

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS DE CURITIBANOS
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
AGRONOMIA

Yuri Pscheidt

Explorando combinações de alelos para intensificar o valor nutricional do tomate

Curitibanos

2020

Yuri Pscheidt

Explorando combinações de alelos para intensificar o valor nutricional do tomate

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Agronomia.
Orientador: Prof. Dr. Ivan Sestari

Curitibanos

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pscheidt, Yuri

EXPLORANDO COMBINAÇÕES DE ALELOS PARA INTENSIFICAR O
VALOR NUTRICIONAL DO TOMATE / Yuri Pscheidt ; orientador,
Ivan Sestari, 2020.

42 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos, Graduação em Agronomia, Curitibanos, 2020.

Inclui referências.

1. Agronomia. 2. Valor nutricional do tomate. 3.
Fisiologia vegetal. 4. Pós-colheita. 5. Carotenoides. I.
Sestari, Ivan . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Agronomia. III. Título.

YURI PSCHIEDT

**EXPLORANDO COMBINAÇÕES DE ALELOS PARA INTENSIFICAR O VALOR
NUTRICIONAL DO TOMATE**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Engenheiro Agrônomo, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Agronomia.

Curitibanos, 20 de novembro de 2020.



Documento assinado digitalmente
Samuel Lúcio Fioreze
Data: 20/11/2020 09:31:52 -0300
CPF: 052.256.803-90

Prof. Dr. Samuel L. Fioreze
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente
Ivan Sestari
Data: 20/11/2020 09:31:52 -0300
CPF: 526.413.220-87

Prof. Dr. Ivan Sestari
Orientador

Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado digitalmente
Cristian Soldi
Data: 20/11/2020 13:00:58 -0300
CPF: 032.833.280-53

Prof. Dr. Cristian Soldi
Membro da banca examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Bruna Orsi

MSc. Bruna Orsi
Membro da banca examinadora
ESALQ-USP

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos,

Primeiramente a Deus pela vida e graças concebidas.

Aos meus pais Laércio Pscheidt e Alhandra de F. Kachorovski Pscheidt e meu irmão Murilo Pscheidt pelo apoio moral, estrutural e financeiro durante todos esses anos.

Aos meus avós pelo exemplo de vida e superação e a minha namorada e melhor amiga Pietra Huren.

Agradeço aos colegas e amigos de república Roger Vinicius Konkel, Rodinei Ulbricht, Rafael Michta, Felipe Weber Ferrarez e Bruno Eduardo Zelner pelos bons momentos de convivência. A todos os meus amigos que são uma segunda família (Antonio Américo Prates, Guilherme Alvez Ramos, Eduardo Camargo Borsarini, Gian Wendler, Willian Macanan, Talia Marafon, Ana Paula Krol, Amanda Guzi, Ana Caroline Kruge, Hermes R. Paulitzki, Felipe Hinke, Rafael Valderrama, André Valderrama, Luiz Paulo Stiebler e outros).

A todo grupo de pesquisa Solanum pela ajuda nos experimentos e por todo apoio, em especial ao professor Ivan Sestari pela orientação, pela amizade e pelo apoio durante a graduação, congressos e estágios.

Meu agradecimento aos professores Cristian Soldi e Dilma Budziak pela ajuda nas avaliações dos experimentos e por toda contribuição. Agradeço também a Universidade Federal de Santa Catarina, CNPQ, CAPES, FAPESC, FINEP e CT-Infra pela infraestrutura e apoio financeiro para tornar possível este estudo.

RESUMO

Em razão do efeito positivo dos carotenoides em parâmetros de qualidade visual, nutricional e sensorial do fruto do tomateiro, vários estudos dedicaram-se a explorar estes compostos. A caracterização de mutações que afetam a carotenogênese e a sinalização luminosa demonstram que individualmente alguns alelos alteram positivamente o perfil e o acúmulo de carotenoides no fruto. Com o objetivo de explorar o impacto destes alelos combinados em parâmetros de qualidade do tomate, geramos duas linhagens combinando alelos que afetam a carotenogênese (*Beta carotene (B)* e *tangerine (t)*) com a sinalização luminosa (*high pigment 2 (hp2)*). A coloração alaranjada dos frutos das linhagens *B/hp2* e *t/hp2* sugere o acúmulo predominante de beta caroteno e tetra-*cis*-licopeno respectivamente, carotenoides que são considerados mais bioativos. As combinações alélicas nos duplos mutantes acarretaram em maior teor de ácido ascórbico (vitamina C) em relação aos parentais *B* e *t*, enquanto o teor de sólidos solúveis não foi alterado significativamente. O perfil de compostos orgânicos voláteis dos duplos mutantes apresentou significativa alteração em relação aos parentais, com destaque para o incremento de b-ionona e (E)-2-Hexenal em *B/hp2* e geranyl acetona em *t/hp2*. Embora o número de frutos tenha sido reduzido nos duplos mutantes, a produtividade não foi afetada, em razão do maior tamanho médio dos frutos. Coletivamente, estes resultados indicam que as linhagens geradas intensificaram o valor nutricional do tomate sem prejudicar a produtividade. Além disso, alteram componentes de sabor que podem beneficiar o interesse do consumidor.

Palavras-chave: Carotenoides. Valor nutricional. Compostos voláteis. Duplos mutantes. Sinalização luminosa.

ABSTRACT

Owing to the positive effect of carotenoids on parameters of visual, nutritional and sensory quality of the tomato fruit, several studies have been dedicated to exploring these compounds. The characterization of mutations that affect carotenogenesis and light signaling demonstrate that individually some alleles positively alter the profile and accumulation of carotenoids in the fruit. To explore the impact of these combined alleles on tomato quality parameters, we generated two lines combining alleles that affect carotenogenesis (*Beta carotene* (*B*) and *tangerine* (*t*)) with light signaling (*high pigment 2* (*hp2*)). The orange color of the fruits of the *B/hp2* and *t/hp2* lines suggests the predominant accumulation of beta carotene and tetra-*cis*-lycopene respectively, carotenoids that are considered more bioactive. The allelic combinations in the double mutants resulted in a higher content of ascorbic acid (vitamin C) compared to parental *B* and *t*, while the content of soluble solids was not significantly changed. The profile of volatile organic compounds of the double mutants showed a significant change as compared to parental lines, with emphasis on the increase of b-ionone and (E) -2-Hexenal in *B/hp2* and geranyl acetone in *t/hp2*. Although the number of fruits was reduced in the double mutants, productivity was not affected, due to the greater average fruit size. Collectively, these results indicate that the double mutant lines generated intensified the nutritional value of the tomato without yield penalty. In addition, they alter flavor components that may benefit the consumer's interest.

Keywords: Carotenoids. Nutritional value. Volatile compounds. Double mutants. Light signaling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema representativo da via de biossíntese de carotenoides em plantas.....	17
Figura 2- Principais precursores e vias de formação de compostos voláteis em frutos.....	20
Figura 3- Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial completo na otimização das variáveis e suas interações em polpa de tomate.....	24
Figura 4- Superfície de resposta obtida na otimização das condições de extração a partir do planejamento Doehlert.....	25
Figura 5- Fenótipo e cor da epiderme dos frutos verdes.....	28
Figura 6- Fenótipo e cor da epiderme dos frutos maduros.....	29
Figura 7- Desempenho produtivo.....	30
Figura 8- Parâmetros de qualidade.....	31
Figura 9- Compostos orgânicos voláteis derivados de carotenoides.....	35
Figura 10- Composto orgânicos voláteis derivados de ácidos graxos.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Descrição dos mutantes utilizados neste trabalho.....21

Tabela 2- Compostos orgânicos voláteis identificados.....33

LISTA DE SIGLAS

B – *Beta carotene*

cv - cultivar

F1 - híbrido gerado pelo cruzamento entre as linhagens parentais homozigotas.

F2 - resultado da autofecundação da geração F1

F3 - resultado da autofecundação da geração F2

hp1 – *high pigment 1*

hp2 – *high pigment 2*

MT - Micro-Tom

NPK - Nitrogênio/Fósforo/Potássio

t - *tangerine*

V2 - estágio vegetativo em que a planta apresenta a segunda folha verdadeira desenvolvida

wt – tomateiro tipo selvagem

SST- Sólidos solúveis totais

MHO- 6-metil-5-Hepten-2-one

LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

mL – mililitro

L - litro

g – grama

μg- micrograma

cm - centímetro

mm - milímetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 JUSTIFICATIVA	13
1.2 OBJETIVOS	14
1.2.1 Objetivos gerais.....	14
1.2.2 Objetivos específicos.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 A IMPORTÂNCIA DOS CAROTENOIDES	15
2.2 A BIOSÍNTESE DE CAROTENOIDES.....	16
2.3 O PAPEL DA SINALIZAÇÃO LUMINOSA NA REGULAÇÃO DA CAROTENOGÊNESE	18
2.2 A RELAÇÃO DA INTERFACE FOTOMORFOGÊNESE E CAROTENOGÊNESE COM O METABOLISMO VOLÁTIL DE FRUTOS.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO	21
3.2 PARAMETROS AVALIADOS.....	22
3.2.1 Desempenho produtivo	22
3.2.2 Análises físico-químicas	22
3.2.3 Avaliação dos componentes voláteis por SPME/CGMS	23
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE DOS DADOS.....	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	27
4.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E DESEMPENHO PRODUTIVO DAS LINHAGENS.....	27
4.2 PARÂMETROS DE QUALIDADE NUTRICIONAL	30
4.3 PERFIL DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DOS FRUTOS.....	31
4.3.1 Voláteis derivados de carboidratos.....	0
4.3.2 Voláteis derivados de ácidos graxos	2
4.3.3 Voláteis derivados de aminoácidos	3
5 CONCLUSÃO.....	4
REFERÊNCIAS.....	5

1 INTRODUÇÃO

O fruto do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é um dos alimentos mais consumidos no mundo e está inserido na matriz alimentar tanto *in natura* quanto na forma processada (CARVALHO; PAGLIUCA, 2007). Muito conhecido por seu sabor característico, o fruto é também uma importante fonte de micronutrientes à dieta humana (TIEMAM *et al.* 2017; BIRTIC *et al.* 2009).

A domesticação do tomateiro trouxe consequências negativas para a composição nutricional e sabor do fruto. Historicamente, os programas de melhoramento buscaram aumentar a produtividade e o tempo de prateleira dos frutos em detrimento de atributos relacionados a qualidade visual, sensorial e nutricional. Além disso, o controle genético ligado a estes atributos, envolve elevado nível de complexidade e não vem sendo uma prioridade nos programas de melhoramento. Estudos demonstram que frutos de cultivares comerciais modernas são substancialmente menos saborosos e nutricionalmente mais pobres quando comparadas com genótipos antigos, com destaque aos impactos negativos na produção de compostos voláteis responsáveis pelo aroma tradicional do tomate (GOFF; KLEE, 2006; TIEMAM *et al.* 2017; ORTIZ-SERRANO; GIL, 2010).

O aroma está intrinsicamente ligado a aceitabilidade dos consumidores por ser um dos principais componentes do *flavor*, cuja percepção sensorial depende de uma complexa mistura de açúcares, ácidos orgânicos e compostos voláteis (SMITH, 2012). No tomate, os carotenoides são importantes precursores de aroma, sendo utilizados como substrato em diferentes vias biossintéticas para produção de voláteis. A maioria dos compostos relacionados ao aroma são derivados de nutrientes essenciais, evidenciando uma relação entre a percepção sensorial e o valor do alimento a saúde (GOFF; KLEE, 2006). A exemplo, os carotenoides destacam-se por terem importantes propriedades bioativas, com destaque para os compostos licopeno e beta caroteno. Vários estudos demonstram uma relação direta entre a ingestão de carotenoides com a redução de doenças crônicas relacionadas a dieta (STORY *et al.* 2010). Por esta razão, diferentes estratégias vêm sendo utilizadas com o intuito de resgatar estes e outros compostos, buscando reverter a considerável perda de qualidade sensorial e nutricional resultante do evidente descaso com estes aspectos (LIU *et al.* 2015; YE *et al.* 2000).

Em tomateiro, variações alélicas que afetam a carotenogênese tem sido isoladas e seu impacto no perfil e no conteúdo de carotenoides acumulado no fruto têm sido estudado (ORSI, 2018; SESTARI *et al.* 2014). O alelo selvagem *Beta carotene* codifica uma licopeno beta ciclase específica de cromoplasto que converte a quase totalidade do licopeno do fruto em beta

caroteno, importante fonte de vitamina A (RONEM *et al.* 2000). Por outro lado, nos frutos do mutante *tangerine*, a perda de função de uma carotenoide isomerase impede a isomerização do *cis*-licopeno em *trans*-licopeno (ISAACSON *et al.* 2002). O acúmulo de *cis*-licopeno nestes frutos acarreta elevada atividade antioxidante e maior biodisponibilidade quando comparada ao *trans*-licopeno, que é o carotenoide de maior abundância em cultivares comerciais (UNLU *et al.* 2007; ISAACSON *et al.* 2002).

Além das tentativas de melhorar a composição nutricional de frutos, focadas na alteração da expressão de genes específicos da carotenogênese, recentemente, a manipulação da transdução do sinal luminoso ressurgiu como uma estratégia efetiva para intensificar a coloração e os níveis de carotenoides nos frutos (ALVES *et al.* 2020). De fato, os mutantes hiper responsivos a luz que tem sido descritos em tomateiro, exibem elevados teores de carotenoides. Especificamente, os mutantes recessivos *high pigment* (*hp1* e *hp2*) são reconhecidos pelo elevado acúmulo de carotenoides e vitamina C (AZARI *et al.* 2010). O conteúdo elevado de pigmentos desses mutantes é interessante, pois há incremento em todos os carotenoides, o oposto do que ocorre em mutantes biossintéticos. Esta característica tem permitido a utilização comercial desses alelos em programas de melhoramento cujo foco é a melhoria da coloração e a qualidade nutricional do fruto (MUSTILLI *et al.* 1999).

Embora exista uma caracterização individual dos mutantes citados anteriormente quanto aos seus parâmetros de qualidade e compostos bioativos, ainda é desconhecido o impacto da combinação dos referidos alelos na qualidade nutricional e na formação de compostos orgânicos voláteis responsáveis pelo aroma do fruto do tomateiro. Com objetivo de preencher essa lacuna foram criadas duas linhagens combinando alelos que afetam a carotenogênese (*Beta carotene* e *tangerine*) com a sinalização luminosa (*high pigment 2*). O impacto resultante destas combinações de alelos em atributos de qualidade visual, nutricional e sensorial nos frutos foi determinado em relação as respectivas linhagens isogênicas parentais.

1.1 JUSTIFICATIVA

Embora uma caracterização individual dos mutantes citados anteriormente quanto a composição dos fitonutrientes neles presentes já tenha sido previamente realizada, estudos avaliando o impacto das combinações entre estes alelos buscando a melhoria de atributos de qualidade ainda são inexistentes. Este trabalho objetivou preencher essa lacuna através da comparação das respostas associadas a parâmetros nutricionais, visuais e sensoriais, principalmente os associados a classe dos carotenoides. Os resultados gerados a partir deste

estudo preliminar e de outros trabalhos que estão em curso poderão futuramente contribuir com programas de melhoramento voltados a melhoria de aspectos específicos da qualidade nutricional, sensorial e funcional do tomate

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivos gerais

Explorar combinações de alelos que afetam a carotenogênese e a sinalização luminosa para intensificar atributos de qualidade visual, nutricional e sensorial ao fruto do tomateiro.

1.2.2 Objetivos específicos

- Obtenção dos duplos mutantes *Beta carotene* : *high pigment2 (B:hp2)* e *tangerine* : *high pigment2 (t:hp2)*;
- Caracterizar o impacto da combinação de *hp2* com *Beta* e *tangerine* em atributos de qualidade visual, nutricional e sensorial dos frutos.
- Determinar se as combinações de alelos piramidados afetam o rendimento das linhagens em relação aos seus respectivos parentais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A IMPORTÂNCIA DOS CAROTENOIDES

Carotenoides são compostos hidrocarbonetos de 40 carbonos, incluídos na classe dos terpenos, com mais de 600 estruturas caracterizadas em organismos fotossintetizantes e não fotossintetizantes. Conferem a muitas flores e frutos colorações características que variam do amarelo, vermelho ao laranja (LIU *et al.* 2015). Em plantas os carotenoides participam da fotossíntese, atuando como protetores do aparato fotossintético contra danos oxidativos e auxiliando na captação de luz, considerando que pode absorvê-la em espectros diferentes da clorofila (CAZZANIGA *et al.* 2016). Além disso, atuam em uma série de processos fisiológicos relacionados ao crescimento, desenvolvimento, respostas a estímulos ambientais e biossíntese de fitormônios (LIU *et al.* 2015). Carotenoides exercem também função ecológica, o acúmulo destes pigmentos em flores e frutos atrai polinizadores e dispersores de sementes (CUNNIGHAM; GANNT,1998).

A relação dos carotenoides com parâmetros de qualidade em alimentos é intrínseca. Estes compostos são os principais responsáveis pela impressão de cor em muitos alimentos, e tanto o espectro como a intensidade da cor são critérios importantes relacionados a preferência do consumidor (UENOJO *et al.*2007). Além disso, a clivagem oxidativa de carotenoides forma um conjunto de voláteis responsáveis por agregar diferentes notas de aroma aos alimentos. Voláteis como a β -ionona, composto derivado de beta caroteno, exerce um alto impacto positivo no aroma (GOFF; KLEE, 2006). O isômero beta caroteno também é o principal precursor de vitamina A, composto essencial para o organismo humano que está relacionado a manutenção do aparato ocular (HASKELL, 2012; YE *et al.* 2000).

Seres humanos são incapazes de sintetizar carotenoides, o que torna a sua ingestão essencial para utilização em funções fisiológicas. Os efeitos benéficos de carotenoides contra cânceres, doenças do coração e doenças neurodegenerativas são cada vez mais reconhecidos e estimulam intensas investigações sobre o papel desses compostos como antioxidantes e como reguladores de resposta do sistema imune. O isômero licopeno aparece como um dos compostos bioativos de maior efetividade por seu elevado poder antioxidante (STORY *et al.* 2010; TRINDADE; MARTUCCI, 2011). A capacidade antioxidante dos carotenoides deve-se a presença de cadeias duplas conjugadas, e o número dessas ligações define a capacidade antioxidante de cada isoforma (STAHL; SIES, 2003). Carotenoides reagem e interrompem a ação quelante de espécies reativas de oxigênio (EROs). Estas, pode acarretar efeitos deletérios

como alteração do DNA e peroxidação de lipídios pelo excesso de carga energética, ao reagirem com formas reativas de oxigênio e outros radicais livres, carotenoides dissipam o excesso de energia em forma de calor no ambiente evitando danos por oxidação (UENOJO *et al.* 2007).

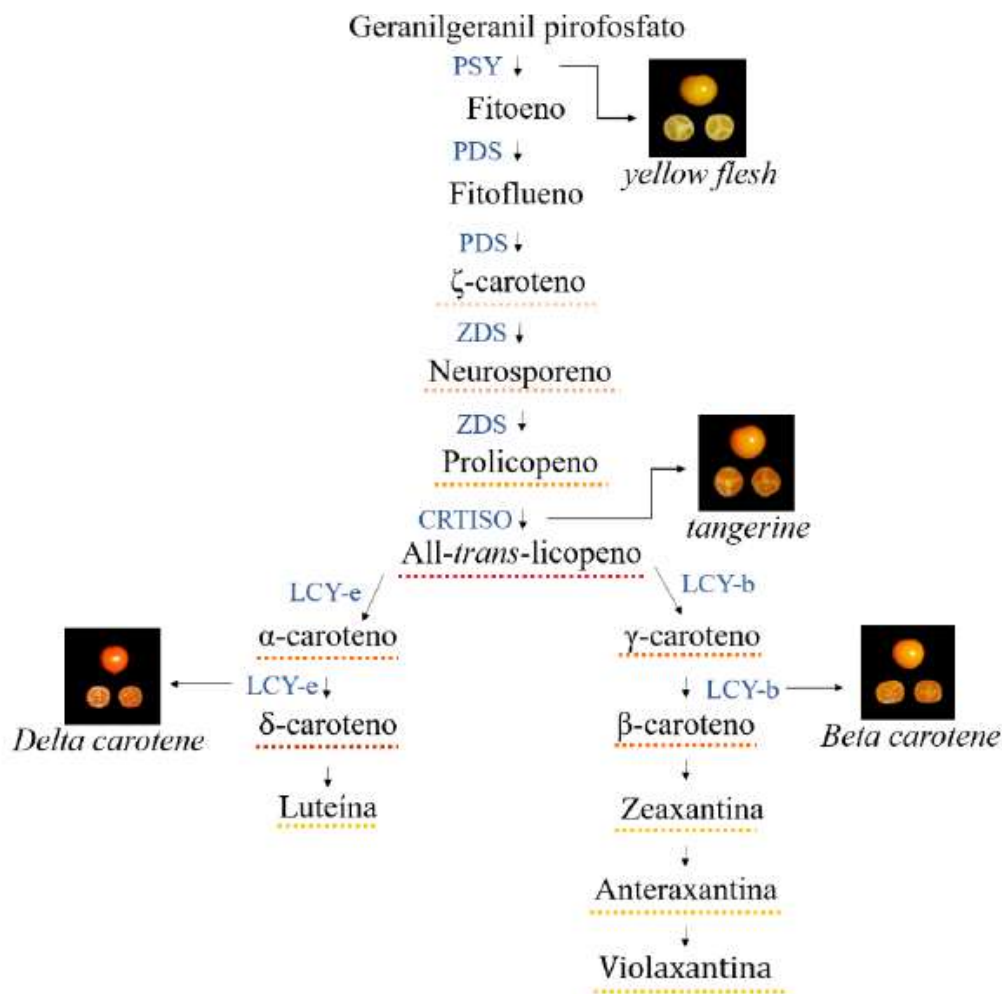
2.2 A BIOSSÍNTESE DE CAROTENOIDES

A biossíntese de carotenoides em plantas ocorre nos plastídios, e as enzimas envolvidas na via biossintética estão associadas a membrana destas organelas (CUNNIGHAM; GANNT,1998). A carotenogênese inicia a partir do composto de 5 carbonos, isopentenil pirofosfato e de seu isômero dimetilalilo-pirofosfato. Estes substratos são utilizados em reações de condensação que levam a formação do precursor direto de carotenoides, o geranylgeranyl pirofosfato. A condensação de duas moléculas de geranylgeranyl pirofosfato, produzem o primeiro carotenoide de 40 carbonos, o fitoeno. A formação do fitoeno é catalisada pela ação da enzima FITOENO SINTASE (PSY1), sendo este um dos pontos mais limitantes da via. As enzimas FITOENO DESNATURASE (PDS), ZETACAROTENO DESNATURASE (ZDS) e CAROTENOIDE *cis-trans* ISOMERASE (CRTISO) formam o carotenoide licopeno a partir do fitoeno. Após a formação do licopeno, reações de ciclização dividem a carotenogênese em duas vias. Em uma das ramificações, a interação com ciclases leva à formação de δ -caroteno, α -caroteno e luteína por adição de anéis ϵ inseridos por ação da enzima LICOPENO- ϵ -CICLASE (LCY-e), enquanto a outra via leva a síntese de beta caroteno e outras xantofilas como zeaxantina, anteraxantina e violaxantina por adição de anéis β inseridos por ação da enzima LICOPENO- β -CICLASE (LCY-e) (RUIZ-SOLA; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2012). A coloração do carotenoide varia em função da quantidade de duplas ligações, quanto mais insaturações apresentar, menor é o comprimento de onda absorvido e conseqüentemente sua reflectância (TANAKA; SASKI; OHMIYA, 2009).

O fruto do tomateiro apresenta uma ampla gama de cores e podemos relacionar isto às mutações em enzimas específicas da carotenogênese (PARAN; VAN DER KNAAP, 2007). Atualmente são conhecidos no tomateiro algumas mutações que conferem perda ou ganho de função às enzimas. Em um contexto nutricional, podemos destacar o alelo dominante *Beta carotene* (*B*) que torna funcional a enzima LYCOPENE β -CICLASE (LBY-b) específica para cromoplasto, convertendo a maioria do licopeno em β -caroteno, substância que possui elevado poder antioxidante e efeito pró-vitamina A (RONEN *et al.* 2000). A mutação *tangerine* (*t*) acarreta perda de função à enzima CAROTENOIDE *cis-trans* ISOMERASE (CRTISO) tornando-a incapaz de isomerizar tetra-*cis*-licopeno em *trans*-licopeno, causando acúmulo de

tetra-*cis*-licopeno (prolicopeno) (ISAACSON *et al.* 2002). Segundo Unlu *et al.* (2007) os carotenos com isomeria *cis* são mais facilmente absorvíveis e biodisponíveis que os isômeros *trans*. Contudo, a maioria das conformações estruturais dos carotenoides em plantas superiores se encontram na isomeria *trans*.

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



2.3 O PAPEL DA SINALIZAÇÃO LUMINOSA NA REGULAÇÃO DA CAROTENOGÊNESE

O metabolismo de carotenoides nas plantas é considerado complexo e evoluiu estrategicamente, criando táticas de regulação temporal e espacial dependentes de fatores genéticos e em resposta a fatores ambientais (LIU *et al.* 2015). Há evidências que a regulação tanto da taxa biosintética quanto do acúmulo de carotenoides, é dependente também das características anatômicas da célula, principalmente relacionado ao tamanho e número de plastídios nela presente (ISAACSON *et al.* 2002). Egea *et al.* (2011) confirmou a existência de um sincronismo na transição de cloroplastos para cromoplastos com a formação de plastídios intermediários, contendo clorofilas e carotenoides. Assim, frutos com mais cloroplastos ativos no estágio verde podem desenvolver tomates com cromoplastos mais ativos, e conseqüentemente podendo acumular maior quantidade de carotenoides.

A partir da caracterização molecular de *high pigment 2 (hp2)* foi revelado que a mutação afeta um gene que codifica o homólogo em tomateiro do *DEETIOLATED1 (DET1)* de *Arabidopsis*, o qual atua como forte repressor da fotomorfogênese. O mutante *hp2* produz plastídios relativamente maiores e apresentam altos teores de carotenoides e ácido ascórbico, remetendo a maior capacidade de produção, estocagem e estabilidade destes compostos, sugerindo que, a manipulação da transdução do sinal luminoso pode ser uma estratégia efetiva para intensificar a coloração e os níveis de carotenoides nos frutos (MUSTILLI *et al.* 1999). A mutação *hp2* altera a via de transdução de sinal luminoso, tornando-o hiper-responsivo a luz. Em resposta, o mutante apresenta um alto acúmulo de clorofila em caule, folha e fruto. Além da alteração no tamanho do plastídio, a capacidade do mutante em acumular carotenoides está relacionada a uma regulação positiva não apenas de clorofila, mas de todo complexo coletor de luz, formado por clorofila a, clorofila b e carotenoides (BINO *et al.* 2005). O conteúdo elevado de pigmentos nos mutantes *hp* é interessante, pois favorece o incremento de todos os carotenoides, o oposto do que ocorre em mutantes biossintéticos. Esta característica tem permitido a utilização comercial desses alelos em programas de melhoramento cujo foco é a melhoria da coloração e a qualidade nutricional do fruto (MUSTILLI *et al.* 1999).

2.2 A RELAÇÃO DA INTERFACE FOTOMORFOGÊNESE E CAROTENOGÊNESE COM O METABOLISMO VOLÁTIL DE FRUTOS.

É de amplo conhecimento a influência da fotomorfogênese na diferenciação de

proplastídeos em cloroplastos, que por sua vez, durante o amadurecimento, se diferenciam em cromoplastos. Este processo de transição está diretamente ligado a produção de compostos orgânicos voláteis, pois além do aumento do conteúdo carotenoides, o desmonte das membranas dos cloroplastos fornece outros substratos para a biossíntese de voláteis como aminoácidos e ácidos graxos (EGEA *et al.* 2011). Deste modo, embora pouco se saiba sobre o efeito direto da sinalização luminosa na formação de compostos voláteis em frutos, é bem provável que essa sinalização possa influenciar indiretamente o aroma. Yoo *et al.* (2019), demonstraram que frutos verdes na ausência de luz desenvolvem cloroplastos defeituosos, o que posteriormente resulta em perceptíveis alterações na produção de compostos orgânico voláteis relacionados ao aroma de frutos maduros.

No fruto tomateiro, mais de 400 voláteis foram identificados, contudo, apenas um pequeno conjunto impacta positivamente o aroma. A capacidade de um volátil alterar o *flavor* depende da concentração e do limiar de odor, definido como a menor concentração de um composto com odor capaz de ser percebido pelo olfato humano (GOFF; KLEE, 2006).

Três principais classes de precursores de aroma são descritas em plantas (Figura 2). Dentre os derivados de carboidratos, os carotenoides são importantes substratos para a formação de voláteis de aroma no tomate. Destacam-se por possuir limiares de odor muito baixos, sendo facilmente percebidos pelo consumidor (BUTTERY; LING *et al.* 1993). Além dos carotenoides, outros derivados de carboidratos que se encaixam na classe dos terpenos podem ser precursores de compostos orgânicos voláteis, entretanto exercem menor influência no aroma (RAMBLA *et al.* 2014).

Voláteis derivados de ácidos graxos são geralmente os mais abundantes no tomateiro, tem como característica atribuir ao fruto notas de aroma de folha verde, as quais são responsáveis por grande parte do aroma do tomate fresco. Estes compostos são produzidos nos plastídios e são sintetizados majoritariamente a partir de ácido linoleico e linolênico (SCHWAB *et al.* 2008; RAMBLA *et al.* 2014). Esta classe de voláteis tende a aumentar durante o amadurecimento em função da perda de integridade de membranas, o que favorece maior disponibilidade de substrato. Bino *et al.* (2005) ao analisar os compostos voláteis de frutos de *hp2*, concluiu que as alterações mais significativas no conteúdo volátil em relação ao controle, foram registradas nos derivados de ácidos graxos.

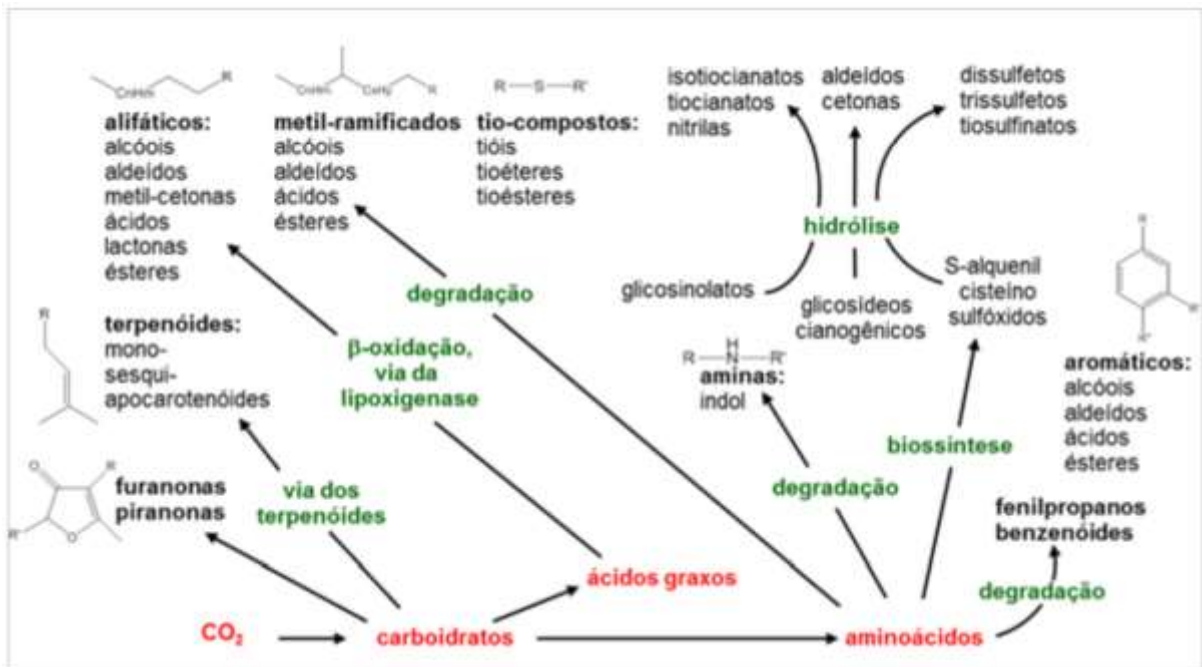
Outra classe de voláteis são os derivados de aminoácidos, estes podem regular o aroma tanto positivamente quanto negativamente. Entretanto, nenhum é considerado contribuinte principal no aroma do tomate. Geralmente derivam dos aminoácidos leucina, isoleucina e fenilalanina, e o conteúdo destes voláteis é um bom indicador da presença de aminoácidos livres

(RAMBLA *et al.* 2014).

Alterações genéticas que afetam vias de biossíntese de compostos orgânicos podem alterar a disponibilidade de precursores de voláteis, impactando diretamente na qualidade do aroma. Ainda, deve-se considerar que a aceitabilidade do consumidor não está relacionada unicamente ao aroma, mas sim a combinação de todo o conjunto formador do *flavor*, incluindo o conteúdo de açúcares e ácidos orgânicos que também pode sofrer influência de alterações genéticas (TIEMAM *et al.* 2017).

Figura 2: Principais precursores e vias de formação de compostos voláteis em frutos.

Adaptado de Schwab; Davidovich-rikanati; Lewinsohn (2008).



3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As sementes da cultivar Micro-Tom (MT) de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) e dos mutantes *Beta carotene* (*B*), *tangerine* (*t*) e *high pigment 2* (*hp2*) foram obtidas da coleção de mutantes do laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal da ESALQ-USP. Os genótipos foram introgridos no *background* genético da cv. MT e suas características estão detalhadas na Tabela 1.

Para a obtenção dos duplos mutantes (*B/hp2* e *t/hp2*), os respectivos mutantes homocigotos simples foram cruzados originando gerações híbridas (F1), as quais são heterocigotas para ambas as mutações. Estas plantas foram autofecundadas e originaram populações segregantes (F2), nas quais, os duplos mutantes *B/B:hp2/hp2* e *t/t:hp2/hp2* foram encontrados. Para a seleção dos duplos mutantes, buscou-se o fenótipo de cada uma das mutações em questão (Tabela 1) em uma única planta. Uma vez identificadas, as plantas dos duplos mutantes foram autofecundadas (F3) visando a obtenção de sementes homocigotas para ambos os locos.

Tabela 1. Descrição dos mutantes que foram utilizados neste trabalho.

Mutação	Cromossomo	Função gênica/descrição
<i>tangerine</i> (<i>t</i>)	10	Perda de função da enzima CAROTENOIDE <i>cis-trans</i> ISOMERASE (CRTISO). Frutos acumulam prolicopeno ao invés de licopeno e possuem uma coloração alaranjada, as flores possuem uma coloração laranja mais intensa (ISAACSON et al, 2002).
<i>Beta carotene</i> (<i>B</i>)	6	O alelo mutado causa ganho de função da enzima LICOPENO BETA CICLASE (LBY-b), específica de cromoplasto, convertendo a maioria do licopeno em Beta caroteno, gerando frutos de coloração laranja (RONEN et al, 2000).
<i>high pigment</i> (<i>hp2</i>)	1	O alelo mutado causa resposta exagerada à luz, sendo um regulador negativo da fotomorfogênese. As plantas apresentam alta pigmentação por clorofila em folhas e frutos. Os frutos apresentam alto conteúdo de carotenoides e ácido ascórbico (MUSTILLI et al, 1999).

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, localizada no Campus de Curitiba, da Universidade Federal de Santa Catarina, com condições de temperatura e umidade controlada. A semeadura de cada genótipo foi realizada em vasos de 250 mL, contendo substrato comercial e vermiculita expandida na proporção de 1:1. O transplântio foi realizado no estádio vegetativo V2, ou seja, quando as plantas apresentaram o primeiro par de folhas verdadeiras. As plantas foram cultivadas em vasos individuais, com capacidade de 700 mL, contendo substrato comercial e vermiculita na proporção de 1:1, sendo para cada litro de substrato, adicionado 4 g de calcário e 1 g de fertilizante NPK 10-10-10. A adubação foliar foi realizada semanalmente com fertilizante PETERS NPK 20-20-20 na proporção 1g L⁻¹.

A irrigação antes do transplântio foi realizada manualmente, conforme a necessidade das plântulas. Após o transplântio, os vasos foram expostos sobre um filme plástico, sobre o qual foi mantido uma lâmina de água de 2 a 3 cm, através de reposições periódicas, ao longo de todo o ciclo de desenvolvimento das plantas. O controle de pragas e doenças foi realizado conforme a necessidade, utilizando-se os produtos recomendados.

3.2 PARAMETROS AVALIADOS

3.2.1 Desempenho produtivo

O número e a massa dos frutos verdes e maduros por planta foram determinados em 15 plantas por genótipo aos 90 dias após a germinação.

3.2.2 Análises físico-químicas

Coloração da epiderme: foi determinada com auxílio de um colorímetro (Minolta Chroma Meter CR-300) realizando leituras na região equatorial dos frutos. Os dados representados em escala L*, a*, b* foram utilizados para calcular os parâmetros de luminosidade e ângulo de cor (hue).

Sólidos solúveis totais (SST): foi determinado por refratometria em 12 frutos maduros de cada genótipo e os resultados expressos em °brix.

Teor de ácido ascórbico (AA): o conteúdo de ácido ascórbico foi determinado por titulação, através da redução do indicador 2,6-diclorofenol indolfenol-sódio (DCFI) pelo ácido ascórbico. Para isso, amostras de pericarpo triturado foram acondicionadas em erlenmeyer contendo solução de ácido oxálico a 1%. A titulação foi efetuada com DCFI até atingir a coloração salmão, persistente por 15 segundos. Os resultados foram expressos em miligramas

de ácido ascórbico por 100 gramas de tecido.

3.2.3 Avaliação dos componentes voláteis por SPME/CGMS

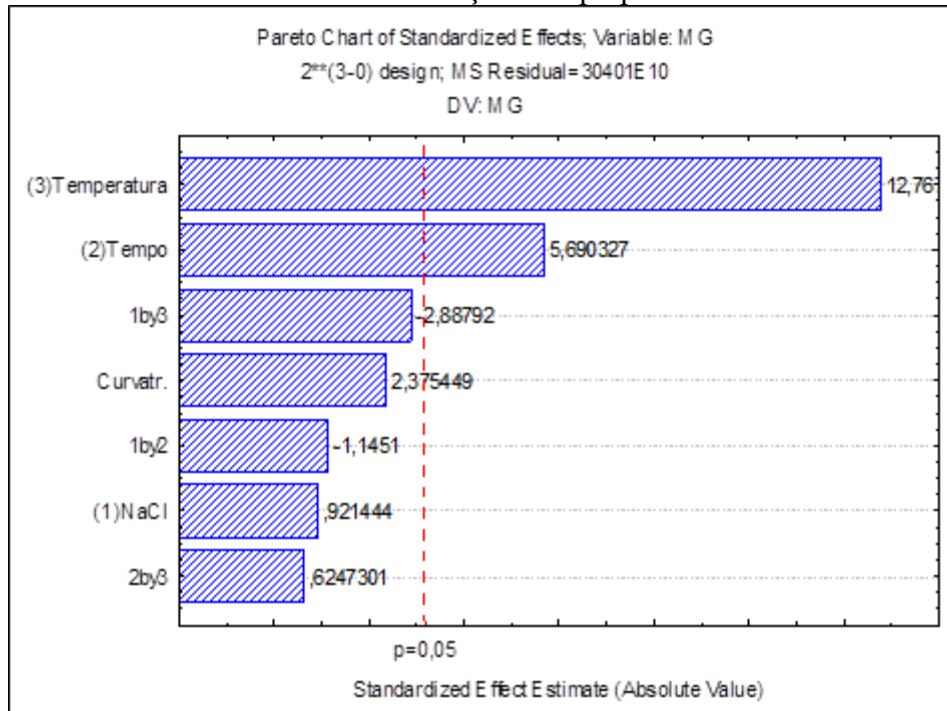
A avaliação do perfil de componentes voláteis foi realizada em colaboração com os Professores Dra. Dilma Budziak e Dr. Cristian Soldi, no Laboratório Multiusuário de Análise Instrumental (LAMAI) na UFSC - Campus de Curitibanos.

Microextração em fase sólida (SPME): para a extração dos compostos voláteis por SPME (*solid phase microextraction*) foram utilizadas 3 g de polpa de tomate em frascos âmbar de 15 mL contendo septo de silicone (supelco). Todas as amostras foram maceradas logo após a coleta, pesadas e imediatamente congeladas em freezer à -20 °C até o momento da análise. Para as amostras que foram avaliadas quanto à influência da força iônica do meio, NaCl foi adicionado antes do congelamento. Para a adsorção dos componentes voláteis, foi empregada, após seleção prévia, uma fibra com revestimento DVB/Carboxen/PDMS (SUPELCO analytical).

Como estratégia de otimização da extração, um planejamento fatorial completo, seguindo o modelo de Pareto, foi realizado para avaliar as significâncias preliminares das variáveis, assim como as interações entre elas (Figura 3). As variáveis foram investigadas em três níveis, incluindo temperatura de extração (30, 45 e 60°C), tempo de extração (20, 30 e 40 min), e força iônica pela adição de cloreto de sódio (0, 1 e 2 g). Cinco replicatas no ponto central foram incluídas no planejamento. Para avaliação da influência destes fatores foi utilizada a média geométrica das áreas absolutas dos 10 componentes presentes em maior quantidade, obtidas após injeção em cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas (CGMS).

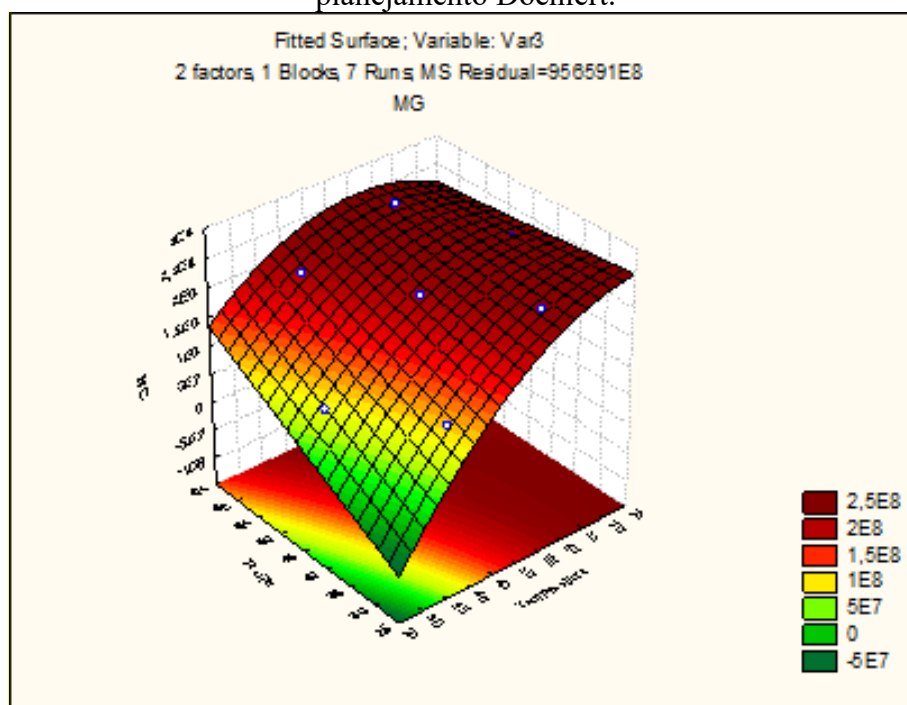
De acordo com os resultados, o gráfico de Pareto indica forte influência positiva da temperatura e do tempo de extração, mas pouca influência do aumento da força iônica do meio pela adição de cloreto de sódio. Os resultados positivos para temperatura e tempo também indicam que temperaturas mais elevadas e maiores tempos de extração podem favorecer melhores resultados para os 10 componentes majoritários selecionados.

Figura 3. Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial completo na otimização das variáveis e suas interações em polpa de tomate



Assim, para determinar a melhor temperatura e o melhor tempo de extração, foi executado o planejamento Doehlert com 5 temperaturas (30, 40, 50, 60 e 70 °C) e 3 tempos de extração (30, 45 e 60 min). Com os resultados foi possível construir a superfície de resposta da figura 4. Avaliação da média das áreas absolutas dos 10 componentes majoritários indicou que a temperatura e o tempo ótimo para a extração dos componentes voláteis das amostras de tomate é 67 °C e 46 min. As amostras foram então removidas do congelador, deixadas à 60 °C por 5 min e submetidas à extração sob as condições ótimas. A fibra foi inserida no injetor do CGMS por 5 minutos (250 °C) para dessorção dos componentes adsorvidos.

Figura 4. Superfície de resposta obtida na otimização das condições de extração a partir do planejamento Doehlert.



Análise por CGMS: os componentes foram desorvidos em cromatógrafo a gás (Agilent, modelo 7890A) acoplado à um espectrômetro de massas (MS 5975C). Foi utilizada a coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) com fluxo de gás Hélio de 0,8 ml min^{-1} . A temperatura do forno foi programada de 40 a 50 $^{\circ}\text{C}$, a uma taxa de aquecimento de 2 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, com 3 min de espera à 50 $^{\circ}\text{C}$, de 50 a 70 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de 3 $^{\circ}\text{C por minuto}$ e de 70 a 250 $^{\circ}\text{C}$, a uma taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$. A temperatura do injetor foi fixada a 250 $^{\circ}\text{C}$, com injeção sem divisão de fluxo (splitless) e a temperatura da interface foi mantida em 300 $^{\circ}\text{C}$. O detector de massas foi operado por impacto de elétrons (EI)-mode de 70 eV em uma faixa de 35 – 450 m/z.

Para comparação entre as amostras, foram utilizadas as médias, de três análises, das áreas absolutas de cada pico. Os picos foram integrados manualmente em software G1701EA GC/MSD Chemstation. A identificação dos componentes foi realizada através da análise comparativa dos espectros de massas referente a cada pico com os espectros de massas de padrões autênticos e do índice de retenção linear (Kovats) para cada substância (ADAMS, 2017). Os índices de retenção de Kovats experimentais foram obtidos através da injeção de uma mistura de *n*-alcanos (C7-C30; Sigma Aldrich) sob as mesmas condições utilizadas para a separação dos componentes das amostras.

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE DOS DADOS

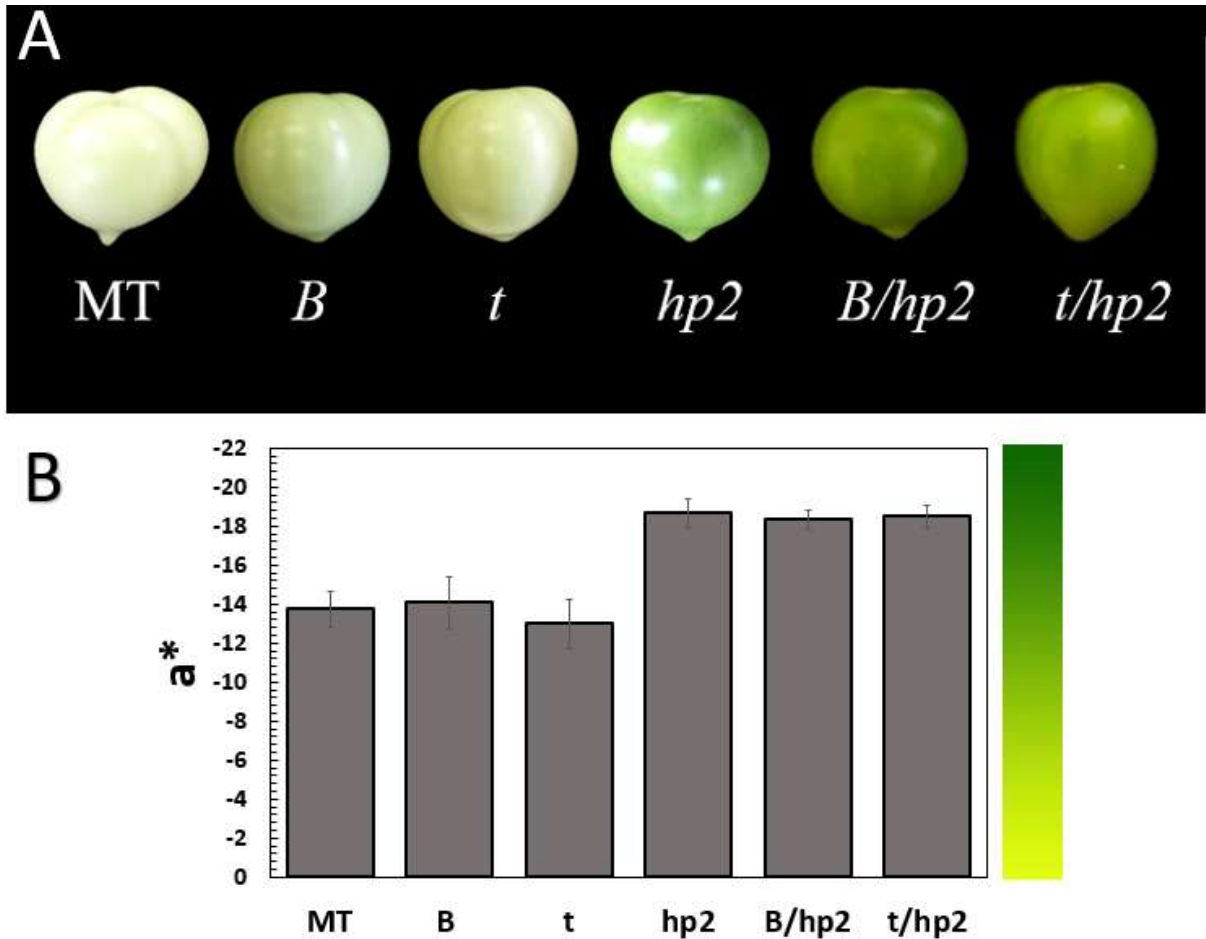
O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Os dados obtidos através das análises dos parâmetros avaliados em ambas as etapas foram utilizados para a formulação das médias, sendo que tais valores foram submetidos a análise estatística no software R studio (versão 3.2.5), utilizando o teste Shapiro-Wilk para determinar normalidade de dados e o teste de Tukey para determinação da análise de significância, com diferenciação a 5% de probabilidade de erro.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E DESEMPENHO PRODUTIVO DAS LINHAGENS

Para caracterizar o fenótipo das linhagens geradas realizou-se um estudo comparativo dos duplos mutantes em relação aos parentais. Na figura 5A, pode-se observar as diferenças de coloração dos frutos no estágio verde maduro entre os diferentes genótipos estudados. Os duplos mutantes possuem uma coloração verde mais intensa, este fenótipo está relacionado a uma maior quantidade de clorofila, característica inerente da sinalização luminosa amplificada nas linhagens portadoras do alelo *hp2* (MUSTILLI *et al.* 1999; POWELL *et al.* 2012). Com os dados colorimétricos (Figura 5B), a modificação na coloração dos frutos pode ser confirmada. O valor de a^* , para as linhagens que contém o alelo *hp2* foi inferior em relação aos demais, indicando incremento na intensidade da coloração verde da epiderme dos frutos.

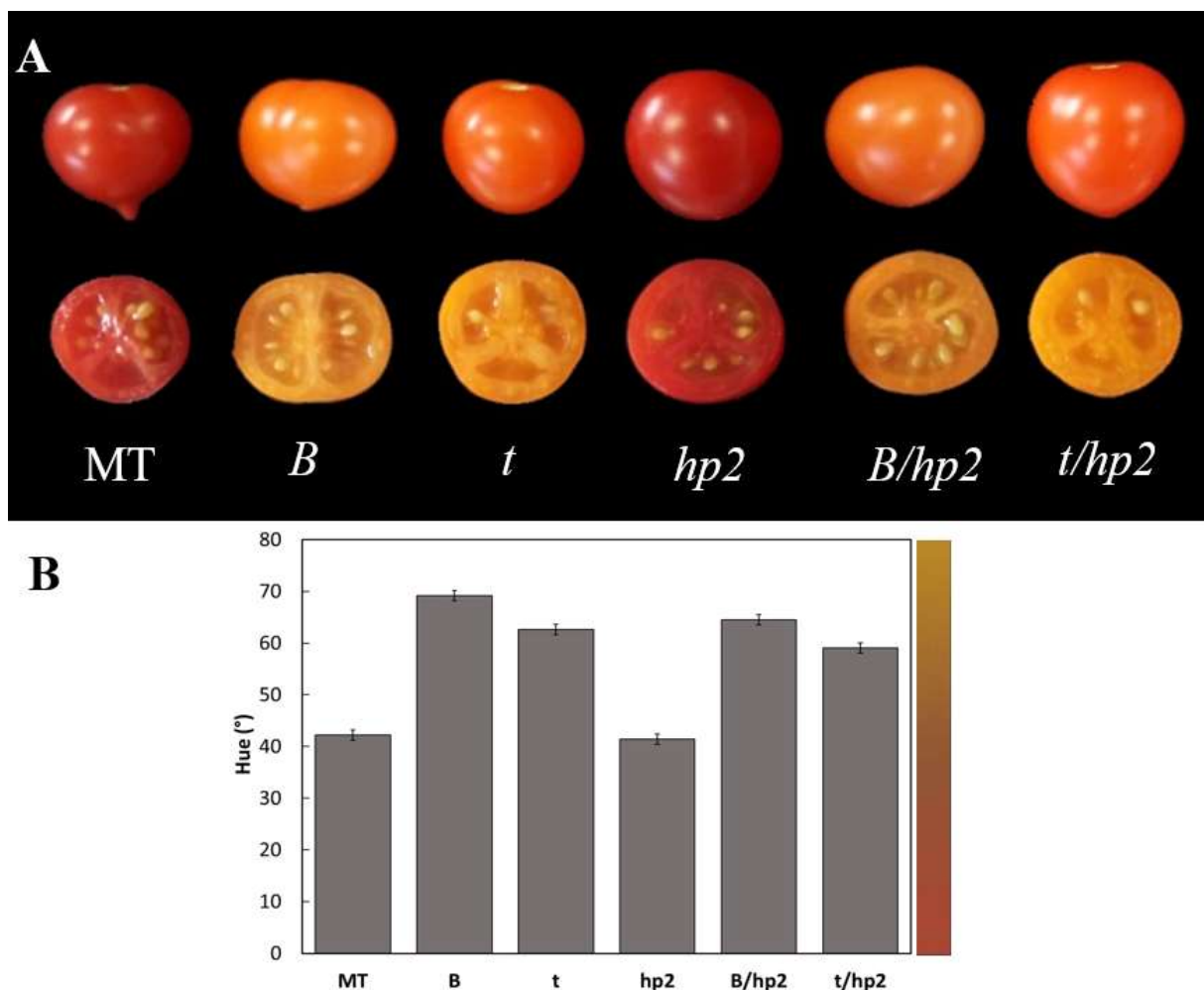
Figura 5. Fenótipo e cor da epiderme dos frutos verdes. Aspecto visual externo dos mutantes *B*, *t*, *hp2* comparado com o dos duplos mutantes *B/hp2* e *t/hp2*(A). Valor de a^* dos frutos. Valores decrescentes de a^* indicam aumento na intensidade da cor verde (B). Barras verticais indicam o erro padrão da média.



Vale ressaltar que os alelos *B* e *t* atuam apenas em cromoplasto, portanto não são expressos em frutos verdes (ISAACSON et al, 2002; RONEN et al, 2000). Deste modo, estes alelos influenciam somente no fenótipo dos frutos no estágio maduro, que pode ser observado na Figura 6A. O ganho de função da enzima licopeno beta ciclase, assim como a perda de função de uma carotenoide isomerase nos duplos *B/hp2* e *t/hp2* respectivamente, permitiu que os frutos dos duplos mutantes mantivessem a coloração alaranjada semelhante dos parentais *B* e *t*, provavelmente em razão do tipo predominante de carotenoide acumulado (beta caroteno e tetra-*cis*-licopeno). Apesar disso, é bem provável que o conteúdo de carotenoides nos duplos mutantes seja diferenciado dos parentais *B* e *t*, considerando que a amplificação luminosa pela presença do alelo *hp2*, possa favorecer o acúmulo destes isômeros em específico. Os dados

colorimétricos indicam um pequeno decréscimo no ângulo de cor ($^{\circ}$ Hue) nos duplos em relação aos respectivos parentais *B* e *t*, possível efeito da interação com o alelo *hp2*. Contudo, análises adicionais serão necessárias para comprovar tais alterações no perfil e no conteúdo destes compostos nestas linhagens.

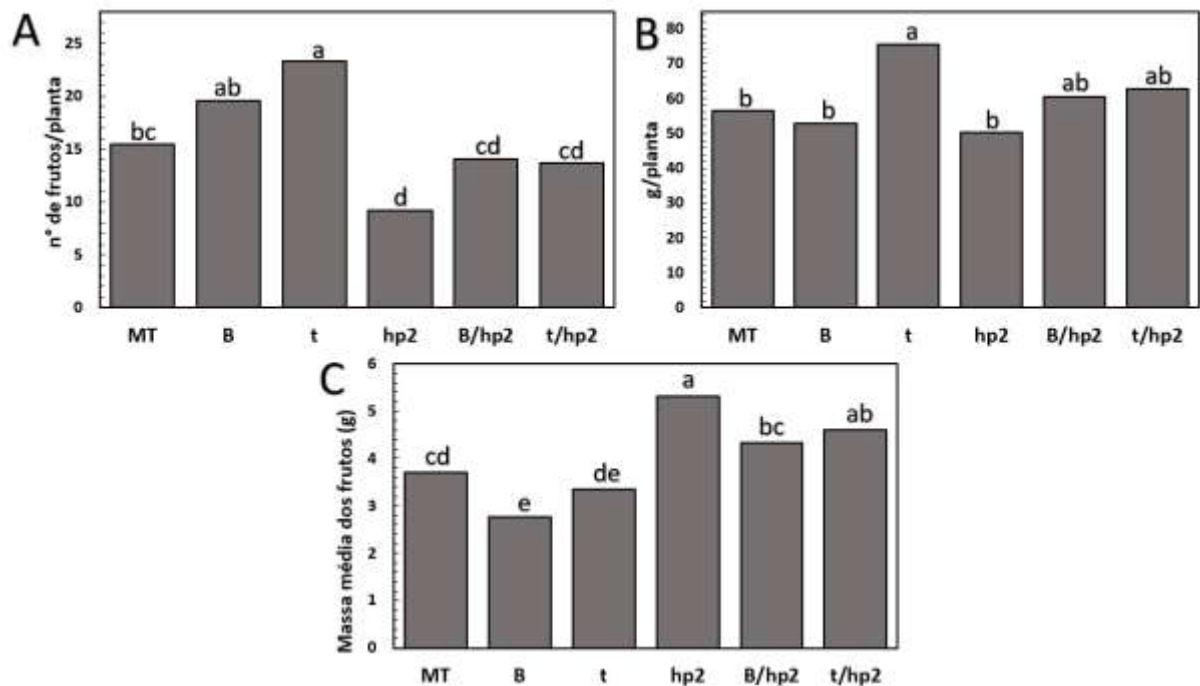
Figura 6. Fenótipo e cor da epiderme dos frutos maduros. Aspecto visual interno e externo dos mutantes *B*, *t*, *hp2* comparado com o dos duplos mutantes *B/hp2* e *t/hp2*(A). Ângulo de cor dos frutos valores crescentes de hue indicam coloração amarela, e decrescentes indicam o vermelho (B). Barras verticais indicam o erro padrão da média.



Além da caracterização fenotípica, avaliou-se o desempenho produtivo das linhagens. Os resultados indicam que o número médio de frutos por planta foi reduzido nos duplos mutantes em relação aos parentais *B* e *t* (Figura 7A). Os dados sugerem que a redução no número de frutos está relacionada a presença do alelo *hp2*. Entretanto, a comparação entre os duplos mutantes com os parentais, em relação ao peso médio dos frutos por planta, demonstrou

que a produtividade não foi significativamente afetada (Figura 7B). Este efeito compensatório na produtividade está relacionado a maior massa médio de frutos dos duplos em relação aos parentais *B* e *t*, assim como demonstra a Figura 7C.

Figura 7. Desempenho produtivo da cv. MT, dos mutantes *B*, *t*, *hp2* e duplos mutantes *B/hp2* e *t/hp2*. Número médio de frutos por planta (A). Massa média de frutos por planta (B). Massa de frutos (C). Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$).



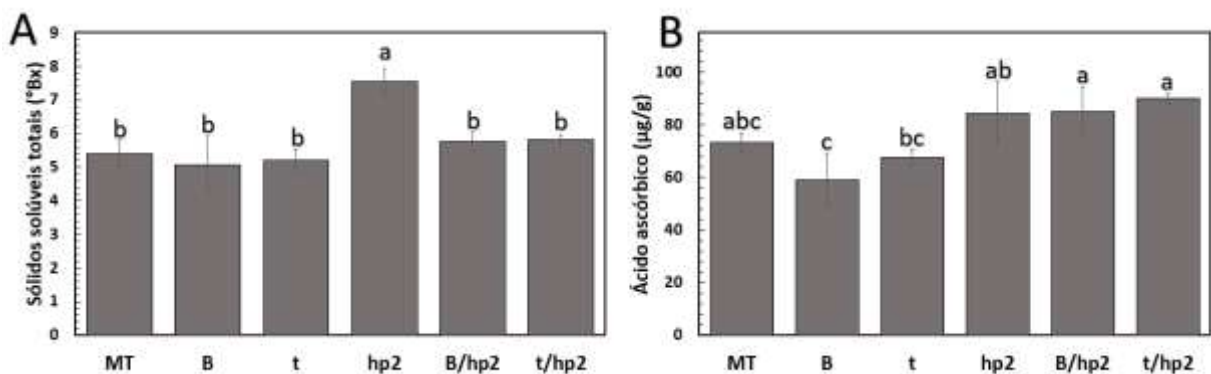
4.2 PARÂMETROS DE QUALIDADE NUTRICIONAL

Estudos recentes que caracterizaram as mutações que afetam a carotenogênese e a sinalização luminosa individualmente, demonstram que alguns atributos de qualidade nutricional do fruto são afetados (ORSI, 2018; BINO *et al.* 2005; MUSTILLI *et al.* 1999). Neste trabalho, acessamos os principais parâmetros citados por estes autores, buscando conferir o impacto causado entre as combinações destes alelos e comparando-os com os respectivos parentais. O conteúdo de sólidos solúveis totais (SST), é determinante tanto para o sabor do fruto quanto ao caráter nutricional, pois inclui carboidratos, ácidos orgânicos, proteínas e minerais. De acordo com os resultados, os duplos mutantes gerados não alteraram significativamente o conteúdo de SST em relação as demais linhagens, exceto à *hp2* (Figura 8A). Conforme já mencionado, os mutantes *high pigment* exibem altos teores de clorofila em

frutos verdes, o que possibilita maior atividade fotossintética e conseqüentemente maior conteúdo de SST em *hp2* (POWELL *et al.* 2012). Entretanto, o mesmo não ocorreu significativamente nas linhagens *B/hp2* e *t/hp2*, este efeito pode estar relacionado a maior canalização de compostos orgânicos para outras vias de biossíntese, potencializadas pela interação entre os alelos. Contudo, novos estudos serão necessários para afirmar tal suposição.

Além do maior conteúdo de sólidos solúveis totais, os mutantes *hp1* e *hp2* são conhecidos por apresentarem teores elevados de ácido ascórbico (vitamina C) (BINO *et al.* 2005). A quantificação de ácido ascórbico no presente trabalho comprovou a maior capacidade do mutante *hp2* em produzir o composto, e ao contrário do que acontece com o conteúdo de SST, os duplos mutantes não apresentaram redução no conteúdo de ácido ascórbico em relação a *hp2*, havendo um aumento significativo deste antioxidante nos duplos quando comparados ao observado em *B* e *t* (Figura 8B). Este resultado, juntamente com um esperado acúmulo predominante de isômeros de carotenoides mais bioativos, faz dos duplos mutantes promissoras fontes de fitonutrientes com propriedades antioxidantes tanto em extrato lipofílico em razão dos carotenoides, quanto em extrato hidrofílico devido ao ácido ascórbico.

Figura 8. Parâmetros de qualidade da cv. MT, dos mutantes *B*, *t*, *hp2* e duplos mutantes *B/hp2* e *t/hp2*. Sólidos solúveis totais (A). Ácido ascórbico (B). Barras verticais indicam o erro padrão da média. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$).



4.3 PERFIL DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DOS FRUTOS

Para averiguar se a combinação de *hp2* com os alelos *Beta* e *tangerine* afeta os componentes do aroma dos frutos, os compostos orgânicos voláteis produzidos pelos frutos que amadureceram na planta foram capturados por meio de micro extração em fase sólida (SPME) e analisados por espectrometria de massa associada à cromatografia em fase gasosa (GC-MS).

Com as condições ótimas de extração determinadas (item 3.2.3), todas as amostras foram avaliadas em triplicata. Foram identificados 33 compostos orgânicos voláteis (Tabela 2), dos quais 22 contribuem para o aroma característico do tomate (KLEE; TIEMAM, 2012; GOFF; KLEE, 2006). Apresentamos a seguir, um comparativo das principais alterações observadas nos componentes do aroma das linhagens, em função dos principais precursores metabólicos.

Tabela 2. Compostos orgânicos voláteis

Composto orgânico volátil	RT (min.)	Kl exp	Kl _{theoretical}	Notas de aroma*	% relativa					
					MT	B	t	hp2	B/hp2	t/hp2
Apocarotenoides										
6-metil-5-Hepten-2-one	14,55	990,69	986	Frutado, floral	18,49	2,24	11,57	17,17	0,91	8,97
β -Ciclocitral	21,20	1225,99	1196	Herbáceo	0,45	3,77	0,32	0,61	5,28	0,39
Neral	21,55	1247,21	1238	Cítrico	2,19	0,17	0,48	2,89	0,14	0,60
Geranial	22,07	1277,23	1267	Cítrico	5,40	0,35	1,05	6,06	0,28	1,26
Geranil acetone	24,72	1460,64	1455	Floral	10,91	2,15	34,04	10,57	1,78	30,76
β -Ionona	25,19	1495,94	1489	Frutado	1,08	8,44	0,89	1,52	11,96	1,16
Dihidroactinidiolide	25,84	1548,91	1532	Doce	0,28	1,29	0,08	0,34	2,88	0,17
Outros terpenoides										
α-Pinene	11,390	937,03	939	Pinho	0,60	1,09	0,58	0,41	0,75	0,59
b-Pinene	13,716	977,77	979	Pinho	0,35	0,58	0,32	0,25	0,46	0,35
o- Cimenol	16,18	1.031,42	1.026	Doce	0,61	0,95	0,58	0,54	0,86	0,66
Limonene	16,34	1.036,23	1.029	Limão	1,91	3,20	1,95	1,56	2,83	2,29
Cineol 1,8	16,42	1.038,73	1.031	Canforado	3,66	7,27	4,24	3,03	5,20	4,32
b-Ocimene (Z)	16,78	1.049,29	1.037	Herbáceo	0,47	0,77	0,47	0,52	0,76	0,56
b-Ocimene (E)	17,12	1.059,14	1.050	Herbáceo	0,57	0,94	0,57	0,48	0,66	0,65
Linolol	18,64	1.102,24	1.097	Floral	7,85	12,07	6,70	6,26	7,13	7,48
Camphor	19,64	1.149,58	1.146	Canforado	2,12	3,66	2,41	1,87	2,09	2,62
Terpinen-4-ol	20,36	1.182,05	1.177	Pinho	1,87	2,56	1,56	1,49	1,30	1,78
Linalil acetate	21,78	1.260,41	1.257	Frutado, floral	2,56	3,03	2,03	2,31	2,97	3,22

Ácidos graxos										
Hexanal	5,39	803,07	802	Folha Verde	7,33	7,97	4,26	4,97	5,78	2,83
(E)-2-Hexenal	7,41	856,41	855	Folha Verde	4,89	9,48	6,32	9,18	18,29	8,51
(Z)-3-Hexenol	7,52	858,87	859	Folha Verde	2,03	1,61	0,92	1,58	3,32	1,46
n-hexanol	8,15	872,20	871	Folha Verde	1,20	0,77	0,37	0,42	0,60	0,24
Heptanal	9,77	903,35	902	Folha Verde	0,42	0,37	0,24	0,19	0,27	0,26
2E, 4E Hexadienal	10,23	913,48	910	Verde adocicado	0,10	0,12	0,08	0,11	0,45	0,10
Nonenal	19,97	1.164,73	1.162	Cítrico, Floral	1,03	1,39	0,97	0,98	1,17	0,75
Decenal 2E	21,87	1.265,89	1.264	Floral	0,35	0,80	0,19	0,41	0,91	0,20
Metil hexanoate	11,11	931,65	927	Frutado	0,36	0,62	0,28	0,43	0,50	0,32
Metil octanoate	19,23	1.130,12	1.127	Frutado	0,41	0,51	0,34	0,49	0,33	0,50
Metil hexadecanoate	30,00	1.926,77	1.922	Frutado	4,09	0,99	2,07	4,65	0,72	3,17
Aminoácidos										
Estireno	9,11	890,87	883	Floral adocicado	0,44	0,82	0,47	0,37	0,63	0,50
2-isobutil-Thiazole	16,53	1.041,95	1.035	Verde	2,16	2,82	2,45	1,59	3,32	2,75
Acetofenona	17,60	1.072,92	1.065	Doce	0,39	0,64	0,39	0,36	0,32	0,45
Metil salicylate	20,72	1.197,86	1.192	Mentolado	3,20	4,23	5,11	4,62	2,13	3,88

* Fonte Pubchem database

4.3.1 Voláteis derivados de carboidratos

A análise de compostos voláteis identificou 18 compostos derivados de carboidratos (Tabela 2). Terpenoides em geral são os principais substratos para a formação de voláteis dentro da classe. Carotenoides se diferenciam dos demais terpenoides por derivarem do composto geranylgeranyl difosfato (GGPP) e iniciarem uma via biossintética diferenciada de monoterpenos e sesquiterpenos que derivam de geranyl difosfato (GPP) e farnesil difosfato respectivamente (SCHAWAB; DAVIDOVICH-RIKANATI; LEWINSOHN, 2008). Detectamos neste trabalho 7 apocarotenoides e 11 compostos derivados de monoterpenos e sesquiterpenos.

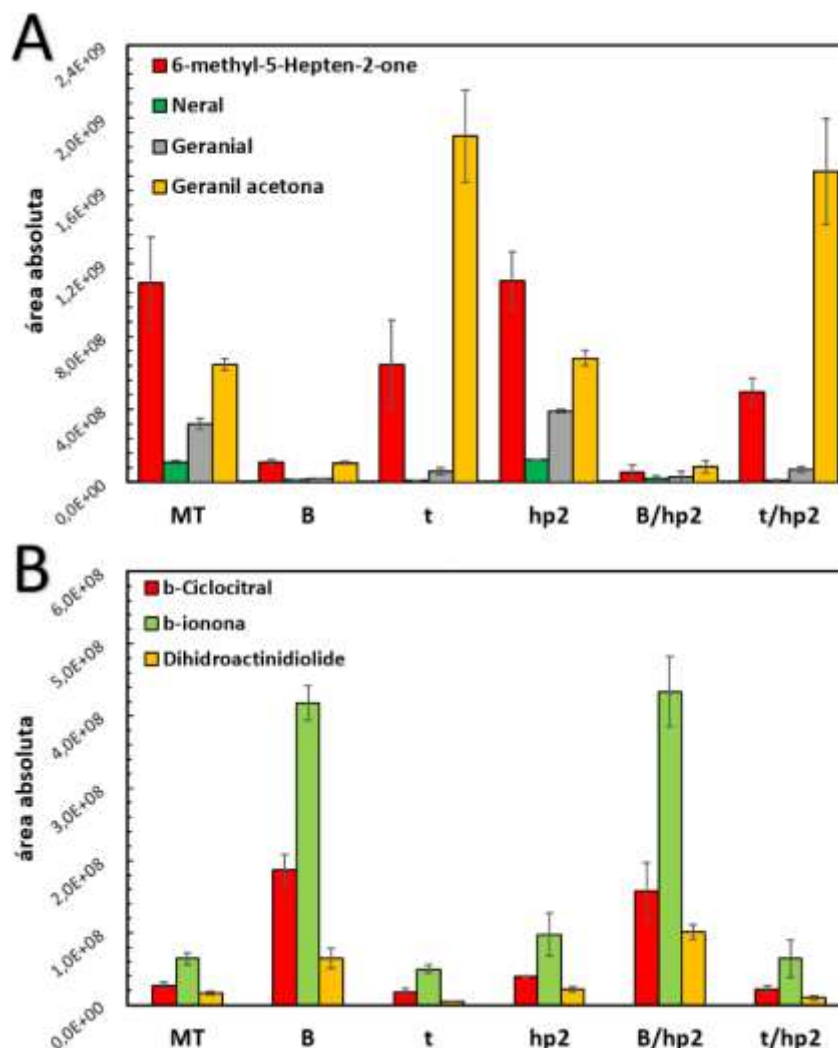
Enzimas da família das dioxigenases clivadoras de carotenoides (CCDs) são responsáveis pela formação da maioria de voláteis derivados de carotenoides e podem também atuar na clivagem de outros terpenos (SCHMIDT; KURTZER; EISENREICH, *et al* 2006). A expressão destas enzimas tende a aumentar durante o processo de amadurecimento, evidenciando uma relação do estágio de maturidade dos frutos com a qualidade de aroma (KLEE; TIEMAM, 2012). Embora algumas isoformas de CCDs possam clivar diferentes tipos de carotenoides, outras possuem especificidade por carotenoides lineares ou cíclicos, o que pode ajudar a explicar as diferenças nos compostos voláteis nas linhagens estudadas (SIMKIN *et al.* 2004). Os compostos 6-metil-5-Hepten-2-one (MHO) e geranial contribuem para o aroma do tomate e são originados a partir de clivagem oxidativa de carotenoides de cadeia linear, especialmente licopeno. O duplo *t/hp2* assim como seu parental *t*, teve redução no conteúdo destes compostos. Esta redução foi ainda mais drástica para *B/hp2* e *B*. Geralmente, o conteúdo de voláteis é proporcional ao seu carotenoide precursor, por esta razão MT e *hp2* apresentam um aumento relativo destes compostos em relação as demais linhagens, já que acumulam preferencialmente carotenoides de cadeia linear (Figura 9). De maneira semelhante, o composto neral apresentou acréscimo no conteúdo relativo em MT e *hp2*, provavelmente em razão da disponibilidade do precursor licopeno (GOFF; KLEE, 2006).

O duplo *t/hp2* e o parental *t*, exibiram um considerável aumento no conteúdo de geranyl acetona, outro composto derivado de carotenoide de cadeia linear. Provavelmente, o prolícopeno acumulado nestas linhagens serviu de substrato para a formação de geranyl acetona.

Os carotenoides cíclicos geralmente são produzidos em baixos níveis em frutos maduros, mas costumam influenciar fortemente o aroma por possuir limiares de odor muito baixos. O composto β -ionona, por exemplo, possui um limiar de odor de 0,007 partes por bilhão (ppb) enquanto o limiar de odor para MHO é de 2000 ppb (GOFF; KLEE, 2006). No mutante

B, o acúmulo preferencial de beta caroteno aumentou consideravelmente os níveis de b-ionona, já que este carotenoide serve de substrato para a formação deste composto volátil. Interessantemente, a concentração relativa de b-ionona foi potencializada no mutante *B/hp2*, havendo um aumento de 11 vezes no percentual relativo do composto em relação a MT. Os compostos voláteis β -ciclocitral e dihidroactinidiolide também tem como precursor principal o beta caroteno e apresentaram aumento relativo nas linhagens portadoras do alelo *B*, em relação as demais linhagens.

Figura 9. Compostos orgânicos voláteis derivados de carotenoides lineares (A) e de carotenoides cíclicos (B). Barras verticais indicam o erro padrão da média.



Além dos voláteis derivados de carotenoides, outros terpenoides incluindo monoterpenos e sesquiterpenos podem influenciar o aroma, entretanto a influência destes compostos está mais relacionada a partes vegetativas do tomateiro, portanto pouco agregam ao aroma do fruto. Em frutos maduros os compostos mais encontrados desta classe são o limoneno,

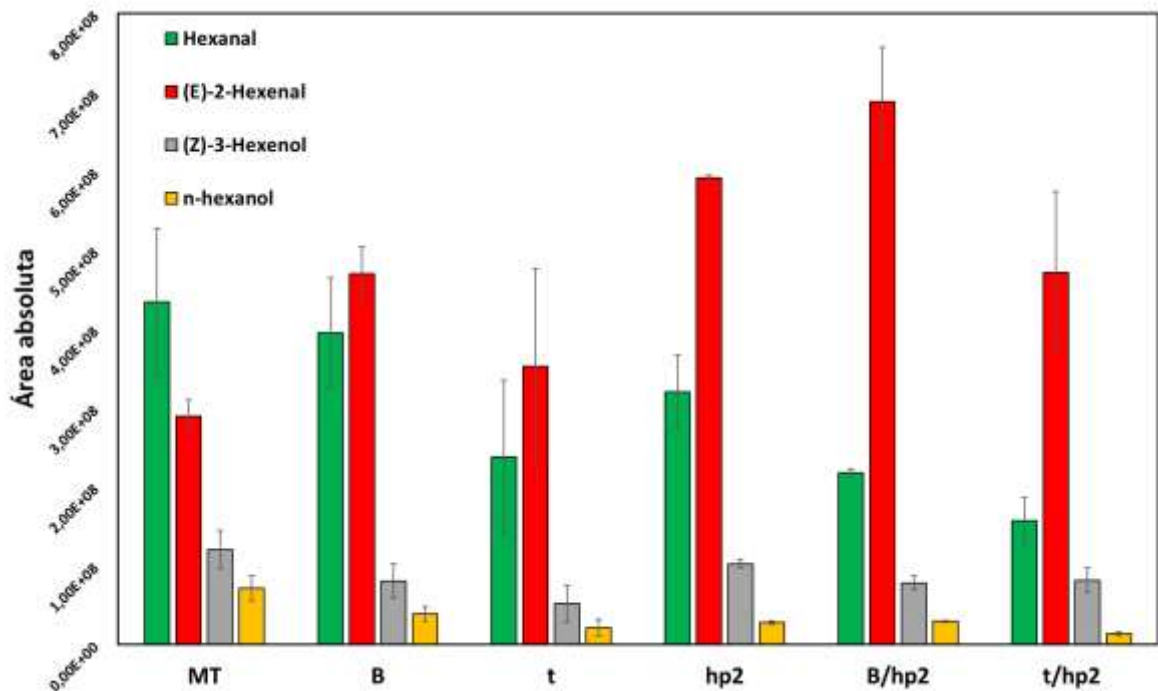
o linolool e o terpinen-4-ol (RAMBLA et al, 2014). Neste trabalho, podemos destacar um aumento considerável na concentração relativa de linolool no mutante *B*, composto que pode agregar notas de aromas florais ao tomate. O mesmo resultado não foi tão evidente para o duplo *B/hp2* e demais linhagens.

4.3.2 Voláteis derivados de ácidos graxos

Identificou-se 11 compostos voláteis derivados de ácidos graxos nas linhagens estudadas (tabela 2). Os genótipos apresentaram variações interessantes no conteúdo relativo destes compostos. Estes resultados indicam que mesmo as alterações alélicas não estarem diretamente envolvidas com a biossíntese de ácidos graxos, podem influenciar indiretamente a disponibilidade destes precursores.

O conjunto de voláteis Hexanal, (E)-2-Hexenal, (Z)-3-Hexenal são encontrados em níveis significativos no tomate, e são responsáveis por grande parte do aroma de tomate fresco com notas de aroma de folha verde, assim como os compostos n-hexanol, heptanol e 2E, 4E Hexadienal que também foram identificados nas linhagens (KLEE; TIEMAM, 2012). Neste conjunto, destacamos uma queda no conteúdo relativo de hexanal nos duplos mutantes em comparação aos respectivos parentais *B* e *t*. O composto (E)-2-Hexenal possui um limiar de odor de 0,26 ppb, o que torna seu acúmulo preferencial em relação ao hexanal que possui um limiar de odor de 5 ppb (BIRTIC *et al.* 2009). Curiosamente, todas as linhagens estudadas demonstraram aumento no percentual relativo de (E)-2-Hexenal quando comparadas a MT, com destaque para o duplo *B/hp2* onde a produção do composto foi consideravelmente potencializada. A produção de outros compostos voláteis como 2E, 4E Hexadienal, Nonenal e decenal 2E, também foi beneficiada na linhagem *B/hp2*. Os compostos metil hexanoato, metil octanoato e metil hexadecanoato possuem notas de aroma frutado, entretanto ainda pouco se sabe sobre o impacto destes voláteis no aroma do tomate. Embora a maioria dos voláteis derivados de ácidos graxos sejam provenientes de ácido linoleico e ácido linolênico; o metil hexadecanoato é um composto derivado do ácido palmítico e apresentou maior concentração relativa para *hp2* e MT, intermediária para linhagens portadoras do alelo *t* e menores para linhagens portadoras do alelo *B*, indicando uma possível relação do tipo de carotenoide acumulado com a disponibilidade de ácidos graxos precursores de voláteis. Não obstante, novos estudos serão necessários para compreender a relação dos alelos estudados com esta classe de voláteis.

Figura 10. Principais compostos orgânicos voláteis derivados de ácidos graxos. Barras verticais indicam o erro padrão da média.



4.3.3 Voláteis derivados de aminoácidos

Embora os voláteis derivados de aminoácidos não estejam entre os principais formadores de aroma no tomate, podem agregar algumas notas de aroma ao fruto (GOFF; KLEE, 2006). Neste trabalho foram identificados nas linhagens, 4 compostos voláteis derivados de aminoácidos (tabela 2).

O composto metil salicilato está relacionado a defesa contra estresses e afeta negativamente o aroma (TIEMAN *et al.* 2017). O conteúdo relativo de metil salicilato variou entre as linhagens, sendo que o decréscimo mais acentuado em relação a MT ocorreu em *B/hp2*. Outros compostos derivados de aminoácidos como o estireno, 2-isobutil-thiazole e a acetofenona também exibiram variações entre as linhagens, entretanto é pouco provável a influência destes compostos na percepção do consumidor.

5 CONCLUSÃO

A combinação de *hp2* com os alelos *B* e *t* intensifica o valor nutricional dos frutos ao elevar o conteúdo de ácido ascórbico em frutos ricos em Beta caroteno ou tetra-*cis*-licopeno. Além disso, o incremento de β -ionona e (E)-2-Hexenal em *B/hp2* e de geranyl acetona em *t/hp2* contribui positivamente para o aroma do fruto. Tais alterações não comprometem a produtividade das linhagens.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, Robert P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4th. ed. Illinois: Allured Publishing Corp.: Carol Stream, USA, 2007.
- ALVES, Frederico Rocha Rodrigues *et al.* Beyond the limits of photoperception: constitutively active PHYTOCHROME B2 overexpression as a means of improving fruit nutritional quality in tomato. **Plant Biotechnology Journal**, São Paulo, v. 18, n.2, p. 2027-2041, 18 fev. 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pbi.13362>. Acesso em: 21 out. 2020.
- AZARI, Raviv. *et al.* Light signaling genes and their manipulation towards modulation of phytonutrient content in tomato fruits. **Biothechnology Advances**. v.28, p.108-118, 2010.
- BORDIGNON, S. R. **Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “ Luiz de Queiroz ” Obtenção e uso de linhagens quase isogênicas de tomateiro (Solanum lycopersicum L . cv Micro-Tom) afetando a composição de carotenoides: uma ferramenta para o estudo da nutraceutica**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2015.
- BINO, Raoul J. *et al.* The light-hyperresponsive high pigment-2dg mutation of tomato: alterations in the fruit metabolome. **New Phytologist**, [S.L.], v. 166, n. 2, p. 427-438, 23 fev. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01362.x>.
- BIRTIC, Simona. *et al.* Changes in Volatiles and Glycosides during Fruit Maturation of Two Contrasted Tomato (Solanum lycopersicum) Lines. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 57, n. 2, p. 591-598, 28 jan. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf8023062>.
- BUTTERY, Ron G.; LING, Louisa C. Volatile Components of Tomato Fruit and Plant Parts. **Acs Symposium Series**, [S.L.], p. 23-34, 6 abr. 1993. American Chemical Society. <http://dx.doi.org/10.1021/bk-1993-0525.ch003>.
- CARVALHO, Jefferson Luiz de.; PAGLIUCA, Larissa Gui.; Tomate, um mercado que não para de crescer globalmente. **Hortifruti Brasil**, Piracicaba, v. 58, p.6-14, 07 jun. 2007. Disponível em <https://www.cepea.esalq.usp.br/hfbrasil/edicoes/58/mat_capa.pdf>. Acesso em: 14 abr. 2019.
- CAZZANIGA, Stefano *et al.* Differential Roles of Carotenes and Xanthophylls in Photosystem I Photoprotection. **Biochemistry**, [S.L.], v. 55, n. 26, p. 3636-3649, 22 jun. 2016. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00425>.
- CUNNINGHAM, F. X.; GANTT, E. GENES AND ENZYMES OF CAROTENOID BIOSYNTHESIS IN PLANTS. **Annual Review of Plant Physiology And Plant Molecular Biology**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 557-583, jun. 1998. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.557>.

EGEA, Isabel. *et al.* Chromoplast Differentiation: current status and perspectives. **Plant And Cell Physiology**, [S.L.], v. 51, n. 10, p. 1601-1611, 27 ago. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcq136>.

GOFF, Stephen A, KLEE, Harry J. Plant Volatile Compounds: sensory cues for health and nutritional value?. **Science**, [S.L.], v. 311, n. 5762, p. 815-819, 10 fev. 2006. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1112614>.

HASKELL, Marjorie J. The challenge to reach nutritional adequacy for vitamin A: β -carotene bioavailability and conversion.:evidence in humans. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, [S.L.], v. 96, n. 5, p. 1193-1203, 10 out. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.3945/ajcn.112.034850>.

ISAACSON, Tal *et al.* Cloning of tangerine from Tomato Reveals a Carotenoid Isomerase Essential for the Production of β -Carotene and Xanthophylls in Plants. **The Plant Cell**, [S.L.], v. 14, n. 2, p. 333-342, fev. 2002. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.010303>.

KLEE, Harry J.; TIEMAN, Denise M. Genetic challenges of flavor improvement in tomato. **Trends In Genetics**, [S.L.], v. 29, n. 4, p. 257-262, abr. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2012.12.003>.

LIU, Lihong *et al.* Regulation of Carotenoid Metabolism in Tomato. **Molecular Plant**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 28-39, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.006>.

MUSTILLI, Anna Chiara *et al.* Phenotype of the Tomato high pigment-2 Mutant Is Caused by a Mutation in the Tomato Homolog of DEETIOLATED1. **The Plant Cell**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 145-157, fev. 1999. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.11.2.145>.

ORSI, Bruna. **Variações alélicas que afetam a carotenogênese em tomateiro alteram o amadurecimento e a suscetibilidade dos frutos ao fungo Botrytis cinerea**. 2018. 89 f. Dissertação (Mestrado) – Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

ORTIZ-SERRANO, Pepa; GIL, José Vicente. Quantitative Comparison of Free and Bound Volatiles of Two Commercial Tomato Cultivars (*Solanum lycopersicum*L.) during Ripening. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 58, n. 2, p. 1106-1114, 27 jan. 2010. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf903366r>.

PARAN, I.; KNAAP, E. Van Der. Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. **Journal Of Experimental Botany**, [S.L.], v. 58, n. 14, p. 3841-3852, 1 nov. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erm257>.

POWELL, Ann L. T. *et al.* Uniform ripening Encodes a Golden 2-like Transcription Factor Regulating Tomato Fruit Chloroplast Development. **Science**, [S.L.], v. 336, n. 6089, p. 1711-1715, 28 jun. 2012. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1222218>.

RAMBLA, José. L. *et al.* The expanded tomato fruit volatile landscape. **Journal of Experimental Botany**, [S.L.], v. 65, n. 16, p. 4613-4623, ago. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/eru128>.

RONEN, G. *et al.* An alternative pathway to beta -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 20, p. 11102–11107, 26 set. 2000.

RUIZ-SOLA, M. Águila; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, Manuel. Carotenoid Biosynthesis in Arabidopsis: a colorful pathway. **The Arabidopsis Book**, [S.L.], v. 10, p. 158-164, jan. 2012. BioOne. <http://dx.doi.org/10.1199/tab.0158>.

SCHMIDT, Holger. *et al.* The Carotenase AtCCD1 from Arabidopsis thaliana Is a Dioxygenase. **Journal of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 281, n. 15, p. 9845-9851, 3 fev. 2006. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m511668200>.

SCHWAB, Wilfried; DAVIDOVICH-RIKANATI, Rachel; LEWINSOHN, Efraim. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. **The Plant Journal**, [S.L.], v. 54, n. 4, p. 712-732, maio 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313x.2008.03446.x>.

SESTARI, Ivan. *et al.* Near-isogenic lines enhancing ascorbic acid, anthocyanin and carotenoid content in tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) as a tool to produce nutrient-rich fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 175, p. 111–120, 15 ago. 2014.

SIMKIN, Andrew J *et al.* The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles beta-ionone, pseudoionone, and geranylacetone. **The Plant Journal** 40, 882–892, 2004.

SMITH, Barry *et al.* Perspective: complexities of flavour. **Nature**, [S.L.], v. 486, n. 7403, p. 6-6, jun. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/486s6a>.

STAHL, Wilhelm; SIES, Helmut. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, n. 6, p. 345– 351, 2003.

STORY, Erica N. *et al.* An Update on the Health Effects of Tomato Lycopene. **Annual Review of Food Science And Technology**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 189-210, abr. 2010. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.food.102308.124120>.

TANAKA, Yoshikasu; SASKI, Nobuhiro; OHMIYA, Akemi. Biosynthesis of plant pigments: antocianins, betalain and carotenoids. **The Plant Journal**. Oxford, v.54, p. 733-749, 2008.

TIEMAN, Denise *et al.* A chemical genetic roadmap to improved tomato flavor. **Science**, [S.L.], v. 355, n. 6323, p. 391-394, 26 jan. 2017. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aal1556>.

TRINDADE, Michelle; MARTUCCI, Renata. Efeitos do licopeno na saúde cardiovascular. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, EURJ, Rio de Janeiro, p.67-73, 10 jul. 2011.

UENOJO, Mariana *et al.* Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, [S.L.], v. 30, n. 3, p. 616-622, jun. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000300022>.

UNLU, Nuray Z. *et al.* Carotenoids absorption in human consuming tomato saucer obtained from tangerine or high-beta-carotene varieties of tomato. **Journal of Agricultural and food chemistry**, Washington, DC, v.55, p.1597-1603, 2007.

YE, X.D. *et al.* engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. **Science**. V.287, n.5451, p.303-305, 2000.

YOO, Hee Ju *et al.* Light-Controlled Fruit Pigmentation and Flavor Volatiles in Tomato and Bell Pepper. **Antioxidants**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 9-14, 23 dez. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox9010014>.