (BONATO, 2015), o AIA parece influenciar a formação de C_6 voláteis, pela via da LOX. Segundo esse trabalho, álcoois provenientes dessa via são detectados nos frutos não tratados (controle) e nos frutos tratados com etileno.

Figura 24. Perfil comparativo de área normalizada de cis-3-Hexenol, ao longo dos 4 dias após os tratamentos hormonais para os grupos controle, ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), etileno e metil jasmonato (MJ). Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

O composto cis-3-hexenol é um álcool derivado de ácidos graxos. Presente no dia zero, não aparece no controle (figura 24). A maior produção desse composto ocorreu no grupo AIA, principalmente nos dias um e quatro. Para os frutos tratados com ABA, a taxa de produção desse álcool se mantém praticamente constante. Já para os grupos etileno e MJ, há uma redução importante no dia quatro. Novamente para um composto C₆, temos o AIA induzindo sua produção no morango, pela via da LOX, ao contrário do que foi visto em fruto climatérico (tomate), citado anteriormente. Os compostos C₆ voláteis são substratos para a formação de Acetato de hexila, que é característico do aroma em morango. Mas, mesmo com a ação do AIA na formação desses voláteis (figuras 21 a 24), não há maior produção de acetato de hexila nos frutos tratados com esse hormônio.

Figura 25. Perfil comparativo de área normalizada de Acetato de hexila, ao longo dos 4 dias após os tratamentos hormonais para os grupos controle, ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), etileno e metil jasmonato (MJ). Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

O acetato de hexila é um éster formado pela via da LOX, a partir de ácidos graxos, pela ação da AAT, sendo característico do aroma em morangos, principalmente nos estágios finais de maturação. Foi detectado no controle nos dias um e quatro (figura 25), diferentemente do que ocorreu com os compostos C₆ citados anteriormente, sendo que seu nível diminuiu no último dia nos grupos tratados.

A enzima AAT parece ser regulada negativamente pelos hormônios aplicados, pois os compostos C₆ voláteis foram acumulados nos frutos que receberam tratamento hormonal, o que não aconteceu no controle, havendo formação de éster. Também existe a possibilidade de os C₆ terem sido consumidos para a formação do acetato de hexila (figura 26) e, por isso, esses compostos não foram detectados no controle.

Figura 26. Representação simplificada da síntese de compostos voláteis do aroma pela via da Lipoxigenase (LOX).

Figura 27. Perfil comparativo de área normalizada de Linalol, ao longo dos 4 dias após os tratamentos hormonais para os grupos controle, ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), etileno e metil jasmonato (MJ). Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

O linalol é um álcool monoterpeneo formado pela via de terpenoides. Apresentou alta produção no controle em todos os dias, com maior taxa no dia quatro (figura 27).

Em estudos de aroma em mamões (DE FUSCO, 2015) e framboesas (MORO, 2013), os níveis de produção de linalol foram induzidos pelo metil-jasmonato, o que não ocorreu nos morangos. Esse resultado reforça a diferença existente na formação de compostos voláteis em frutos climatéricos e não-climatéricos. Nesse caso, os maiores níveis foram detectados nos grupos controle e etileno.

Figura 28. Perfil comparativo de área normalizada de Óxido de Linalol-(Z), ao longo dos 4 dias após os tratamentos hormonais para os grupos controle, ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), etileno e metil jasmonato (MJ). Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

O óxido de linalol-(Z) é um álcool monoterpene, proveniente da oxidação de linalol. Não apareceu no dia um, sendo sua maior produção no dia quatro no grupo AIA (figura28). Apenas nesse dia houve produção no grupo MJ. Como citado anteriormente, o nível de linalol, precursor do óxido de linalol, em mamões foi induzido pelo MJ, o que não ocorreu no morango.

O padrão de formação de linalol parece ser diferente do padrão de seu óxido, mas não se sabe ao certo se essa oxidação ocorre por uma linalol oxidase, ou por influência hormonal.

Figura 29. Perfil comparativo de área normalizada de 2-metil,etil-butanoato, ao longo dos 4 dias após os tratamentos hormonais para os grupos controle, ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), etileno e metil jasmonato (MJ). Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

O composto 2-metil-etil-butanoato é um éster metil-ramificado, formado a partir da degradação de aminoácidos e posterior esterificação. Também no dia quatro, o grupo ABA apresentou a maior taxa desse composto, que também aumentou em AIA, sendo que nos outros grupos houve uma diminuição (figura 29).

Figura 30. Perfil comparativo de área normalizada de Fenil-metil-acetato, ao longo dos 4 dias após os tratamentos hormonais para os grupos controle, ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), etileno e metil jasmonato (MJ). Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

O composto fenil-metil-acetato é um éster aromático derivado de aminoácidos, presente no dia zero e em todos os grupos nos dias um e quatro, com maior produção no último dia. No controle ocorreu maior produção no dia um (figura 30). No dia quatro, todos os grupos tiveram um aumento significativo na produção desse composto, principalmente nos frutos tratados com ABA e MJ.

Figura 31. Perfil comparativo de área normalizada de α -Terpineol, ao longo dos 4 dias após os tratamentos hormonais para os grupos controle, ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), etileno e metil jasmonato (MJ). Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

O composto α -terpineol é um álcool monoterpene proveniente de carotenoides, pela via não dependente de mevalonato. Presente no dia zero, seus níveis aumentaram apenas no dia quatro, quando ocorreu produção desse composto no controle (figura 31). No dia dois, houve a menor produção de α -Terpineol, e no dia três ocorreu diminuição apenas no grupo AIA. Esse álcool é típico de frutos em final de maturação, assim como mostra o gráfico acima.

Figura 32. Perfil comparativo de área normalizada de Nerolidol, ao longo dos 4 dias após os tratamentos hormonais para os grupos controle, ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), etileno e metil jasmonato (MJ). Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

O álcool sesquiterpeno nerolidol, proveniente da via de carotenoides, é sintetizado pela terpeno sintase FaNES1. Com maior taxa no dia três, grupo ABA, não esteve presente no controle ao longo do experimento. Mais uma vez foi possível observar que a síntese de compostos voláteis no morango foi afetada pelos diferentes tratamentos.

Figura 33. Perfil comparativo de área normalizada de Furanona (4-Hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona), ao longo dos 4 dias após os tratamentos hormonais para os grupos controle, ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), etileno e metil jasmonato (MJ). Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

O furaneol, também conhecido como “furanona do morango”, provém da via dos carboidratos e é responsável pelas características sensoriais específicas desse fruto. Presente nos estádios finais de maturação, é sintetizado pela FaOMT. Segundo o gráfico, esse composto apresentou maiores taxas nos dois últimos dias de experimento, principalmente no grupo MJ. Provavelmente esse hormônio induz o aumento de furaneol,

Segundo os gráficos apresentados, os hormônios aplicados, principalmente o AIA exógeno, são capazes de induzir a via da LOX para a formação de compostos voláteis C₆ em morangos. Esses hormônios provavelmente atuam na AAT, pois os compostos C₆ citados foram acumulados em todos os tratamentos, o que não ocorreu no controle, em que houve formação de éster a partir de ácidos graxos.

Também foi possível concluir que o MJ exógeno age de modo diferente em morangos, quando comparado com sua ação em mamões e em framboesas, em relação à via de terpenoides, pois apenas no morango não houve indução na formação de linalol.

5. Análise da expressão gênica

A avaliação da expressão relativa dos genes estudados possibilita aferir mudanças nas transcrições dos genes ao longo do amadurecimento do morango, tanto no período pós-colheita que acontece naturalmente, quanto na influência dos hormônios aplicados. A análise da transcrição reflete mudanças na ativação de vias metabólicas, podendo também ocorrer outros tipos de controle na atividade enzimática, como as regulações pós-transcricional e pós-traducional. Esse tipo de análise é fundamental para a compreensão das propriedades de regulação das vias de formação de compostos secundários, como os compostos voláteis do aroma.

Baseado nos resultados obtidos com os tratamentos observou-se efeitos mais pronunciados do AIA e do ABA na produção de compostos voláteis e, por esta razão, as análises de expressão gênica foram focadas nestes dois grupos, além do grupo controle. Os genes selecionados, com base na literatura (BIANCHI *et al.*, 2014; ZORRILLA-FONTANESI *et al.*, 2012; CUMPLIDO-LASO *et al.*, 2012; RAAB *et al.*, 2006), foram: álcool aciltransferase (AAT), álcool aciltransferase do morango (SAAT), *Fragaria vesca* monoterpeno sintase (FvPINS), *Fragaria vesca* sesquiterpeno sintase (PINS1), lipoxigenase (LOX), *Fragaria x ananassa* O-metiltransferase (FaOMT), *Fragaria x ananassa* quinona oxidoreductase (FaQR), álcool aciltransferase do morango (FaAAT2), *Fragaria x ananassa* nerolidol sintase 1 (FaNES1). De acordo com a literatura, estes genes teriam papel relevante na formação dos compostos que mais caracterizam o aroma do morango durante o amadurecimento do fruto, sendo: LOX, AAT, SAAT e FaAAT2 envolvidos na formação de voláteis de seis carbonos (álcoois, aldeídos e ésteres derivados, os denominados C6 voláteis); FvPINS, PINS1 e FaNES1, terpenóides; FaOMT e FaQR, furanóides.

Os genes constitutivos (*housekeeping*) escolhidos, também conforme a literatura (GALLI *et al.*, 2015), foram: actina (ACT), proteína de ligação ao DNA (DBP), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), histona H4 (HISTH4).

A análise de expressão relativa utilizou como parâmetro o dia em que os frutos foram colhidos e levados ao laboratório (dia zero), antes da aplicação dos hormônios.

Nos gráficos dos genes que codificam álcool aciltransferases (figuras 34 a 36), é possível notar que a expressão gênica é muito maior no dia quatro, no controle, o que é uma característica de fruto maduro. Para as outras álcool aciltransferases estudadas, podemos concluir que os tratamentos diminuíram a expressão gênica de forma negativa, quando comparados com o controle.

Figura 34. Expressão relativa do gene Álcool aciltransferase em morangos da cultivar Albion.

Figura 35. Expressão relativa do gene Álcool aciltransferase de morango em morangos da cultivar Albion.

Figura 36. Expressão relativa do gene Álcool aciltransferase de morango em morangos da cultivar Albion.

Figura 37. Expressão relativa do gene *Fragaria vesca* monoterpene sintase em morangos da cultivar Albion.

Figura 38. Expressão relativa do gene *Fragaria vesca* sesquiterpeno sintase em morangos da cultivar Albion.

Figura 39. Expressão relativa do gene *Fragaria x ananassa* nerolidol sintase 1 em morangos da cultivar Albion.

Figura 40. Expressão relativa do gene Lipoxigenase em morangos da cultivar Albion.

Figura 41. Expressão relativa do gene *Fragaria x ananassa* O-metiltransferase em morangos da cultivar Albion.

Figura 42. Expressão relativa do gene *Fragaria × ananassa* quinona oxidoreductase em morangos da cultivar Albion.

Houve diferença apenas na expressão do gene FaNES1 (Figura 39), indicando um possível aumento da atividade enzimática nos grupos tratados, principalmente em ABA.

Para a lipoxigenase (Figura 40), os tratamentos também parecem ter regulado negativamente a expressão gênica, ao serem comparados com o controle. Isso ocorreu principalmente no grupo AIA, pois, a partir do segundo dia após a aspersão hormonal, não foi mais detectado.

Os genes FaOMT e FaQR (Figuras 41 e 42) são responsáveis pela formação de furanonas, que atribuem as características sensoriais específicas aos morangos. Também foi observada a menor expressão desses genes, principalmente no grupo AIA. Os morangos tratados com ABA tiveram uma expressão gênica próxima a do controle.

Em síntese, os resultados sugerem que o hormônio AIA é capaz de regular negativamente diversos genes responsáveis pela formação de compostos voláteis do aroma, com impacto direto sob a formação de vários compostos característicos no morango. O hormônio ABA também regulou alguns genes negativamente, mas não mostrou uma diferença significativa entre o grupo tratado e o controle.

6. Conclusões

A aplicação exógena (aspersão) dos hormônios vegetais em morangos influenciou a biossíntese de compostos voláteis do aroma, quando comparados ao Controle, principalmente em relação à via da LOX, devido à maior formação de compostos voláteis C₆, que são precursores de compostos típicos do aroma em morangos.

A aparência dos frutos esteve melhor no grupo MJ, provavelmente devido à ação de defesa contra estresses bióticos. Os grupos ABA e Etileno apresentaram um padrão de maturação semelhante ao grupo C, identificado apenas visualmente. Já no grupo AIA, foi possível notar um atraso no acúmulo de pigmentos, principalmente devido à grande diferença no ângulo de matiz, em relação aos outros tratamentos, e à formação tardia de compostos voláteis característicos de frutos maduros, como terpenos e furanonas.

Sabe-se que o etileno regula positivamente, em frutos climatéricos como o tomate, a transição da cor e a formação de compostos voláteis característicos de frutos maduros. O AIA interfere com este metabolismo atrasando a formação da cor vermelha em frutos de tomateiro. Com as análises biomoleculares, pudemos inferir que isso também ocorre em frutos não-climatéricos, reforçando a hipótese de que os efeitos decorrentes do tratamento com AIA podem decorrer de um *crosstalk* com o etileno.

Os gráficos também sugerem que o AIA é capaz de regular negativamente diversos genes responsáveis pela formação de compostos voláteis do aroma, com impacto direto sob a formação de vários compostos característicos no morango. O hormônio ABA também regulou alguns genes negativamente, mas não mostrou uma diferença significativa entre o grupo tratado e o controle.

Os resultados obtidos até o momento mostram que existe uma ação dos hormônios estudados em frutos não-climatéricos, com variados graus de impacto sobre os diferentes aspectos do amadurecimento, principalmente sobre a formação de compostos voláteis do aroma.

7. Referências Bibliográficas

Academy of Science of the United States of American, Washington, v.100, 10552-10557, 2003.

Aharoi, A., Keizer, L.C., Sun, Z., Avarez-huerta., Blaas, J., Van Tunen, A.J., O'CONNELL, A.P. Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell*, v. 12, p. 647-662, 2000.

Alexander, L., Grierson, D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*. 53, 2039-2055, 2002.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, v. 215, p. 403– 407, 1990.

Ammuaysin, N., Jones, M.L. Changes in activities and gene expression of enzymes associated with cell wall modification in peels of hot water treated bananas. *Scientia Horticulturae*.142, 98–104, 2012.

Awad, M. Fisiologia pós-colheita de frutos. 1ª Ed. Nobel. São Paulo, 1993.

Ayala-zavala, J. F., Wang, S. Y., González-aguiar, G. A. Methyl jasmonate in conjunction with ethanol treatment increases antioxidant capacity, volatile compounds and postharvest life of strawberry fruit. *Eur. Food. Res. Technol.* 221, 731–738, 2005.

Barry, C.S., Giovanni, J.J. Ethylene and Fruit Ripening. *J Plant Growth Regul*, 26:143–159, 2007.

Binder, B.M. The ethylene receptors: Complex perception for a simple gas. *Plant Science*,175, 8–17, 2008.

Black, M. 1991. Involvement of ABA in the physiology of developing and mature seeds. *In: Absciscic acid physiology and biochemistry*. BIOS Scientific Publisher, Lancaster-UK. p. 99-124.

Blanch, G. P., Flores, G., Castillo, M. L. C. Influence of methyl jasmonate in conjunction with ethanol on the formation of volatile compounds in berries belonging to the Rosaceae. *Post. Biol. Technology*, 62, 168–178, 2011.

Bleecker, A.B., Kende, H. Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16:1–18, 2000.

Bonato, V.C., Interação etileno-auxina e sua influência na produção de compostos voláteis do aroma durante o amadurecimento do tomate (*Solanum lycopersicum*). Dissertação para obtenção do título de mestre pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, SP, 2015.

Bood, K.G., Zabetakis, I. The biosynthesis of strawberry flavor (II): biosynthetic and molecular biology studies. *J. Food Sci.* 67, 2–8, 2002.

Brackmann, A; et al. Qualidade da maçã cv. Gala tratada com 1-metilciclopropeno. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.34, n.5, p.1415-1420, set-out, 2004.

Camargo Filho, W. P.; Mazzei, A. R.; Camargo, A. M. P.; Anapalos, L. C. Estacionalidade dos preços e das quantidades de frutas olerícolas: melancia, melão e morango, 1987 - 91. *Horticultura Brasileira*, v. 12, n. 1, p. 75, 1994.

Cantillano, R. F. F. Sistema de produção do morango - Sistema de produção, nov. 2005. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em nov. 2008.

Cao, S.; Zheng, Y.; Yang, Z.; Wang, K.; Rui, H. Effect of methyl jasmonate on quality and antioxidante activity of postharvest loquat fruit. *Jornal Science Food Agriculture*, v.89, p.2064-2070, 2009.

Carvalho, S.P. Histórico, importância socioeconômica e zoneamento da produção no Estado de Minas Gerais. In: CARVALHO, S.P. (Coord.). Boletim do morango: cultivo convencional, segurança alimentar, cultivo orgânico. Belo Horizonte: FAEMG, 2006. p. 9-14.

Castro, R.L. de Melhoramento genético do morangueiro: avanços no Brasil. Simpósio Nacional do morango, 2, encontro de pequenas frutas e frutas nativas do Mercosul, 1. (Ed.). Raseira, et al. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 296 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 124).

Ceuppens, B., Ameye, M., Van Langenhove, H., Roldan-Ruiz, I., & Smagghe, G. (2015). Characterization of volatiles in strawberry varieties ‘Elsanta’ and ‘Sonata’ and their effect on bumblebee flower visiting. *Arthropod-Plant Interact* 9 (in press). <http://dx.doi.org/10.1007/s11829-015-9375-y>

Chen, G., Hackett, R., Walker, D., Taylor, A., Lin, Z. and Grierson, D. (2004) Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (TomLoxC) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds. *Plant Physiol.* 136, 2641–2651.

Cid, L.P.B. Hormônios vegetais em plantas superiores – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 188p, 2005.

Colli, S., Purgatto, E. Fisiologia vegetal (Kerbaudy, G.B., 2ed.) Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 271-295, 2008.

Creelman, R.A.; Tierney, M.L; Mullet, J.E. Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulated in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of American*, Washington, v.89, p.4938-4941, 1992.

CORDENUNSI, B. R. et al. Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Chicago, v. 50, n. 9, p. 2581-2586, 2002.

Croteau, R., Kutchan, T.M. and Lewis, N.G. (2000) Natural products (secondary metabolites). In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B., Gruissem, W. and Jones, R., eds). Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, pp. 1250–1318.

De fusco, D.O., Produção de compostos voláteis característicos do aroma em mamões (*Carica papaya* L. cv ‘Golden’) tratados com metil jasmonato e armazenados a baixa temperatura. Dissertação para obtenção do título de mestre pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, SP, 2015.

Dixon, J., Hewett, E.W. Factors affecting apple aroma/flavour volatile concentration: a review, *N. Z. J. Crop Hort. Sci.* 28: 155–173, 1992.

Dixon, J. and Hewett, E.W. (2000) Factors affecting apple aroma/flavour volatile concentration. *N. Z. J. Crop Hort. Sci.* 28, 155–173.

Downie, B.; Gurusinghe, S. & Badford, K.J. 1999. Internal anatomy of individual tomato seeds: relationship to abscisic acid and germination physiology. *Seed Science Research* 9:117-128.

Dudareva, N., Pichersky, E., J. Biochemistry of Plant Volatiles. *Plant Physiology*. 135, 1893–1902, 2004.

Echeverría, G., Graell, J., Lo´pez, M. L. and Lara, I. (2004). Volatile production, quality and aroma-related enzyme activities during maturation of ‘Fuji’ apples. *Postharvest Biology and Technology* 31, 217–227.

Fan, X.; Mattheis, J.P.; Fellman, J.K. A role for jasmonates in climacteric fruit ripening. *Planta*, v. 204, p. 444–449, 1998.

Farine, J.-P., Le Quere, J.-L., Duffy, J., Everaerts, C. and Brossut, R. (1994) Male sex pheromone of cockroach *Eurycotis floridana* (Walker) (Blattidae, Polyzosteriinae): role and composition of tergites 2 and 8 secretions. *J. Biol. Chem. Ecol.* 20, 2291–2306.

Forney, C.F., Kalt, W., Jordan, A. The composition of strawberry aroma is influenced by cultivar, maturity, and storage. *HortScience*, v. 35, p. 1022 – 1026, 2000.

FORTES, J. F. Sistema de produção do morango: doenças do morangueiro. Pelotas: EMBRAPA Clima Temperado, 2005.

Gao, Z., Wen, C., Binder, B. M., Chen, Y., Chang, J., Chiang, Y., Kerris III, R.J., Chang, C., Schaller, G.E. Heteromeric interactions among ethylenereceptors mediate signaling in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.*, 283, 23801–23810, 2008.

Gimenez, G.; Andriolo, J.; Godoi, R. Cultivo sem solo do morangueiro. *Ciência Rural*. v. 38, n 1. 2008.

Groppa, G. A.; Tessarioli Neto, J. T.; Blanco, M. C. A cultura do morangueiro. *Boletim técnico 201, Coordenadoria de assistência técnica integral – CATI*. Campinas. 2ª ed. 27 p. 1997.

Hai-Feng, J.; Ye-Mao, C.; Chun-Li, L.; Dong, L.; Jing-Jing, L.; Ling, Q.; Yuan-Yue, S. Absciscic Acid Plays an Important Role in the Regulation of Strawberry Fruit Ripening. Beijing Key Laboratory for Agricultural Application and New Technique, College of Plant Science and Technology. Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China, 2011.

Henrique, C.M.; Cereda, M.P. Utilization of biofilms in the postharvest conservation of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch) cv. IAC Campinas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 19, n.º 2. 1999.

Hilhorst, H.W.M. 1995. A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. *Seed Science Research* 5:61-75.

Hilhorst, H.W.M. & Downie, B. 1996. Primary dormancy in tomato (*Lycopersicon esculentum*) studies with the *sitiens* mutant. *Journal of Experimental Botany* 47:89-97.

Jafari, Z., Haddad, R., Hossein, R., Garoosi, G. Cloning, identification and expression analysis of ACC oxidase gene involved in ethylene production pathway. *Mol Biol*, 40:1341–1350, 2013.

Jiang Y, Joyce DC (2003) ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. *Plant Growth Regul* 39: 171–174 p.

Jua, C., Mee, G. Y., Lina, D. Y., Yinga, Z. I., Chang, J., Garrect, W. M., Kessenbrock, M., Groth, G., Tuckere, M. L., Cooper, B., Kieber, J. J., Chang, C. CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling 54 from the ER membrane to the nucleus in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, p. 19486–19491, 2012.

Kader, A. Perspective Flavor quality of fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 88:1863–1868, 2008.

Kano Y, Asahira T (1981) Roles of cytokinin and abscisic acid in the maturing of strawberry fruits. *J Jpn Soc Hortic Sci* 50: 31–36

Karssen, C.M. 1995. Hormonal regulation of seed development, dormancy, and germination studied by genetic control. *In*: KIGEL, J. & ALILI, G. Seed Development and Germination. Marcel Dekker, New York. p. 333-350.

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

Klee, H.J. Control of ethylene-mediated processes in tomato at the level of receptors. *Journal of Experimental Botany*, 53: 2057-2063, 2002.

Klein, D., Fink, B., Arold, B., Eisenreich, W. and Schwab, W. (2007) Functional characterization of enone oxidoreductases from strawberry and tomato fruit. *J. Agric. Food Chem.* 55, 6705–6711.

Kluge, R. A. et al. Fisiologia e manejo pós-colheita de frutas de clima temperado. Ed. Rural; Campinas, SP, 2002.

Kondo, S., SETHA, S., RUDELL, D.R., BUCHANAN, D.A., MATTHEIS, J.P. Aroma volatile biosynthesis in apples affected by 1-MCP and methyl jasmonate. *Post. Harv. Biol. Technol.*, 36, p. 61–68, 2005.

Lewinsohn, E., Sitrit, Y., Bar, E., Azulay, Y., Ibdah, M., Meir, A., Yosef, E., Zamir, D. and Tadmor, Y. (2005a) Not just colors – carotenoid degradation as a link between pigmentation and aroma in tomato and watermelon fruit. *Trends Food Sci. Technol.* 16, 407–415.

Lewinsohn, E., Sitrit, Y., Bar, E., Azulay, Y., Meir, A., Zamir, D. and Tadmor, Y. (2005b) Carotenoid pigmentation affects the volatile composition of tomato and watermelon fruits, as revealed by comparative genetic analyses. *J. Agric. Food. Chem.* 53, 3142–3148.

Lunkenbein, S., Salentijn, E.M.J., Coirer, H.A., Boone, M.J., Krens, F.A. and Schwab, W. (2006) Up- and down-regulation of *Fragaria* · *ananassa* O-methyltransferase: impacts on furanone and phenylpropanoid metabolism. *J. Exp. Bot.* 57, 2445–2453.

Lücker, J., Bowen, P. and Bohlmann, J. (2004). *Vitis vinifera* terpenoid cyclases: Functional identification of two sesquiterpene synthase cDNAs encoding (+) - valencene synthase and (–)-germacrene D synthase and expression of mono- and sesquiterpene synthases in grapevine flowers and berries. *Phytochemistry* 65, 2649–2659.

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 Biochem.*, v. 43, p. 15–23, 2008.

Mei, Z.; Bing, Y.; Ping, L. The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 60, No. 6, pp. 1579–1588, 2009.

Manning K (1994) Changes in gene expression during strawberry fruit ripening and their regulation by auxin. *Planta* 94: 62–68

Manriquez, D., El-Sharkawy, I., Flores, F.B., El-Yahyaoui, F., Regad, F., Bouzayen, M., Latche, A. and Pech, J.C. (2006) Two highly divergent alcohol dehydrogenases of melon exhibit fruit ripening-specific expression and distinct biochemical characteristics. *Plant Mol. Biol.* 61, 675–685.

Marín-Loaiza J. C., Céspedes C. L. Compuestos volátiles de plantas. Origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro. *Rev. Fitotéc. Mex.*, 30, p.327–351, 2007.

Martin, D. M. and Bohlmann, J. (2004). Identification of *Vitis vinifera* aliphatic terpene synthase by in silico screening of full-length cDNA ESTs and functional characterization of recombinant terpene synthase. *Phytochemistry* 65, 1223–1229.

Matsui, K. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 274-280, 2006.

Matton, D. P., Constabel, P. and Brisson, N. (1990). Alcohol dehydrogenase gene expression in potato following elicitor and stress treatment. *Plant Molecular Biology* 14, 775–783.

Muday G. K., Rahman A., Binder, B. M. Auxin and ethylene: collaborators or competitors? *Trends in Plant Science*, 17, 4, 2012.

Nkatsuka, A.; Murachi, S., Okunishi, H., Shiomi, S., Nakano, R., 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 Physiol.* 118:1295–305, 1998.

Neves Filho, L. DE C. Congelamento de morango. In: SIMPÓSIO SOBRE CULTURA DO MORANGUEIRO, 1, 1986, Cabreúva. FCAVJ/UNESP, 1986, p.65-88.

Noordermeer, M.A., Veldink, G.A. and Vliegthart, J.F.G. (2001) Fatty acid hydroperoxide lyase: a plant cytochrome P450 enzyme involved in wound healing and pest resistance. *Chembiochem*, 2, 494–504.

Oliveira, R.P.; Nino, A.F.P.; Scivittaro, W.B. Mudanças certificadas de morangueiro: maior produção e melhor qualidade da fruta. *A Lavoura*, Rio de Janeiro, v.108, n.655.2005.

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

Passos, F. A. et al. Diretrizes técnicas morango: *Fragaria x ananassa* Duch. Disponível em: <<http://www.srjundiai.com.br/direct.htm>>. Acesso em: 19 nov. 2004.

Perez, A.G., Sanz, C., Rios, J.J., Olias, J.M., 1993. Estudio comparativo de los perfiles aromáticos de manzana, plátano y fresa. *Rev. Españ. Cien. Tecnol. Aliment.* 33, 665-677.

Perez, A.G., Olias, R., Sanz, C., Rios, J.J., Olias, J.M., 1996. Furanones in strawberries: evolution during ripening and postharvest shelf life. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 3620-3624.

Perkins-Veazie P (1995) Growth and ripening of strawberry fruit. *Hortic Rev (Am Soc Hortic Sci)* 17: 267–297.

Peters, J. S. and Frenkel, C. (2004). Relationship between alcohol dehydrogenase activity and low-temperature in two maize genotypes, Silverado F1 and Adh1–Adh2– doubly null. *Plant Physiology and Biochemistry* 42, 841–846.

Potomati, A. & Buckeridge, M.S. 2002. Effect of abscisic acid on the mobilisation of galactomannan and embryo development of *Sesbania virgate* (Cav.) Pers. (Leguminosae-Faboideae). *Revista Brasileira de Botânica* 25:303-310.

Purgatto, E., Lajolo, F. M., Nascimento, J.R.O., Cordenunsi, B.R. Inhibition of β -amylase activity, starch degradation, and sucrose formation by indole-3- acetic acid during banana ripening. *Planta*, 212, 823-828, 2001.

Raab, T., Lopez-Raez, J.A., Klein, D., Caballero, J.L., Moyano, E., Schwab, W. and Muñoz-Blanco, J. (2006) FaQR, required for the biosynthesis of the strawberry flavor compound 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, encodes an enone oxidoreductase. *Plant Cell*, 18, 1023–1037.

Reisser Júnior, Carlos ; Antunes, L. E. C. ; Gonçalves, M. A ; Vignolo. Panorama do cultivo de morangos no Brasil. *Revista Campo & Negócios HF* , v. 8, p. 58-59, 2014.

Resende, L. M. A. et al. Panorama da produção de comercialização do morango. *Informe Agropecuário*. Belo Horizonte, v. 20, n 198, p. 5-19. 1999.

Rohmer, M. (2003) Mevalonate-independent methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis: elucidation and distribution. *Pure Appl. Chem.* 75, 375–388.

Rudi Hari Murti, R. H., Yeoung, Y. R. Effectiveness of gamma ray irradiation and ethyl methane sulphonate on *in vitro* mutagenesis of strawberry. *African Journal of Biotechnology*. VOL. 12(30), pp. 4803-4812 (2013).

Salas, J.J., Sanchez, C., Garcia-Gonzalez, D.L. and Aparicio, R. (2005) Impact of the suppression of lipoxygenase and hydroperoxide lyase on the quality of the green odor in green leaves. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1648–1655.

Sato, G. S., Assumpção, R. Pólos de produção de morango. *Informações econômicas*, SP, v. 32, n 11, nov. 2002.

Seigler, D.S. 1998. Plant secondary metabolism. Kluwer Academic Publishers, Massachussets, USA.

Scheer, J. M.; Ryan, C. A. A 160-kD systemin receptor on the surfasse of *Lycopersicon peruvianum* suspension-cultured cells. *Plant cell*, v.11, 1525-1535, 1999.

Schwab, W., Schreirer, P. Enzymic formation of flavor volatiles from lipids. *Lipid Biotechnology* (Kuo, T.M. and Gardner, H.W., eds). New York: Marcel Dekker, 293–318, 2002.

Schwab, W., Rikanati, R.D., Lewinsohn, E. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal*. 54, 712–732, 2008.

Slaughter, J.C. (1999). The naturally occurring furanones: formation and function from pheromone to food. *Biol. Rev.*, 74, 259–276.

Smith, A.M., Zeeman, S. C., Smith, S.M. Starch Degradation. *Annu. Rev. Plant Biol*, 56, 73–98, 2005.

Song J., Forney C. F. Flavour volatile production and regulation in fruit. *J. Plant Sci.*, 88, p. 537–550, 2008.

Speirs, J., Lee, E., Holt, K., Yong-Duk, K., Steele, S.N., Loveys, B. and Schuch, W. (1998) Genetic manipulation of alcohol dehydrogenase levels in ripening tomato fruit affects the balance of some flavor aldehydes and alcohols. *Plant Physiol*. 117, 1047–1058.

Stumpe, M. and Feussner, I. (2006) Formation of oxylipins by CYP74 enzymes. *Phytochem. Rev.* 5, 347–357.

Taiz, L.; Zeiger, E. *Plant physiology*. 4th ed. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2007. 327 p.

Tanaka, Y. Sasaki N, Ohmiya, A Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J.* 54: 733–749, 2008.

Teale, W. D., Paponov, I. A., Palme, K. 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.

Ubeda, C. San-Juan, F., Concejero, B., Callejón, R.M., Troncoso, A.M., Morales, A.M., Ferreira, V., Hernandez-ortes, P. Glycosidically bound aroma compounds and impact odorants of four strawberry varieties. *J. Agric. Food Chem.*, v. 60, p. 6095–6102, 2012.

Van Der Straeten, D., Rodrigues Poussada, R. A., Gielen, J. and Van Montagu, M. (1991). Tomato alcohol dehydrogenase. Expression during fruit ripening and under hypoxic conditions. *FEBS Letters* 295, 39–42.

Villarreal NM, Bustamante CA, Civello PM (2010) Effect of ethylene and 1-MCP treatments on strawberry fruit ripening. *J Sci Food Agric* 90:683–689.

Vogel, J.T., Tieman, D.M., Sims, C.A., Odabasi, A.Z., Clark, D.G., Klee, H.J. Carotenoid content impacts flavor acceptability in tomato (*Solanum lycopersicum*). *J. Sci. Food Agric*. 90:2233–40, 2010.

Wang, X., Yin, W., Wu, J., Chai, L., Yi, H. Effects of exogenous abscisic acid on the expression of citrus fruit ripening-related genes and fruit ripening. *Scientia Horticulturae* 201, pp. 175–183 (2016).

Wein, M., Lavid, N., Lunkenbein, S., Lewinsohn, E., Schwab, W. and Kaldenhoff, R. (2002) Isolation, cloning and expression of a multifunctional O-methyltransferase capable of forming 2,5-dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone, one of the key aroma compounds in strawberry fruits. *Plant J.* 31, 755–765.

White, P.J. Recent advances in fruit development and ripening: an Overview. *Journal of Experimental Botany*. 53, 1995-2000, 2002.

Wills, R.; McGlasson, B.; Graham, D.; Joyce, D. Introducción a la fisiología y manipulación poscosecha de frutas, hortalizas y plantas ornamentales. Trad. De J.B. Gonzáles. 2nd ed. Zaragoza: Acribia, 240 p., 1998.

Wills, R. B. H.; Ku, V. V. V.; Leshem, Y. Y. Fumigation with nitric oxide to extend the postharvest life strawberries. *Postharvest Biology and Technology*. v. 18, p. 75-79. 2000.

Yang, S.F., 1985. Biosynthesis and action of ethylene. *HortScience*, 20, 41-45.

Zadra, C., Borgogni, A., Maruchinni, A. Quantification of jasmonic acid by SPME in tomato plants stressed by ozone. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, p. 9317–9321, 2006.

Zhang, H.; Ma, L.; Turner, M.; Xu, H.; Dong, Y.; Jiang, S. Methyl jasmonate enhances biocontrol efficacy of *Rhodotorula glutinis* to postharvest blue mold decay of pears. *Food Chemistry*, v.117, p.621-626, 2009.

Zhu, H.L.; Zhu, B.Z.; Shao, Y.; Wang, X.G.; Lin, X.J.; Xie, Y.H.; Li, Y.C.; Gao, H.Y.; Luo, Y.B. Tomato fruit development and ripening are altered by the silencing of LeEIN2 gene. *Journal of Integrative Plant Biology*, v.48, n.12, p.1478–1485, 2006.

Zuffellato-Ribas, K. C.; Rodrigues J. D. Estaquia: Uma abordagem dos principais aspectos fisiológicos. Grupo GEPE, UFPR/Curitiba, 2001.