



CHAIANE FERNANDES VAZ

**ANÁLISE TEMPORAL TRANSCRICIONAL DA ROTA
METABÓLICA DE ANTOCIANINAS EM FRUTOS DE
TOMATEIRO EXPOSTOS À LUZ**

**LAVRAS-MG
2021**

CHAIANE FERNANDES VAZ

**ANÁLISE TEMPORAL TRANSCRICIONAL DA ROTA METABÓLICA DE
ANTOCIANINAS EM FRUTOS DE TOMATEIRO EXPOSTOS À LUZ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal para obtenção de título de Doutora.

Prof. Dr. Vagner Augusto Benedito
Orientador

**LAVRAS-MG
2021**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Vaz, Chaiane Fernandes.

Análise temporal transcricional da rota metabólica de
antocianinas em frutos de tomateiro expostos à luz / Chaiane
Fernandes Vaz. - 2021.

73 p. : il.

Orientador(a): Vagner Augusto Benedito.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.
Bibliografia.

1. Alimento de Alta Densidade Nutricional. 2. Tomate. 3.
Micro-Tom. I. Benedito, Vagner Augusto. II. Título.

CHAIANE FERNANDES VAZ

**ANÁLISE TEMPORAL TRANSCRICIONAL DA ROTA METABÓLICA DE
ANTOCIANINAS EM FRUTOS DE TOMATEIRO EXPOSTOS À LUZ**

**TRANSCRIPTIONAL ANALYSIS OF THE ANTHOCYANIN METABOLIC
PATHWAY IN TOMATO FRUIT EXPOSED TO LIGHT**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal para obtenção de título de Doutora.

APROVADA em 27 de agosto de 2021.

Dr. Antonio Chalfun Júnior	UFLA
Dr. Raphael Ricon de Oliveira	UFLA
Dr. Horllys Gomes Barreto	UFT
Dr. Luiz Willian Pacheco Arge	UFP

Prof. Dr. Vagner Augusto Benedito
Orientador

**LAVRAS-MG
2021**

Ao meu filho Derek, que é a luz da minha vida.

DEDICO

“Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você realmente para e encara o medo de frente”.

Eleanor Roosevelt

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me concedido a dádiva de viver, e por guiar meus passos a meio tantas controvérsias da vida me mantendo firme e forte.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente o programa de Pós-Graduação de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de aprimorar minha formação acadêmica e aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, que sempre me apoiaram durante a trajetória para que eu pudesse chegar à etapa final de conclusão.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”.

Ao meu orientador Prof. Vagner Augusto Benedito, por toda orientação, paciência e pelas oportunidades de conhecimento mais vasto e amplo dentro da biotecnologia vegetal. Obrigada pela amizade e pelo seu apoio a tantas adversidades encontradas durante essa trajetória, agradeço imensamente.

Ao professor Antônio Chalfun, pelo apoio constante e por sempre responder com a parte burocrática, quando foi necessário.

Aos meus colegas Gabriel Reis, Renan Terassi e Adolfo Santos, pela execução e apoio em experimentos realizados na *West Virginia University*.

Ao Dr. Luis Willian Pacheco Arge, Pós Doutorando na Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela paciência, pelos ensinamentos, parceria e colaboração nas análises de bioinformática. Muito obrigada por tudo!

À Universidade Federal de Pelotas, ao programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da UFPEL e ao professor Valmor João Bianchi, que me acolheram em Pelotas para execução de alguns experimentos e estudos. Sou imensamente grata por toda atenção e ensinamento.

À colega Elsa Klumb, pelo apoio com a execução de alguns experimentos na Universidade Federal de Pelotas.

Ao meu marido Lucas e meu filho Derek, por serem meus parceiros nessa jornada: vocês me deram força para seguir em frente. À minha mãe Denise, que sempre me apoiou e me aconselhou nos momentos difíceis, nunca mediu esforços para me ajudar no que fosse possível, principalmente na finalização e conclusão da escrita. Ao meu pai Ivan, que sempre

estive do meu lado em cada ida à universidade para conclusão de experimentos e por ter me auxiliado durante a escrita e em toda trajetória.

À minha irmã Larissa que se dispôs por seis meses a me auxiliar nos cuidados com meu filho. Ao meu Irmão Acauã que sempre esteve comigo me dando uma palavra amiga!

Ao meu irmão Théo e meu padrasto Gilnei que sempre estiveram comigo e me deram todo o suporte para a apresentação da tese na plataforma online.

Obrigada a todos!

RESUMO

As antocianinas são compostos fenólicos, derivados da rota dos fenilpropanoides e pertencentes à classe dos flavonoides do metabolismo especializado de plantas. Esses pigmentos são responsáveis pela coloração de frutos, flores e folhas de várias plantas e têm se destacado como um componente alimentar antioxidante benéfico à saúde humana. Em variedades cultivadas de tomateiros (*Solanum lycopersicum*), os níveis de antocianinas nos frutos são praticamente inexistentes, porém algumas espécies de tomateiros selvagens, apresentam o fruto pigmentado (ciânico), e essa característica foi transferida por cruzamentos interespecíficos ao tomateiro cultivado. A combinação de diferentes alelos naturais responsáveis pela biossíntese de antocianina (*Aft* e *atv*), através do melhoramento clássico, levou à seleção de linhagens de tomate com coloração roxa nas células epidérmicas, mas com polpa ainda com baixos níveis de antocianinas. O acúmulo de antocianina nos frutos do tomateiro necessita de luz, porém a cinética desse acúmulo não é semelhante entre eles. No nível molecular, a biossíntese de antocianina é regulada por um controle transcricional coordenado das enzimas estruturais na via biossintética pelo complexo ternário MBW transcricional ativado, que consiste nos fatores de transcrição R2R3-MYB, bHLH e WD40. Mudanças nas condições de luz alteram o nível de expressão desses fatores de transcrição, principalmente do R2R3-MYB, que se ajusta para regular a biossíntese de antocianina. Estudos prévios realizados em nosso laboratório no mutante triplo *Aft/atv/hp2* durante o desenvolvimento de frutos ciânicos, aliados a estudos de luminosidade, indicaram que o acúmulo de antocianina se inicia na epiderme do ovário fecundado logo após a exposição à luz. Esses resultados nos levaram a realizar novos estudos para obter um melhor entendimento do mecanismo regulatório. Diante da importância da luz como ativadora de alguns genes reguladores da antocianina em frutos e vegetais, e com intuito de melhor entender o mecanismo regulatório da biossíntese e acúmulo de antocianinas em frutos de tomateiro, o presente trabalho utilizou RNA-Seq para investigar a regulação mediada pela luz dos genes da via da antocianina na cinética do acúmulo de antocianinas. Neste estudo, verificamos que a falta de pigmentação nas células do mesocarpo está relacionada com a falta de expressão do fator de transcrição *SIANI* que codifica uma proteína bHLH. A pigmentação inicial nas células do epicarpo parece estabelecer um filtro, que prejudica a intensidade e a qualidade da luz, que chega até as células do mesocarpo, impedindo a expressão do fator transcrição *SIANI*, que é regulado pela luz e possivelmente pelo desenvolvimento do fruto.

Palavras-chaves: Alimento de Alta Densidade Nutricional. Tomate. Micro-Tom. RNA-seq.

ABSTRACT

Anthocyanins are phenolic compounds derived from the phenylpropanoids pathway. They belong to the class of flavonoids of the specialized metabolism of plants. These pigments are responsible for the coloring of fruits, flowers, and leaves of various plants and are highlighted as an antioxidant component of the diet that is beneficial to human health. In cultivated varieties of tomato (*Solanum lycopersicum*), the levels of anthocyanins in the fruits are virtually nonexistent, but some species of wild tomatoes develop pigmented (cyanic) fruit. Through interspecific crossings, this trait was previously transferred to the cultivated tomato. The combination of different natural alleles responsible for anthocyanin biosynthesis (AFT and ATV) through classical breeding led to selecting a tomato lineage showing a purple color in epidermal cells of the fruit, but with the pulp (mesocarp) still showing negligible levels of anthocyanins. The accumulation of anthocyanin in the fruits usually requires light, but the kinetics of this accumulation is not well characterized in tomato. At the molecular level, the anthocyanin biosynthesis is regulated by coordinated transcriptional control of the structural enzymes on the biosynthetic via the ternary complex MBW, consisting of R2R3-MYB, bHLH, and WD40 transcript factors. Changes in light conditions alter the expression levels of these transcription factors, especially R2R3-MYB, which is adjusted to regulate anthocyanin biosynthesis. Previous studies carried out in our laboratory with the triple mutant *Aft/atv/hp2* indicated that anthocyanin accumulation begins in the epidermis of the fertilized ovary shortly after exposure to light. These results led us to carry out new studies to get a better understanding of the regulatory mechanism. Given the importance of light to activate some anthocyanin regulatory genes in fruits and vegetables and a better understanding of the regulatory biosynthetic mechanism and accumulation of anthocyanins in tomato fruits, we used RNA-Seq to investigate the kinetics of the light-mediated regulation of the genes of the biosynthesis pathway of anthocyanins. This study demonstrated that the lack of pigmentation in the mesocarp cells is related to the lack of expression of the bHLH transcription factor *SIANI*. The initial pigmentation in epicarp cells seems to establish a filter that impairs the intensity and quality of light reaching the mesocarp cells, thus preventing them from expressing the gene *SIANI*, which is induced by light and possibly by developmental cues.

Keywords: High Nutritional Density Food. Tomato. Micro-Tom. RNA-seq.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Regulação da biossíntese de antocianina	15
2.2	Antocianinas em frutos de tomateiro	17
2.3	Regulação da biossíntese de antocianinas mediada pela luz	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Experimento para testar a influência da luz sobre a ativação da biossíntese de antocianina em frutos de tomateiro MT-<i>Aft/atv/hp2</i>	24
3.2	Extração de RNA, construção de bibliotecas de RNA-seq e sequenciamento	24
3.3	Limpeza, mapeamento e contagem dos <i>reads</i> de sequenciamento	25
3.4	Expressão diferencial e anotação funcional dos genes diferencialmente expressos	25
3.5	Análise estrutural de transcritos de interesse	26
4	RESULTADOS	28
4.1	Análise da influência da luz sobre a ativação da biossíntese de antocianina em frutos de plantas MT-<i>Aft/atv/hp2</i>	28
4.2	Análise transcricional e expressão diferencial de genes em tecidos de frutos de tomateiro	29
4.3	Expressão dos genes reguladores envolvidos com a biossíntese de antocianina em frutos do genótipo <i>Aft/atv/hp2</i>	31
4.4	Via de biossíntese de antocianina e a expressão de seus genes	35
4.5	Expressão gênica dos genes fotorreceptores de luz	37
4.6	Análises de enriquecimento de diferentes classes de anotações funcionais de genes	38
5	DISCUSSÃO	41
5.1	A luz influencia a ativação da biossíntese de antocianina nas células do epicarpo e mesocarpo de frutos de tomateiro MT-<i>Aft/atv/hp2</i>	41
5.2	Fatores de transcrição e genes estruturais são regulados pela luz nas células do mesocarpo, após a inibição da luz no início do desenvolvimento	41
5.3	O acúmulo de antocianina nas células epidérmicas no início do desenvolvimento do fruto interfere na qualidade da luz que chega às células do mesocarpo do fruto de tomateiro MT-<i>Aft/atv/hp2</i>	48

5.4	Análise de enriquecimento permite identificar dois grupos de fatores de transcrição que possivelmente estão envolvidos na regulação da biossíntese de antocianina em frutos de tomate MT- <i>Aft/atv/hp2</i>	50
6	CONCLUSÕES.....	52
	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	53
	REFÊRENCIAS	54
	APÊNDICE A - Dados suplementares.....	66

1 INTRODUÇÃO

Antocianinas são pigmentos fenilpropanóides de ocorrência natural do metabolismo especializado de plantas que se encontram predominantemente nas camadas de células epidérmicas conferindo a pigmentação roxa, vermelha, rosa ou azul de vários tecidos e órgãos vegetais, dependendo da sua estrutura molecular e pH para sua coloração final (HICHRI *et al.*, 2010; ONSLOW, 2014). Tais propriedades influenciam diretamente na sinalização visual dos polinizadores e dispersores de sementes, bem como na proteção a diferentes estresses bióticos e abióticos (BUER *et al.*, 2010; GOULD *et al.*, 2010; SCHAEFER *et al.*, 2004; TANAKA *et al.*, 2008). Além disso, as antocianinas se destacam como um importante componente antioxidante da fração não energética da dieta humana, trazendo diversos benefícios à saúde (BUTELLI *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2017).

A maioria das espécies hortícolas (salvo variedades roxas e vermelhas, na maioria das vezes com pequeno nicho de mercado, salvo a berinjela) acumulam somente pequenas quantidades de antocianina, com um padrão de pigmentação muitas vezes restrito às camadas epidérmicas do fruto (epicarpo), representando no máximo 5% da massa total das partes comestíveis da planta (BUTELLI *et al.*, 2008; SESTARI *et al.*, 2014). Essa baixa porcentagem do teor de antocianina nos frutos e a sua importância na dieta humana representam fortes argumentos para o desenvolvimento de estratégias para produzir versões de espécies importantes enriquecidas com antocianina (BUTELLI *et al.*, 2008; MARTIN *et al.*, 2011).

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais amplamente distribuídas e consumidas mundialmente. Frutos de tomateiro contêm vários compostos antioxidantes como carotenóides (incluindo licopeno), compostos fenólicos (e.g., flavonóides), e vitaminas (por exemplo, C e E), porém apresentam conteúdo subótimo de antocianinas, devido à ativação incompleta da via dos flavonóides (LIN *et al.*, 2014; POVERO *et al.*, 2011). Embora variedades de *S. lycopersicum* normalmente não produzam antocianinas no fruto, algumas espécies selvagens, tais como *S. lycopersicoides*, *S. cheesmaniae* e *S. chilense* produzem frutos verdes que, sob condições de luz adequadas, acumulam pequenas quantidades de antocianina nos tecidos subepidérmicos do fruto (BEDINGER *et al.*, 2011).

A combinação de diferentes alelos selvagens naturais responsáveis pela biossíntese de antocianina (*Anthocianin fruit* e *atrorosea*), por meio de genética clássica, levou à seleção de diversas linhagens de tomate com coloração roxa nas células epidérmicas, embora ainda

com polpa aciânica (BLANDO *et al.*, 2019). Todas as linhagens de tomateiro necessitam de luz para o acúmulo de antocianina no fruto, porém a cinética de acúmulo de luz não é semelhante entre elas. Por exemplo, a introgressão do *locus* dominante *Anthocianin fruit (Aft)* de *S. chilense* em cultivares de tomateiro fornece níveis parciais de acúmulo de antocianinas no pericarpo dos frutos, sendo a síntese fortemente regulada pela luz (MES *et al.*, 2008). O alelo recessivo *atroviolacea (atv)* de *S. cheesmaniae* proporciona o aumento da pigmentação de antocianina principalmente em tecidos vegetativos, mas não no fruto. Quando o *locus Aft* foi combinado com o *atv*, um aumento expressivo no acúmulo de antocianinas foi observado no epicarpo do tomate (MES *et al.*, 2008). O genótipo de tomateiro mutante com três *loci* (*Aft/atv/hp2*) exibe o acúmulo de antocianinas no pericarpo, resultando em frutos roxos escuros, além de altas concentrações de ascorbato e licopeno, sem qualquer perda de rendimento (SESTARI *et al.*, 2014). Nesse genótipo, o acúmulo de antocianinas se inicia logo após a fecundação do ovário e queda das pétalas, quando se inicia a incidência de luz diretamente no fruto em desenvolvimento (SANTOS, 2017).

A luz é um dos fatores ambientais mais importantes nos mecanismos que regulam a síntese de antocianina em frutos de diferentes espécies vegetais (ALBERT *et al.*, 2014). Atualmente os conhecimentos sobre a regulação da biossíntese de antocianina em frutos têm aumentado significativamente por meio da identificação dos principais fatores de transcrição que regulam a expressão de genes estruturais da via em diversas espécies, como maçã, pêra vermelha, uva, mirtilo e berinjela (AZUMA *et al.*, 2012; FENG *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2012; ULEBERG *et al.*, 2012). No nível molecular, a biossíntese de antocianina é regulada por meio do controle transcricional coordenado pelo complexo ternário MBW transcricional ativado, que consiste nos fatores de transcrição R2R3-MYB, bHLH e WD40 (CHAVES-SILVA *et al.*, 2018; HICHRI *et al.*, 2011; JAAKOLA, 2013). Mudanças nas condições de luz alteram o nível de expressão desses fatores de transcrição, principalmente de R2R3-MYB.

Diante da importância da luz como ativadora de alguns genes reguladores da biossíntese de antocianinas em frutos e vegetais, e com intuito de melhor entender os mecanismos de biossíntese de antocianina, este trabalho estende a pesquisa realizada anteriormente pelo nosso laboratório e colaboradores no estudo do genótipo com frutos ciânicos, no qual estudou-se a combinação de variações genéticas naturais introgrididas na cultivar Micro-Tom (MT-*Aft/atv/hp2*) (SESTARI *et al.*, 2014). Estudos comparativos de sequência genética e perfil de expressão em tecidos de fruto revelaram os genes-chaves da rota da biossíntese de antocianina em frutos ciânicos de tomateiro (CHAVES-SILVA, 2015).

Ademais, estudos de expressão gênica via RT-qPCR nos tecidos durante o desenvolvimento de frutos cianicos aliados a estudos de luminosidade nos levaram a avançar no entendimento do seu mecanismo regulatório (SANTOS *et al.*, 2017). Na procura de melhor entender o mecanismo regulatório da biossíntese e acúmulo de antocianinas em frutos de tomateiro, o presente trabalho utilizou dados transcriptômicos gerados por RNA-Seq para investigar a regulação transcricional mediada pela luz sobre os genes da via da antocianina na cinética do acúmulo de antocianina nos tecidos do fruto do tomateiro.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Regulação da biossíntese de antocianina

As antocianinas constituem uma das classes mais importantes de flavonóides e são amplamente encontradas no reino vegetal (LIU *et al.*, 2018). Esses pigmentos conferem cores vivas às flores, frutos, sementes e tecidos vegetais que atraem polinizadores e dispersores de sementes e, além disso, apresentam um papel fundamental no aumento da resistência das plantas a diversos tipos de estresses (TANAKA *et al.*, 2008).

A via de biossíntese de antocianina já está bem elucidada em muitas espécies de plantas superiores, e compreende uma das vias mais bem conservadas (HOLTON; CORNISH, 1995; TANAKA *et al.*, 2008). A antocianina é biossintetizada a partir da via geral dos fenilpropanóides, cujo principal precursor é a fenilalanina, que provém da via do ácido chiquímico (TANAKA *et al.*, 2010). O precursor fenilalanina é convertido em 4-cumaril-Coenzima-A em uma reação catalisada pelas enzimas fenilalanina amônio liase (PAL), cinamato 4-hidroxilase (C4H) e 4-cumarato-CoA ligase (4CL) (TANAKA *et al.*, 2010). Posteriormente, ocorre a condensação da molécula de 4-cumaril-CoA com três moléculas de malonil-CoA, por meio da ação consecutiva de três enzimas diferentes chalcona sintase (CHS), chalcona isomerase (CHI) e flavona 3-hidroxilase (F3H), formando a molécula hidroflavonol dihidrocaempferol (AMARO *et al.*, 2012) (FIGURA 1). Os genes que codificam as enzimas dessa primeira etapa da via são denominados genes biossintéticos iniciais (EBGs).

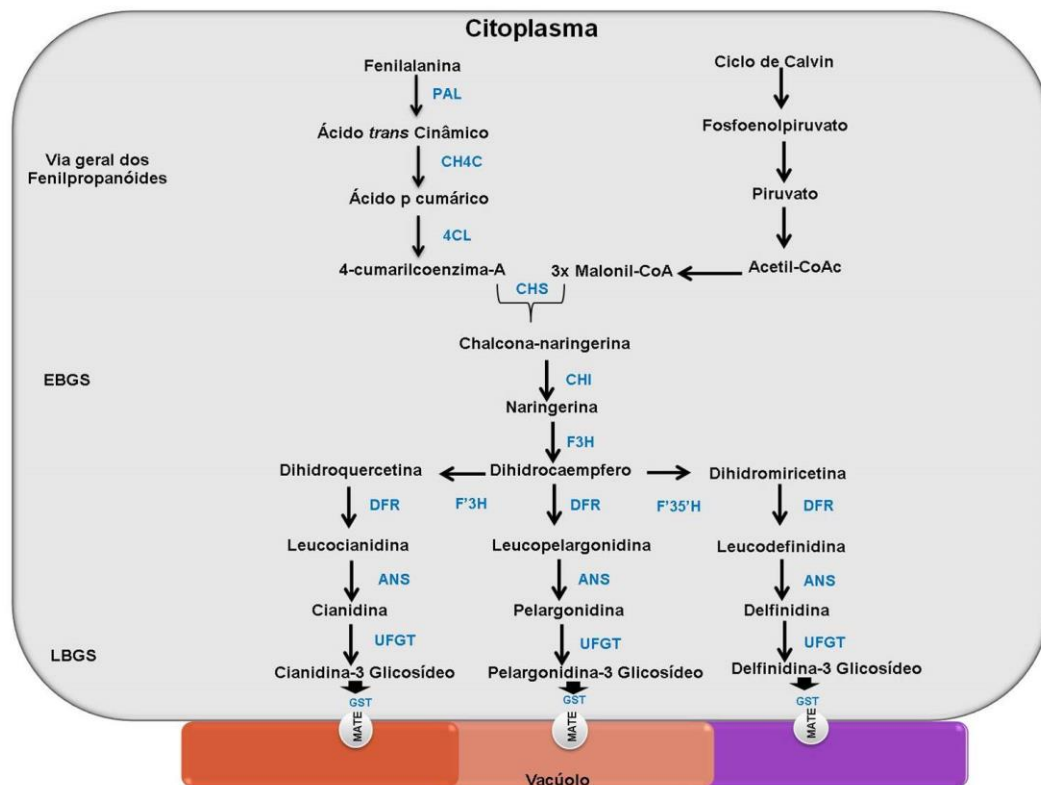
Posteriormente, inicia-se a segunda etapa, em que os genes que codificam tais enzimas são chamados de genes biossintéticos tardios (LBGs). O dihidrocaempferol é hidroxilado, por meio da ação do flavonóide 3'-hidroxilase ou flavonóide 3'-5'-hidroxilase (F3'5'H), para a biossíntese de outros dois dihidroflavonóis, dihidroquercetina e dihidromiricetina. A jusante, os dihidroflavonóis são reduzidos pela dihidroflavonol 4-redutase (DFR) em diferentes leucoantocianidinas, que são então convertidas nas antocianidinas correspondentes (leucocianidina, leucopelargonidina e leucodefinidina) pela ação da leucoantocianidina dioxigenase/antocianina sintase (LDOX/ANS) (SASAKI *et al.*, 2014).

A biossíntese das antocianinas finalmente ocorre pela catálise de radicais glicosil das moléculas de uridina difosfato glicose (UDP-glicose) pela enzima UDP-glicose:antocianina-3-O-glicosiltransferase (UF3GT) para o grupo da hidroxila 3' das antocianidinas. Esse passo de glicosilação produz as primeiras antocianinas estáveis (cianidina, pelargonidina e

delfinidina) e é chave para a solubilidade das moléculas formadas (HE *et al.*, 2010). Além das três antocianinas mencionadas, outras estruturas também são encontradas em plantas, como a peonidina e petunidina (formadas pela metilação no grupo hidroxila 3' da cianidina e delfinidina, respectivamente) e malvidina (pela metilação nos grupos hidroxila 3' e 5' de delfinidina) (HE *et al.*, 2010).

Finalmente ocorre o transporte das antocianinas para o vacúolo, possivelmente por meio da ação da glutatona S- transferase (GST) e/ou um transportador secundário de antocianina, como o MATE (GONZALI *et al.*, 2009).

Figura 1 - Via biossintética da antocianina em plantas superiores.



Abreviações de enzimas: PAL, Fenilalanina amônia-liase; C4H, cinamato-4-hidroxilase; 4CL, 4-coumaroil: CoA-ligase; CHS, chalcona sintase; F3H, flavanona 3-hidroxilase; F3'H, flavonóide 3'-hidroxilase; F3'5'H, flavonóide 3'5'-hidroxilase; ANS, antocianina sintase; UFGT, antocianidina 3-O-glucosiltransferase, GST, glutatona S-transferase.

Fonte: Esquema adaptado de CHAVES-SILVA *et al.* (2018).

A via biossintética das antocianinas é controlada por mecanismos reguladores complexos induzidos por diferentes sinais ambientais e de desenvolvimento (ALBERT *et al.*, 2014; JAAKKOLA *et al.*, 2013). Fatores de transcrição (FT) específicos desempenham um papel importante na regulação da via de síntese de antocianinas, que induzidos ou reprimidos por diferentes sinais ambientais, podem atuar sozinhos ou em complexos multiproteicos

ativando os genes estruturais biossintéticos iniciais (EBGs) ou tardios (LBGs) da via de biossíntese de antocianinas (COLANERO *et al.*, 2018). Alguns fatores de transcrição da família R2R3-MYB modulam a síntese de flavonóides sozinhos ou por meio de uma combinação de fatores de transcrição da família bHLH e WD40 formando o complexo ternário MBW (ALBERT *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2015). No caso das antocianinas, sabe-se que o complexo MBW atua no processo de síntese, sendo um regulador chave no processo ao ativar em particular os genes biossintéticos estruturais tardios da rota. O complexo atua também ativando a expressão de genes reguladores negativos, como proteínas R3-MYB que inibem a síntese de antocianina por meio de um mecanismo de feedback negativo (ALBERT *et al.*, 2014; COLANERO *et al.*, 2018; KOES *et al.*, 2005). Recentemente, várias proteínas do complexo MBW foram caracterizadas em plantas, o que auxilia em uma compreensão cada vez melhor do funcionamento da regulação da biossíntese de antocianina (HICHRI *et al.*, 2011; KOES *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2019).

2.2 Antocianinas em frutos de tomateiro

O tomate (*Solanum lycopersicum L.*) é uma das hortaliças mais amplamente distribuídas e consumidas mundialmente, cuja produção anual gira em torno de 180 milhões de toneladas (STATISTICS DIVISION OF FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAOSTAT, 2020). A presença de antioxidantes em seus frutos como carotenóides (em especial, licopeno), compostos fenólicos (flavonóides), além de vários minerais e vitaminas, promove benefícios à saúde humana. No entanto, um dos pontos relevantes no tomateiro cultivado é a inexistência de antocianinas em seus frutos, devido à ativação incompleta na via dos flavonóides (LIN *et al.*, 2014; POVERO *et al.*, 2011).

Desde os anos 2000, o tomateiro tem sido objeto de intensa pesquisa de engenharia metabólica para obtenção de tomates enriquecidos nutricionalmente, por meio de melhoramento clássico ou biotecnológico. Alguns estudos tentaram obter níveis de antocianina no fruto de tomateiro, super expressando genes estruturais que codificam enzimas da via de diferentes fontes vegetais. No entanto, todos os trabalhos produziram plantas com níveis aumentados de flavonóides na casca do fruto, mas nenhum nível de antocianina foi detectado (MUIR *et al.*, 2001; SCHIJLEN *et al.*, 2006). Embora a superexpressão de EBGs não tenha promovido a síntese de antocianina, o método promoveu um aumento na atividade antioxidante total na casca de tomate. Em conclusão, esses estudos indicaram que a

superexpressão de genes estruturais biossintéticos iniciais (EBGs) não é suficiente para a biossíntese de antocianinas e que fatores de transcrição são necessários para desencadear a expressão dos genes estruturais biossintéticos tardios (LBGs) (SCHIJLEN *et al.*, 2006). Com a superexpressão de fatores de transcrição do tipo MYB, tanto endógenos como o *SIANI*, quanto heterólogos como o AtPAP1 de *Arabidopsis*, foi possível obter o primeiro sucesso parcial de frutos com algumas manchas de pigmentação por antocianinas (MATHEWS *et al.*, 2003; ZULUAGA *et al.*, 2008). A obtenção de tomates totalmente enriquecidos (pericarpo e polpa) ocorreu quando os genes reguladores *Delila* (*Del*; bHLH) e *Roseal* (*Ros1*; R3R2-MYB) de *Antirrhinum majus*, foram superexpressos sob controle do promotor E8 específico de frutos de tomate (BUTTELLI *et al.*, 2008). Posteriormente, uma nova linhagem de tomate foi desenvolvida e chamada de “Índigo”. As plantas de tomate *Del/Ros1* foram cruzadas com uma linhagem de tomate superexpressando o fator de transcrição AtMYB12 de *Arabidopsis thaliana*, conhecido por ativar fortemente os EBGs. O cruzamento, portanto, proporcionou um aumento nos conteúdos de antocianinas em tomates “Índigo” em comparação com as linhagens anteriores (ZHANG *et al.*, 2015).

Outra abordagem com o intuito de aumentar os conteúdos de flavonóides e antocianinas foi desenvolvida no tomate Índigo, por meio da introdução do gene *Stilbene Synthase* de videira (*Vitis vinifera*). Por meio dessa introdução, criou-se uma linhagem de tomate chamada de “Bronze”, que apresenta três classes de polifenóis diferentes (flavonóides, antocianinas e estilbenos) (SCARANO *et al.*, 2018). Essa nova linhagem de tomateiro com alto teor de antocianina e estilbeno atenuou a inflamação intestinal de camundongos (SCARANO *et al.*, 2018).

Várias estratégias biotecnológicas vêm sendo desenvolvidas para obtenção do enriquecimento de antocianinas e outros flavonóides em frutos de tomateiro, e essas estratégias têm sido bastante positivas, como podemos observar nos estudos mencionados acima. No entanto, a abordagem transgênica limita a comercialização de produtos, pois alimentos geneticamente modificados geram preocupação ao público-alvo quanto à segurança alimentar, especialmente no nicho comercial de alimentação saudável (CHAVES-SILVA *et al.*, 2018).

As abordagens de melhoramento convencional têm auxiliado no entendimento da regulação de genes relacionados com a rota da antocianina no tomate. Embora variedades cultivadas não sintetizem antocianinas em seus frutos, algumas espécies de tomateiro selvagem (*S. cheesmaniae*, *S. chilense*, *S. peruvianum*, *S. lycopersicoides*) sintetizam antocianinas na casca de seus frutos verdes quando expostos à luz adequada (BEDINGER *et*

al., 2011). Algumas dessas características foram introduzidas em tomates cultivados por cruzamento interespecífico entres as espécies.

Novas linhagens de tomate foram desenvolvidas apresentando coloração roxa na casca do fruto, como *Anthocyanin fruit (Aft)*, *Aubergine (Abg)* e *atroviolacea (atv)* (GEORGIEV, 1972; RICK *et al.*, 1968, 1994). Essas linhagens vêm sendo utilizadas pelos programas de melhoramento com o intuito de enriquecer ainda mais o conteúdo de antocianina nos frutos do tomateiro. Várias linhagens novas foram desenvolvidas utilizando a combinação entre os alelos *Aft/Aft-atv/atv* e *Abg-atv/atv*. Essas linhagens apresentam uma característica forte de alta pigmentação de antocianina roxa na casca dos frutos (MES *et al.*, 2008; GONZALLI *et al.*, 2009). Uma linhagem mais recente foi desenvolvida por métodos de hibridação introgressiva, chamada de quase isogênica (NIL), ou seja, geneticamente quase idêntica ao parental recorrente, exceto para três locus (*Aft/Atv/hp2*). Tomateiros cv. Micro-Tom do mutante triplo (*Aft/Atv/hp2*) apresentam um fenótipo rico em antocianinas nas células epidérmicas do fruto (SESTARI *et al.*, 2014).

Até pouco tempo não se sabia a identificação correta dos genes responsáveis pelos fenótipos *Aft* e *atv*. Alguns estudos identificaram os genes R2R3-MYB *SIAN2*, *SIANT1*, *SIANT1-like*, e *SIAN2-like*, como possíveis responsáveis pela coordenação do acúmulo de antocianina na epiderme de genótipos de tomate com o locus *Anthocyanin fruit (Aft)* (CAO *et al.*, 2017; KIFERLE *et al.*, 2015; POVERO *et al.*, 2011; QIU *et al.*, 2019; SAPIR *et al.* 2008; SCHREIBER *et al.* 2012). Dentre os fatores de transcrição mencionados, o *SIANT1* e *SIAN2* foram considerados os principais genes responsáveis pelo fenótipo *Aft* (MYERS, 2012; POVERO *et al.*, 2011; SAPIR *et al.*, 2008; SCHREIBER *et al.*, 2012). No entanto, com o sequenciamento do genoma e análise do perfil de expressão de genes, estudos demonstraram a baixa expressão de *SIANT1* e *SIAN2* em casca de frutos de tomates contendo o locus *Aft* (CAO *et al.*, 2017; CHAVES-SILVA, 2015; QIU *et al.*, 2019), desconsiderando assim, a possível relação como um indutor chave da via de biossíntese de antocianina em frutos do tomate.

De acordo com Chaves-Silva (2015), o fator de transcrição *MYB114/SIAN2-like* seria o melhor candidato a compor o complexo ternário MYB-bHLH-WD40 (MBW) responsável pela indução dos genes estruturais da rota de biossíntese de antocianinas, devido a sua alta expressão na casca de frutos de tomate mutante triplo (*Aft/atv/hp2*). Recentemente três trabalhos foram publicados simultaneamente identificando o fator de transcrição responsável pela característica *Aft* que vão de encontro aos achados de Chaves-Silva (2015). Yan *et al.* (2019) mapearam com precisão o locus *Aft* em um intervalo de ~145-kb no cromossomo 10, uma estratégia que lhes permitiu excluir os fatores de transcrição *SIAN2*, *SIANT1* e *SIANT1-*

like, e apontando apenas o *SIAN2-like* como único como candidato. Os autores comprovaram o *SIAN2-like* como responsável pelo acúmulo de antocianina na casca do fruto, por meio do seu silenciamento via CRISPR/Cas9. Colnero *et al.* (2020) também comprovaram *SIAN2-like* como o fator de transcrição responsável pela característica *Aft* por meio de uma abordagem funcional. Nesse estudo, verificou-se que dentre os possíveis candidatos responsáveis pela ativação da biossíntese de antocianinas (*SIAN2*, *SIAN2-like*, *SIANT1* e *SIANT1like*), apenas o *SIAN2-like* não era funcional em frutos de tomateiro domesticado e que em genótipos *Aft*, o *SIAN2-like* era completamente funcional na ativação da via biossintética da antocianina e expresso a um nível muito mais elevado na casca do fruto em comparação com todos os outros fatores de transcrição R2R3-MYB. Por sua vez, Sun *et al.* (2020) identificaram *SIAN2-like* por meio de uma abordagem de sequenciamento de população em massa. Eles destacaram que *SIAN2-like* é capaz de ativar a transcrição de *SIAN1* em tomates InR, codificando a proteína bHLH que faz parte do complexo MBW, e do repressor *SIMYBATV*. Além disso, descobriram que *atv* codifica uma proteína R3-MYB, *SIMYBATV* e que a linhagem InR apresenta uma inserção de 4bp no segundo exon, cujo *frameshift* leva a uma proteína truncada que carece do domínio R3.

De acordo com os últimos trabalhos descritos, vêm sendo significativos os avanços sobre o entendimento da regulação dos genes responsáveis pela ativação da pigmentação por antocianina na casca dos frutos de tomateiro. E tais abordagens podem vir a auxiliar na obtenção de tomates enriquecidos com antocianina por meio do melhoramento convencional.

2.3 Regulação da biossíntese de antocianinas mediada pela luz

A biossíntese de antocianina é uma via regulada pelo desenvolvimento da planta e modulada por um conjunto de fatores ambientais (GUO *et al.*, 2008; JAAKOLA *et al.*, 2013). A luz é um dos principais fatores ambientais que afetam a biossíntese de antocianina em tecidos e órgãos das plantas (ALBERT *et al.*, 2009).

As plantas apresentam classes específicas de fotorreceptores que recebem sinais de luz e coordenam sua resposta ao estímulo luminoso (WAGNER *et al.*, 2005). Além das clorofilas e carotenóides em complexos de captação de luz que participam da fotossíntese, plantas superiores utilizam vários fotorreceptores sensoriais para perceber com precisão as condições de luz que variam de UV-B a comprimentos de ondas vermelhos distantes (MOGLICH *et al.*, 2010, RIZZINI *et al.*, 2011). Dentre os fotorreceptores envolvidos na regulação da fotomorfogênese (ritmo circadiano e biossíntese de metabólitos secundários), encontram-se os

fitocromos (PHYs) (receptores de luz vermelha / vermelha distante), criptocromos (CRYs), fototropinas (PHOTs) (receptores de luz UV-A / azul) e UVR8 (fotorreceptores de UV-B) (FAVORY *et al.*, 2009; RIZZINI *et al.*, 2011, CASAL, 2013). A ativação de fotorreceptores induzida pela luz promove várias cascatas de transdução de sinais que levam à supressão de COP1 e à expressão de genes relacionados com respostas fisiológicas induzidas por luz (LAU; DENG, 2012; STRACKE *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2008) (FIGURA 2).

O efeito positivo da luz na elevação do teor de antocianinas tem sido relatado em muitas espécies de frutas, como mirtilo (ULEBERG *et al.*, 2012), *Myrica rubra* (NIU *et al.*, 2010), framboesa (*Rubus idaeus*) (WANG *et al.*, 2009), oxicoco (cranberry: *Vaccinium macrocarpon*) (ZHOU; SINGH, 2004), berinjela (*Solanum melongena*) (LI *et al.*, 2018) e maçã (*Malus domestica*) (MERZLYAK *et al.*, 2008). Além da intensidade da luz e do fotoperíodo, a qualidade específica da luz também afeta a biossíntese, especialmente no espectro do azul e UV (LI *et al.*, 2013; UBI *et al.*, 2006).

Alguns estudos de ensacamento e sombreamento de frutas demonstraram a importância da luz na biossíntese e no acúmulo de antocianina. A exclusão da luz solar nas frutas em desenvolvimento, em muitos casos, restringe a expressão de genes da via das antocianinas. Por exemplo, em epicarpo de lichia (*Litchi chinensis*), tratamentos de ensacamento inibem o acúmulo de antocianina pela repressão de genes biossintéticos de antocianina. Tal repressão transcricional pode ser imediatamente suprimida após a exposição dos frutos à luz solar, levando ao acúmulo de antocianinas (WEI *et al.*, 2011).

Frutos de maçã de polpa vermelha 'Genebra' e 'Pérola Rosa' ensacados acumularam aproximadamente 70% do conteúdo total de antocianina encontrado nos frutos das mesmas cultivares expostas à luz solar (HONDA *et al.*, 2017). A radiação solar não é o único fator para o acúmulo de antocianina em algumas espécies de maçãs, mas é fundamental para maximizar o acúmulo de antocianina.

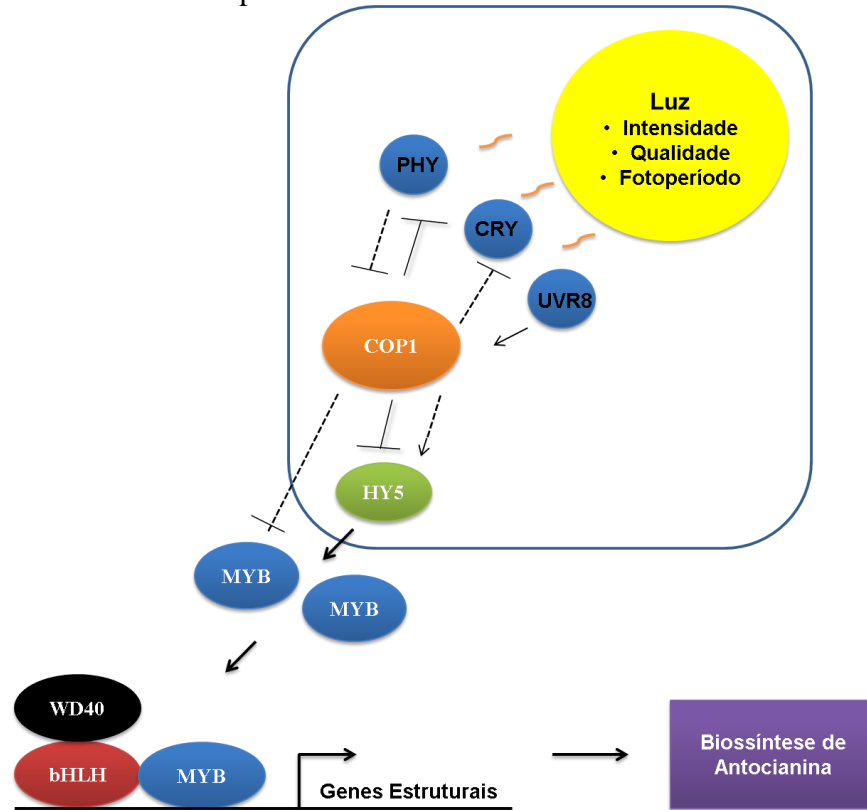
Todas as linhagens de tomateiro que acumulam antocianina em seus frutos são genótipos associados a uma sensibilidade diferencial à luz. A linhagem de tomate com características fenotípicas *atv* e *hp* foi associada a maior sensibilidade à luz vermelha/vermelha distante, sugerindo o envolvimento de uma percepção via fitocromo e a classificação da linhagem como um mutante fotomorfogênico (KENDRICK *et al.*, 1997). Estudos prévios de luminosidade realizados em tomateiro mutante triplo (*Aft/atv/hp2*) demonstraram que o acúmulo de antocianina na casca do fruto é dependente da luz, e que o acúmulo do pigmento ocorre logo após a fecundação do ovário e queda das pétalas (SANTOS, 2017).

A biossíntese de antocianinas em berinjela (cv. 'Lanshan Hexian'), apresenta um padrão de acúmulo de antocianina semelhante aos frutos de tomateiro e é fortemente regulada pela luz, com a cor do fruto tornando-se evidente no máximo 2 dias após a exposição à luz. Estudos do perfil transcritômico de genes relacionados com biossíntese de antocianina em berinjela identificaram 102 fatores de transcrição que exibiram mudanças altamente dinâmicas em resposta à luz (LI *et al.*, 2018). Os fotorreceptores UV8 (UVR8), criptocromo 3 (CRY3) e UVR3 foram identificados como DEGS (genes diferencialmente expressos) e os elementos de transdução de sinal de luz, CONSTITUTIVA FOTOMORFOGÊNICO 1 (COP1) e dois SPAs, foram identificados como possíveis responsáveis pela regulação da biossíntese de antocianinas (LI *et al.*, 2018).

Alguns estudos têm relatado o mecanismo pelo qual a luz regula a biossíntese de antocianina em frutos. Em frutos de macieira, o fator de transcrição MdMYB1/MdMYBA que regula a síntese de antocianina positivamente é controlado pela luz e degradado no escuro (LI *et al.*, 2012). Foi demonstrado que o fator de transcrição MdMYB1 interage diretamente com MdCOP1, o que atua como interruptor molecular ao ser induzido pela luz. De uma maneira geral, a ubiquitina E3 ligase CONSTITUTIVA FOTOMORFOGÊNICO 1 (COP1) atua a jusante dos receptores de luz e medeia a degradação de vários fatores de transcrição que promovem a fotomorfogênese pelo sistema ubiquitina-proteassoma (LI *et al.*, 2012). No escuro, COP1 encontra-se no núcleo, onde interage com o fator de transcrição ELONGATED HYPOCOTYL5 (HY5) e medeia a sua ubiquitinação e degradação por meio da via proteassoma 26S (LAU *et al.*, 2012). HY5 é um fator de transcrição bZIP que promove o acúmulo de antocianina pela indução da expressão de genes biossintéticos sob luz visível e UV-B (AN *et al.*, 2017; HOLM *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2018). Um estudo em casca de maçãs sugere que a radiação UV-B induz o acúmulo de antocianina via sinalização mediada por MdCOP1 e ligação MdHY5 nas regiões promotoras dos genes MYBs (PENG *et al.*, 2013).

Estudos recentes em linhagens de tomate roxo 'Indigo Rose' demonstraram que HY5 tem um papel central no acúmulo de antocianina e define o mecanismo de ação da luz. O knockout de *SlHY5* em tomate 'Indigo Rose' através do sistema CRISPR/CAS9 reprimiu o acúmulo de antocianina na casca dos frutos voltadas para luz, bem como a expressão dos genes estruturais da via responsáveis pela síntese de antocianina (QIU *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2019). Ademais, o fator de transcrição HY5 ativa o fator de transcrição R2R3MYB *SIAN2-like*, o que regula positivamente a síntese de antocianina (SUN *et al.*, 2019).

Figura 2 - Esquema geral do controle da regulação biossintética de antocianina em frutos mediado pela luz.



Receptores de luz interagem suprimindo a expressão de ubiquitina E3 ligase CONSTITUTIVA FOTOMORGOGÊNICO1 (COP1), e ativando a expressão de ELONGATED HYPOCOTYL5 (HY5) que induz a expressão de fatores MYB, auxiliando da formação do complexo MBW que promovem a expressão de genes estruturais da síntese de antocianina.

Fonte: Adaptado de JAAKOLA *et al.* (2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimento para testar a influência da luz sobre a ativação da biossíntese de antocianina em frutos de tomateiro MT-*Aft/atv/hp2*

As plantas de tomateiros mutantes (MT-*Aft/atv/hp2*: SESTARI *et al.*, 2014) foram cultivadas em casa de vegetação sob fotoperíodo de 16h, radiação 650-700 W/m², temperatura de 21±2°C e umidade relativa de 50% por um período de dois meses. Para determinação da cinética de acúmulo de antocianinas na epiderme do fruto sob influência direta da luz, as flores do tomateiro (MT-*Aft/atv/hp2*) foram cobertas com papel alumínio quando estavam completamente abertas (imediatamente antes da antese) e a cobertura foi deixada por 30 dias. Posteriormente, os frutos foram coletados em diferentes tempos: imediatamente, 2 e 5 dias após a retirada do papel alumínio. Para o tratamento não coberto, as flores em antese foram marcadas e os frutos foram coletados 30 dias após a marcação. Os frutos coletados foram dissecados em pele e polpa (i.e., epicarpo e mesocarpo). Material de três plantas foram coletados e reunidos para representar uma réplica biológica. Três repetições biológicas foram utilizadas nas análises. Todo o material vegetal foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido após a coleta e armazenado em freezer a -80°C até a extração do RNA.

3.2 Extração de RNA, construção de bibliotecas de RNA-Seq e sequenciamento

Para extração de RNA total foi utilizado o kit mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion, ThermoFisher) seguindo protocolo do fabricante para extração de RNA total. A integridade do RNA foi visualizada em gel de agarose 1%, e a quantidade e pureza das amostras (proporções 260/280 e 260/230 entre 1,8 e 2,2) foram medidas em espectrofotômetro Nanodrop.

A síntese da biblioteca e sequenciamento Illumina foram realizados na Novogene Bioinformatics Technology (Sacramento, CA). Vinte e quatro bibliotecas indexadas de RNA foram sintetizadas e executadas na plataforma Illumina Novaseq 6000 (150-bp Paired-Ends) com obtenção >20 milhões de fragmentos de leituras (*reads*) por amostra.

3.3 Limpeza, mapeamento e contagem dos *reads* de sequenciamento

As bibliotecas obtidas do sequenciamento foram submetidas à análise de qualidade das leituras no software FastQC version 0.11.5 (ANDREWS, 2010). A etapa de limpeza das bibliotecas é de suma importância para obtenção de resultados robustos, pois remove artefatos indesejáveis de sequenciamento, os quais quando presentes podem gerar falsos positivos. A remoção de bases de baixa qualidade e adaptadores foi realizada no software Trimmomatic ver. 0.39 (BOLGER *et al.*, 2014), com os seguintes parâmetros: ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10:2:keepBothReads para remover os adaptadores e manter ambas as leituras do sequenciamento pareadas; LEADING:3 e TRAILING:3 para remoção de bases de baixa qualidade, inferior a três, no início e final da leitura, respectivamente; e MINLEN:36 para manter leituras com tamanho superior a 36.

Os arquivos provenientes da limpeza das sequências foram então submetidos a mapeamento sobre o genoma de *Solanum lycopersicum* ver. 4.0 juntamente com a anotação ver. 4.1 obtidos da base de dados SolGenomics (FERNANDEZ-POZO *et al.*, 2015) pelo software STAR ver. 2.7.5.c. Posteriormente, os arquivos de mapeamento de cada conjunto de bibliotecas pareadas foram submetidos à contagem de leituras alinhadas sobre os genes de tomateiro com o software featureCounts ver. 1.6.5 (LIAO *et al.*, 2014). A contagem bruta das leituras sobre os genes foi usada para a expressão diferencial e para a obtenção dos valores de expressão normalizados em TPM (Transcripts per Million).

3.4 Expressão diferencial e anotação funcional dos genes diferencialmente expressos

Genes com valores de baixa expressão (MAX TPM <1) foram ignorados na análise de expressão diferencial. A identificação de genes diferencialmente expressos foi conduzida sob o ambiente R ver. 4.0.5 (R CORE TEAM, 2021) de programação, com o pacote DESeq2 ver. 1.32.0 (LOVE *et al.*, 2014) a partir do repositório Bioconductor (GENTLEMAN *et al.*, 2004). As três bibliotecas para cada condição (n = tempo de coleta) foram usadas para a análise de expressão diferencial, sendo comparados cada tratamento contra o controle (fruto desenvolvido sob luz) do mesmo tecido, entre dias no mesmo tecido de maneira a comparar n-1, e os tratamentos controle de ambos tecidos foram comparados. Genes com valor de *p*-ajustado significativo (<0.05) foram considerados como genes diferencialmente expressos (DEGs).

A relação entre os perfis de expressão diferencial foi conduzida e representada em forma de diagramas de Venn, heatmaps e dendrogramas. O pacote `ggplot2` ver. 3.3.2 (WICKHAM, 2016) foi utilizado para a construção de gráficos de barras e o pacote `ComplexHeatmap` ver. 2.9.0 (GU *et al.*, 2016) para a construção de heatmap.

Com o objetivo de melhor descrever a funcionalidade dos genes, as anotações funcionais foram recuperadas a partir de diferentes bases de dados. A função gênica foi obtida a partir da anotação ver. 4.2 de tomateiro da base de dados SolGenomics. As informações de fatores de transcrição foram obtidas a partir da base de dados PlantTFDB ver. 5.0 (JIN *et al.*, 2016). Devido a não disponibilidade de vias metabólicas anotadas especificamente para tomate na base de dados SolGenomics, conduziu-se a anotação dos genes de tomateiro codificantes de enzimas, e sua associação com vias metabólicas, sendo tal anotação conduzida na base de dados KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) com a ferramenta GhostKOALA ver. 2.2 (KANEHISA; SATO; MORISHIMA, 2016). Para alta cobertura de anotação gênica com termos GO (Gene Ontology) conduziu-se a anotação com o pipeline GOMAP ver. 1.3.4 (WIMALANATHAN; LAWRENCE, 2021). Após a obtenção das tabelas de anotação funcional dos genes de tomateiro, a função *match* entre identificadores de genes no R foi usada para compilar as informações funcionais para as tabelas de expressão diferencial.

A análise de enriquecimento tem sido amplamente aplicada em conjunto de dados transcritômicos para a identificação de fatores funcionais sobre-representados, ou seja, tem por objetivo identificar estatisticamente as principais anotações gênicas associadas ao fenótipo observado. Nesse estudo, empregou-se a análise de enriquecimento para identificar termos sobre-representados tangendo vias metabólicas, fatores de transcrição e termos GO. A análise de enriquecimento foi conduzida para os perfis de expressão diferencial separados em genes com transcrição ativada ou reprimida, sendo vias metabólicas e fatores de transcrição consideradas como enriquecidas por $p < 0.05$, e termos GO com $FDR < 0.001$. Os gráficos de bolhas foram construídos com o pacote `ggplot2` no ambiente R.

3.5 Análise estrutural de transcritos de interesse

A reconstrução de transcritos a partir dos dados oriundos de sequenciamento foi realizada para analisar a estrutura nucleotídica do gene MYB-ATV em comparação com sequências dos mesmos genes estudados por Sun *et al.* (2020). Os transcritos foram reconstruídos com o software Trinity ver. 2.13.0 (GRABHERR *et al.*, 2011). A identificação

dos transcritos reconstruídos codificantes de MYB-ATV foi realizada mediante alinhamento local com a ferramenta Blast ver. 2.8.1+ (ALTSCHUL *et al.*, 1990). Posteriormente, realizou-se alinhamento global para as sequencias de MYB-ATV de Indigo Rose (InR), Micro-Tom, Heinz e transcrito reconstruído com o software ClustalX ver. 2.1 (LARKIN *et al.*, 2007). Para verificar as fases abertas de leitura [ORFs (*Open Read Frames*)] utilizou-se a webtool ORFFinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) com o parâmetro “ORF start codon to use: Any sense codon”, e demais parâmetros como padrão.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da influência da luz sobre a ativação da biossíntese de antocianina em frutos de plantas MT-*Aft/atv/hp2*

Durante o estudo da cinética do acúmulo de antocianina em frutos de tomate mutante triplo (MT-*Aft/atv/hp2*), as flores foram cobertas com papel alumínio imediatamente antes da antese floral, para bloquear a incidência da luz no início do desenvolvimento do fruto, o que inibiu a ativação da biossíntese de antocianina. Os frutos, ao serem descobertos aos 30 dias após antese, apresentaram-se despigmentados (FIGURA 3B). Frutos expostos à luz por dois dias após a inibição da luz apresentaram indícios visíveis de pigmentação roxa não intensa em algumas regiões do epicarpo (FIGURA 3C). No entanto, a exposição à luz por um período de cinco dias já proporcionou um aumento expressivo da pigmentação roxa de forma mais intensa em toda área do epicarpo do fruto (FIGURA 3D).

Figura 3 - Frutos de tomateiro mutante triplo (MT-*Aft/atv/hp2*).



Frutos sob condições de luz desde o início do seu desenvolvimento (A). Frutos descobertos aos 30 dias após antese (B). Frutos descobertos aos 30 dias após antese e expostos à luz por dois dias (C). Frutos descobertos aos 30 dias após antes e expostos à luz por cinco dias (D).

Fonte: Da autora (2021).

Curiosamente, em contraste com frutos expostos à luz continuamente, nos frutos expostos à luz após 30 dias da antese, o acúmulo de pigmentação roxa não ficou restrito apenas às células do epicarpo no tratamento exposto à luz durante cinco dias. As células do mesocarpo foram altamente pigmentadas com uma coloração roxa intensa (FIGURA 4D; 4H). A fim de explorar os mecanismos moleculares relacionados com regulação da via da biossíntese de antocianina para esse genótipo específico, foram realizadas análises de RNA-Seq dos tecidos de fruto (epicarpo e mesocarpo).

Figura 4 - Frutos de tomateiro do mutante triplo (MT-*Aft/atv/hp2*).



Frutos sob condições de luz desde o início do seu desenvolvimento (A); (E). Frutos descobertos aos 30 dias após antese (B); (F). Frutos descobertos aos 30 dias após antese e expostos à luz por dois dias (C); (G). Frutos descobertos aos 30 dias após antese e expostos à luz por cinco dias (D); (H). Escala: 5mm.

Fonte: Da autora (2021).

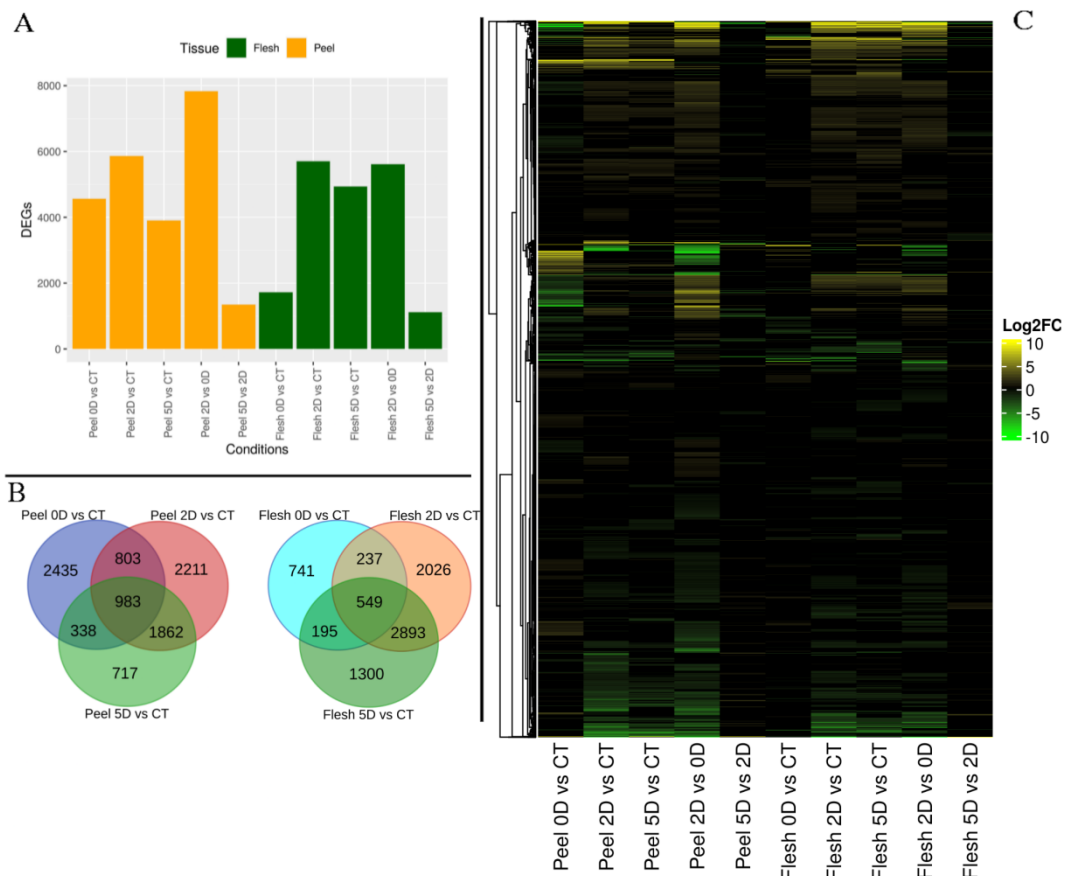
4.2 Análise transcricional e expressão diferencial de genes em tecidos de frutos de tomateiro

No intuito de analisar os mecanismos moleculares relacionados com a biossíntese e acúmulo de antocianinas nos frutos do genótipo de tomate MT-*Aft/atv/hp2*, o total de amostra em nosso estudo foi de 24 bibliotecas: dois tecidos do fruto (epicarpo e mesocarpo), três tempos de exposição à luz depois de 30 dias de desenvolvimento no escuro (zero, dois e cinco dias) e controle não coberto (NC), cada condição foi conduzida em triplicata biológica. O sequenciamento de mRNA das 24 bibliotecas produziu o total de 585,6 milhões de leituras (sequências), sendo 568,8 milhões de leituras consideradas de boa qualidade ($Q > 20$), média de 23,7 milhões de leituras por biblioteca. As bibliotecas com leituras limpas foram mapeadas sob o genoma do tomateiro versão 4.0 com a anotação versão 4.1, etapa a qual obteve-se média de 22,2 milhões (93,94%) de leituras mapeadas apenas uma vez sobre o genoma (TABELA S1).

Genes diferencialmente expressos (DEGs) foram identificados comparando cada condição de tratamento contra o controle, entre os tratamentos (dois dias *versus* zero dia e cinco dias *versus* dois dias), ambos dentro dos mesmos tecidos. Além dessas comparações, se identificou DEGs entre epicarpo e mesocarpo (TABELA S2). Para as comparações contra controle, em epicarpo identificaram-se 4.559 DEGs para zero dia *versus* imediatamente exposto, 5.859 para dois dias *versus* zero dia de exposição à luz e 3.900 para cinco dias *versus* 2 dias. Em mesocarpo, identificaram-se 1.722, 5.705 e 4.937 DEGs, respectivamente. A

comparação de controles de ambos os tecidos revelou 5.818 DEGs. Devido a esse experimento ser uma série temporal, a comparação foi conduzida entre os dias, a qual revelou 7.827 DEGs para dois dias *versus* zero dia, 1.347 para cinco dias *versus* dois dias em epicarpo, e 5.616 DEGs para dois dias *versus* zero dia, 1.111 para cinco dias *versus* dois dias em mesocarpo. A Tabela S2 apresenta os perfis de expressão diferencial em números de acordo com a regulação dos genes (*up* e *down-regulated genes*), e a Tabela Suplementar 2 apresenta o número de DEGs por intervalos de log₂FC (logaritmo 2 de razão de diferença). A Figura 5 representa as comparações entre os diferentes perfis de expressão diferencial. Adicionalmente, identificaram-se 983 DEGs em comum em epicarpo, e 549 para mesocarpo, ambos os tecidos quando comparados ao controle. Tais genes em comum podem conter genes chaves que regulam a acumulação de antocianina em epicarpo e em mesocarpo.

Figura 5 - Genes diferencialmente expressos (DEGs) identificados para as comparações dentro do mesmo tecido e entre tecidos.



(A) Número de DEGs total para as diferentes comparações, (B) diagramas de Venn para comparação dos diferentes perfis de expressão diferencial, e (C) heatmap dos perfis de expressão diferencial. Nota: nas legendas de tecidos o D representa dias, CT controle, e log₂FC logaritmo na base dois para a razão de diferença entre as condições comparadas. Legenda: Peel (epicarpo); Flesh (mesocarpo).

Fonte: Da autora (2021).

4.3 Expressão dos genes reguladores envolvidos com a biossíntese de antocianina em frutos do genótipo *Aft/atv/hp2*

O genótipo mutante triplo deste estudo apresenta um padrão de pigmentação dependente da luz, como podemos observar na análise visual de seu fenótipo. Assim, com o objetivo de entender a regulação dos genes durante a cinética do acúmulo de antocianina mediada pela luz, analisamos a expressão de 16 fatores de transcrição já relatados em outros genótipos de tomate como reguladores da biossíntese de antocianina em frutos de tomate, incluindo dois genes da família bHLH, um bZIP, um DET, oito MYBs, três MYB-related, e um WDR (CAO *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2018). Nesse conjunto de genes de interesse, 12 genes apresentaram expressão em todas as condições, em ambos tecidos, e expressão diferencial em pelo menos um perfil de comparação, contra o controle ou entre dias. Desses, os dois genes que apresentaram maior médias de expressão foram: *SIAN2-like* (Solyc10g086290: 9,49 TPM) e *SIAN11* (Solyc03g097340: 7,56 TPM). Os genes que não se expressaram ou apresentaram baixo valor médio de expressão (TPM < 1) foram: *SIANT1* (Solyc10g086260), *SIANT1-like* (Solyc10g086270), *SIAN2* (Solyc10g086250) e *SITRY* (Solyc01g095640) com médias de 0, 0,05, 0,60 e 0,43 TPM, respectivamente (FIGURA 6 e TABELA S3).

Nas células do epicarpo os genes *SIANI*, *SIMYBATV* e *SIAN11* foram levemente regulados positivamente após a exposição à luz por 2 e 5 dias quando comparados ao tratamento controle (exposição contínua à luz) (FIGURA 6 e TABELA S3). Nas condições de ausência de luz ou baixa iluminação (0 dias de exposição à luz), os genes *SIANI*, *SIAN11*, *SIAN2-Like*, *SIMYBATV*, *SIMYBATV-like* e *MYBL2* foram regulados negativamente em células do epicarpo quando comparados ao tratamento controle (exposição contínua à luz). Esses resultados reforçam que a luz regula genes chaves da rota biossíntese de antocianina nas células do epicarpo de frutos do tomate e que a luz é capaz de ativar esses genes desde o início do seu desenvolvimento.

Nas células do mesocarpo, observamos que cinco genes foram fortemente induzidos (*SIANI*, *SIMYBATV*, *SIMYBATV-LIKE*, *SIMYBL2* e *SITTG2*) após exposição à luz por dois e cinco dias em relação ao tratamento controle (exposição contínua à luz) (FIGURA 6 e TABELA S3). Os genes *SIAN2-like* e *SIAN11* nas células do mesocarpo foram levemente induzidos (FIGURA 6 e TABELA S3). Os genes *SIAN2-Like* e *SIAN11* apresentam TPM >1 em todos os tempos analisados e tratamento controle, enquanto os demais genes apresentam TPM <1 apenas no tratamento zero dias de exposição à luz (epicarpo e mesocarpo) e

tratamento controle (mesocarpo). Esses resultados indicam que as expressões de *SIAN2-like* e *SIAN11* não são reguladas diretamente pela luz e que, ao contrário, as expressões dos genes *SIAN1*, *SIMYBATV*, *SIMYBATV-LIKE* e *SIMYBL2* são reguladas pela luz nas células do epicarpo e mesocarpo.

Genes repressores com motivos R3 e R2R3-MYBs estão envolvidos na regulação da antocianina (ALBERT *et al.*, 2014; MATSUI *et al.*, 2008; NEMIE-FEYISSA *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2009). E como mencionado anteriormente, os genes repressores R3MYB *SIMYBATV*, *SIMYBATV-like* e R2R3MYB *SIMYBL2* putativos em tomateiro foram regulados pela luz e apresentam um padrão de expressão semelhante nas células do mesocarpo ao longo da exposição à luz quando comparado ao tratamento controle (exposição contínua à luz).

O gene R3MYB *SIMYBATV*, localizado no cromossomo 7, é o candidato no *locus atv* de regular negativamente a biossíntese de antocianina em frutos de tomateiro (CAO *et al.*, 2017; COLNERO *et al.*, 2018). Recentemente um estudo no genótipo “Indigo Rose” (InR), que apresenta pigmentação roxa na casca do fruto, identificou que o gene R3MYB *SIMYBATV* tem uma inserção de 4 bp no segundo exon (FIGURA S2 e S3), o que leva a formação de uma proteína truncada sem o domínio R3. Com o intuito de verificar se o nosso genótipo MT- *Aft/atv/hp2* contém algum alelo de perda de função de *SIMYBATV*, os transcritos deste estudo foram reconstruímos e isolamos o transcrito relacionado ao gene *SIMYBATV* (MT- *Aft/atv/hp2*) e comparados com a cultivar Heinz (genoma de referência) e da variedade original, InR (FIGURA S2). Nós descobrimos que o alelo de *SIMYBATV* (MT- *Aft/atv/hp2*) também apresenta uma inserção de 4 pb no segundo exon, o que leva a uma proteína truncada que carece do domínio R3.

O gene *SIHY5*, apresentou valor médio de expressão TPM >1 em todos os tempos analisados, e foi levemente regulado positivamente no epicarpo 0 dia de exposição à luz e no mesocarpo nos tratamentos de 0 e 2 dias exposição à luz.

O gene *SIDET1*, que é subjacente ao locus *hp2*, não apresentou expressão diferencial em nenhum dos perfis de expressão, apesar de ser expresso (TPM > 1).

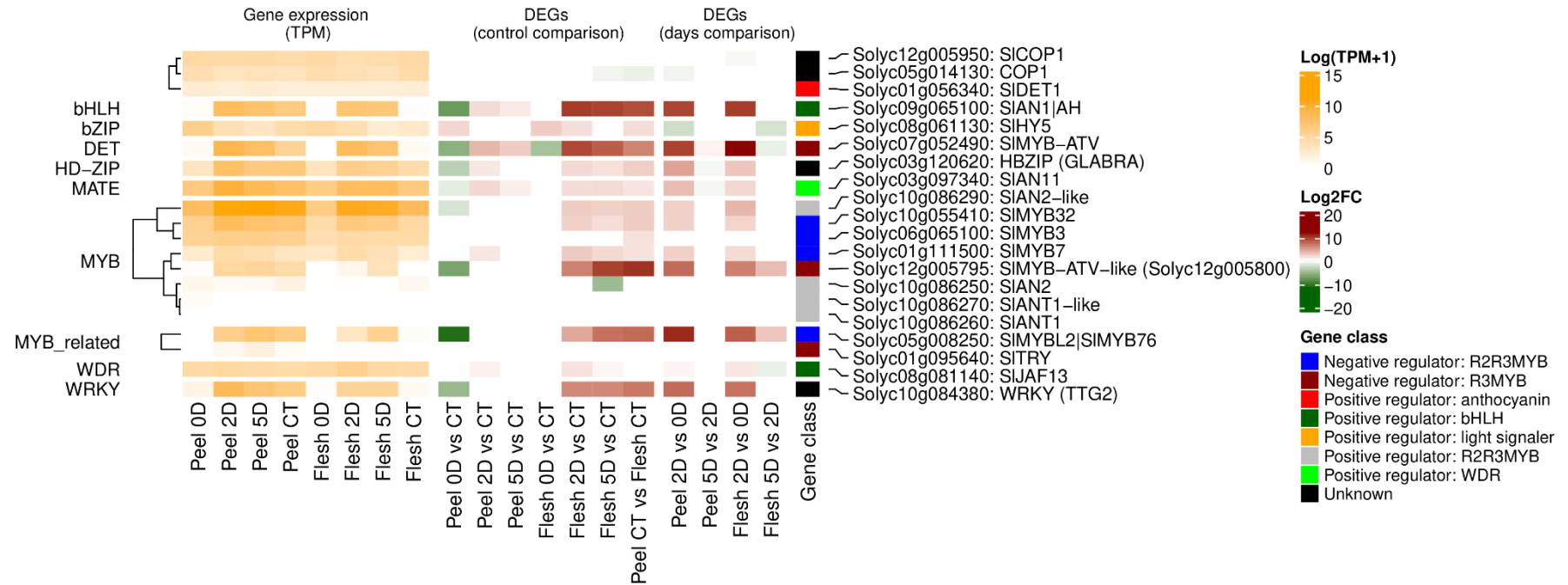
Analisamos dois fatores de transcrição candidatos na regulação da síntese de antocianina de maneira independente de HY5, Solyc10g084380, Solyc03g120620, que codificam fatores de transcrição WRKY e HD-ZIP, respectivamente (QIU *et al.*, 2016). Os dois genes foram regulados positivamente nas células do epicarpo controle em comparação às células do mesocarpo controle.

A média de expressão do gene Solyc10g084380 (TTG2) nas células do epicarpo expostos à luz foram semelhantes no tratamento controle (exposição imediata à luz) e os

tratamentos 2 e 5 dias (6,15, 8,28 e 7,09, respectivamente), enquanto no tratamento 0 dia de exposição à luz, a média foi menor (1,21). Nas células do mesocarpo o gene Solyc10g084380 (TTG2) apresentou TPM <1 (0,28 e 0,64, respectivamente) nos tratamentos de 0 exposição à luz e controle (exposição contínua à luz), enquanto nos tratamentos de 2 e 5 dias de exposição à luz apresentaram TPM >1 (5,10 e 5,18, respectivamente) (FIGURA 6 e TABELA S3). Nas células do mesocarpo, Solyc10g084380 (TTG2) foi induzido pela luz por 2 e 5 dias com relação ao controle.

Solyc03g120620 foi regulado positivamente nas células do epicarpo controle (exposição contínua à luz) em relação às células do mesocarpo tratamento controle (exposição contínua à luz). Nas células do epicarpo foi regulado positivamente nos tratamentos de 2 e 5 dias com relação ao tratamento controle.

Figura 6 - Expressão [$\log(\text{TPM}+1)$] e expressão diferencial ($\log_2\text{FC}$) de genes reportados pela literatura como reguladores da via de biossíntese de antocianina em tecidos de fruto de tomateiro.



Legenda: Peel (epicarpo); Flesh (mesocarpo).

Fonte: Da autora (2021).

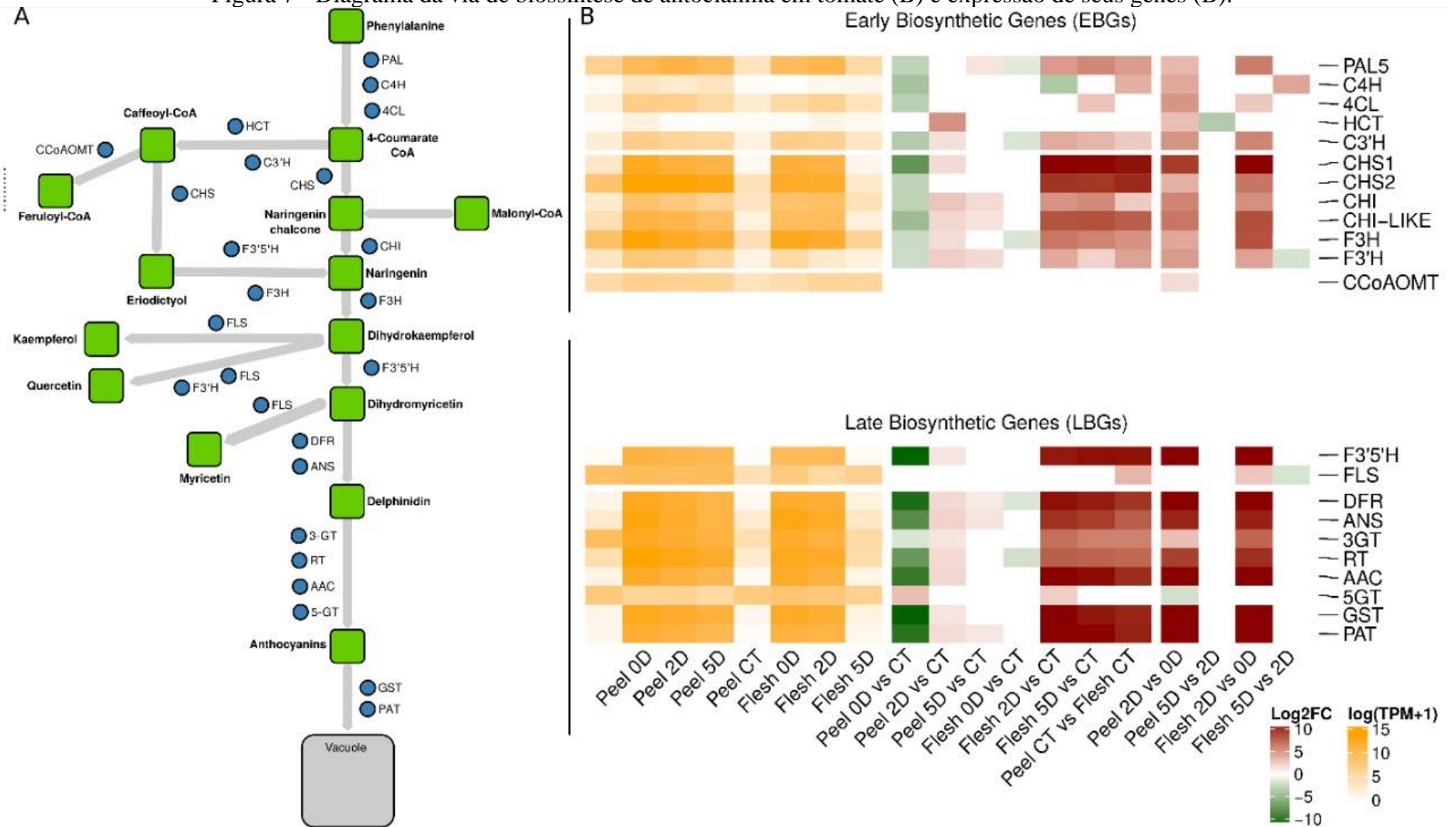
4.4 Via de biossíntese de antocianina e a expressão de seus genes

Com objetivo de melhor compreender como ocorre a regulação da via das antocianinas em ambos os tecidos (epicarpo e mesocarpo) do fruto do tomate mutante triplo MT-*Aft/atv/hp2* com relação aos diferentes tempos de exposição à luz (0, 2 e 5 dias), a expressão dos genes que codificam para as enzimas da via biossintética de antocianina foi analisada. As antocianinas são sintetizadas a partir da via geral dos fenilpropanóides (TANAKA *et al.*, 2010). Genes que codificam as enzimas são divididos em dois grupos: Genes biossintéticos inicial e tardios (MARTIN; GERATS, 1993; QUATTROCCHIO *et al.*, 2006). Enquanto os EBGs estão envolvidos na síntese de precursores e produtos finais de diferentes classes de flavonóides, como chalconas, diidroflavonóis e flavonóis, os LBGs são mais específicos para um número restrito de grupos, incluindo antocianinas (FIGURA 7A; 7B).

O padrão de expressão diferencial dos genes estruturais da via da biossíntese de antocianina está consistente com os fenótipos de ganho de pigmentação do fruto e com as análises de expressão dos genes reguladores. Assim, como visto na análise de expressão dos genes reguladores, os genes estruturais nas células do epicarpo do fruto nos tratamentos de dois e cinco dias de exposição à luz, não sofreram mudanças significativas em seus níveis de expressão em relação ao tratamento controle (exposição contínua à luz). Mas é evidente que a luz influencia diretamente na expressão dos genes estruturais nas células do epicarpo do fruto do tomate, pois no tratamento de zero dias de exposição à luz todos os genes estruturais foram regulados negativamente (FIGURA 7B).

Nas células do mesocarpo tratamento controle (exposição contínua à luz) e o tratamento de zero dia de exposição à luz, os genes estruturais, tanto os biossintéticos iniciais quanto os biossintéticos tardios, apresentaram TPM <1. No entanto, os genes estruturais das células do mesocarpo apresentaram TPM >1 nos tratamentos de dois e cinco dias de exposição à luz. Os genes estruturais biossintéticos iniciais PAL, CHS, CHS2, CHI, CHI-Like, F3H e os biossintéticos tardios F3'5'H, DFR, ANS, 3GT, RT, AAC, GST e PAT foram altamente induzidos nos tratamentos de dois e cinco dias de exposição à luz quando comparado ao controle (exposição contínua à luz) (FIGURA 7B).

Figura 7 - Diagrama da via de biossíntese de antocianina em tomate (A) e expressão de seus genes (B).



Legenda: Peel (epicarpo); Flesh(mesocarpo).
 Fonte: Adaptado de Povero *et al.* (2011).

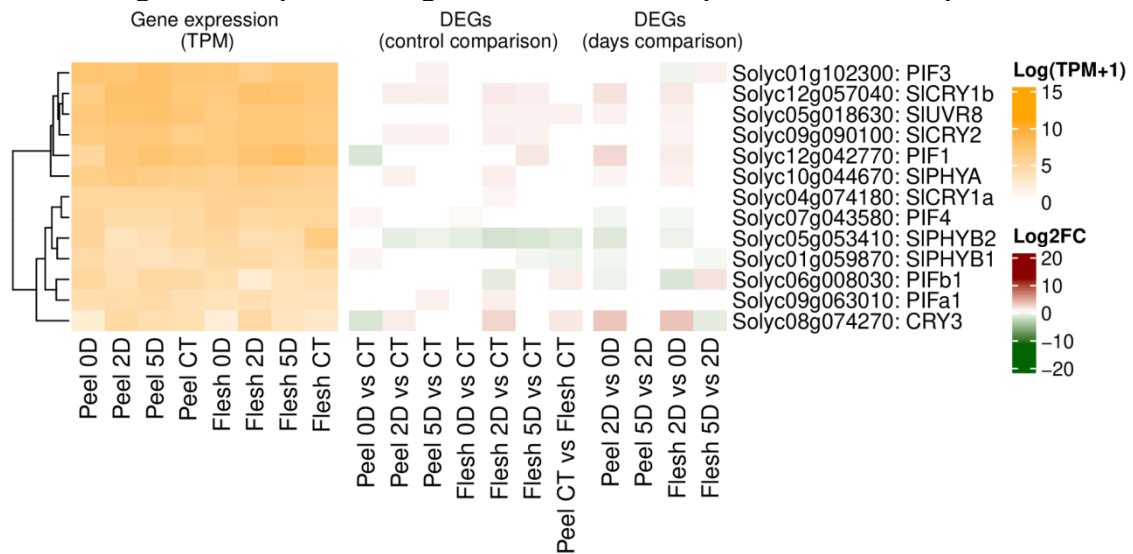
4.5 Expressão gênica dos genes fotorreceptores de luz

Com intuito de verificar se a ausência de antocianina nas células do mesocarpo do fruto do genótipo MT- *Aft/atv/hp2*, está relacionado com o sombreamento das células do mesocarpo, analisamos a diferença de níveis de transcrição dos genes fotorreceptores de luz como os fitocromos sensores de luz vermelha e vermelho distante (SIPHYA, SIPHYB1 e SIPHYB2), os genes de criptocromos de percepção da luz azul/ultravioleta (CRYs) SICRY1a, SICRY1b, SICRY2 e SICRY3), e o gene fotorreceptor de UV-B (SIUVR8) (CHAVES *et al.*, 2011; CHRISTIE, 2007; JENKINS, 2014).

Os 13 genes analisados apresentaram TPM<1 em todas as condições (FIGURA 8 e TABELA S5). Desses, apenas 5 apresentaram diferenças de expressão entre as células do epicarpo controle e mesocarpo controle (exposição contínua à luz). O gene fotorreceptor de UV-B (SIUVR8) foi regulado positivamente nas células do epicarpo (FIGURA 8). Entre os genes CRY, apenas o CRY3 foi induzido nas células do epicarpo controle. Já os fitocromos sensores de luz vermelha/vermelha distante (PHY), apenas PHYB1 e PHYB2 apresentaram diferença de expressão entre os tratamentos epicarpo e mesocarpo controles (exposição contínua à luz), sendo reprimidos nas células do epicarpo com relação ao mesocarpo (FIGURA 8).

Com relação ao tempo de coleta nas células do epicarpo e mesocarpo, os criptocromos CRY1b e CRY2 foram induzidos aos dois e cinco dias em ambos os tecidos com relação ao controle. Enquanto CRY1a e CRY3 foram induzidos no mesocarpo e epicarpo aos dois dias de coleta. Já o fotorreceptor de UV-B (SIUVR8) foi reprimido apenas no mesocarpo aos dois e cinco dias com relação ao controle (FIGURA 8). Dentre os fitocromos analisados, apenas o PHYA foi ativado no epicarpo e mesocarpo aos dois dias de exposição à luz. Por sua vez, o PHYB2 foi reprimido no epicarpo e mesocarpo aos 2 e 5 dias de exposição à luz.

Figura 8 - Expressão de genes codificantes de proteínas fotorreceptoras.



Legenda: Peel (epicarpo); Flesh (mesocarpo).

Fonte: Da autora (2021).

4.6 Análises de enriquecimento de diferentes classes de anotações funcionais de genes

Apesar de ser possível associar a alteração de um fenótipo a poucos genes, tais genes podem não representar todas as alterações observadas. Devido a isso, a análise de enriquecimento de diferentes classes de anotação funcional gênica pode revelar importantes alterações transcricionais associadas ao fenótipo. Assim, neste estudo conduzimos análises de enriquecimento das seguintes classes de anotação: vias metabólicas, fatores de transcrição e termos GO.

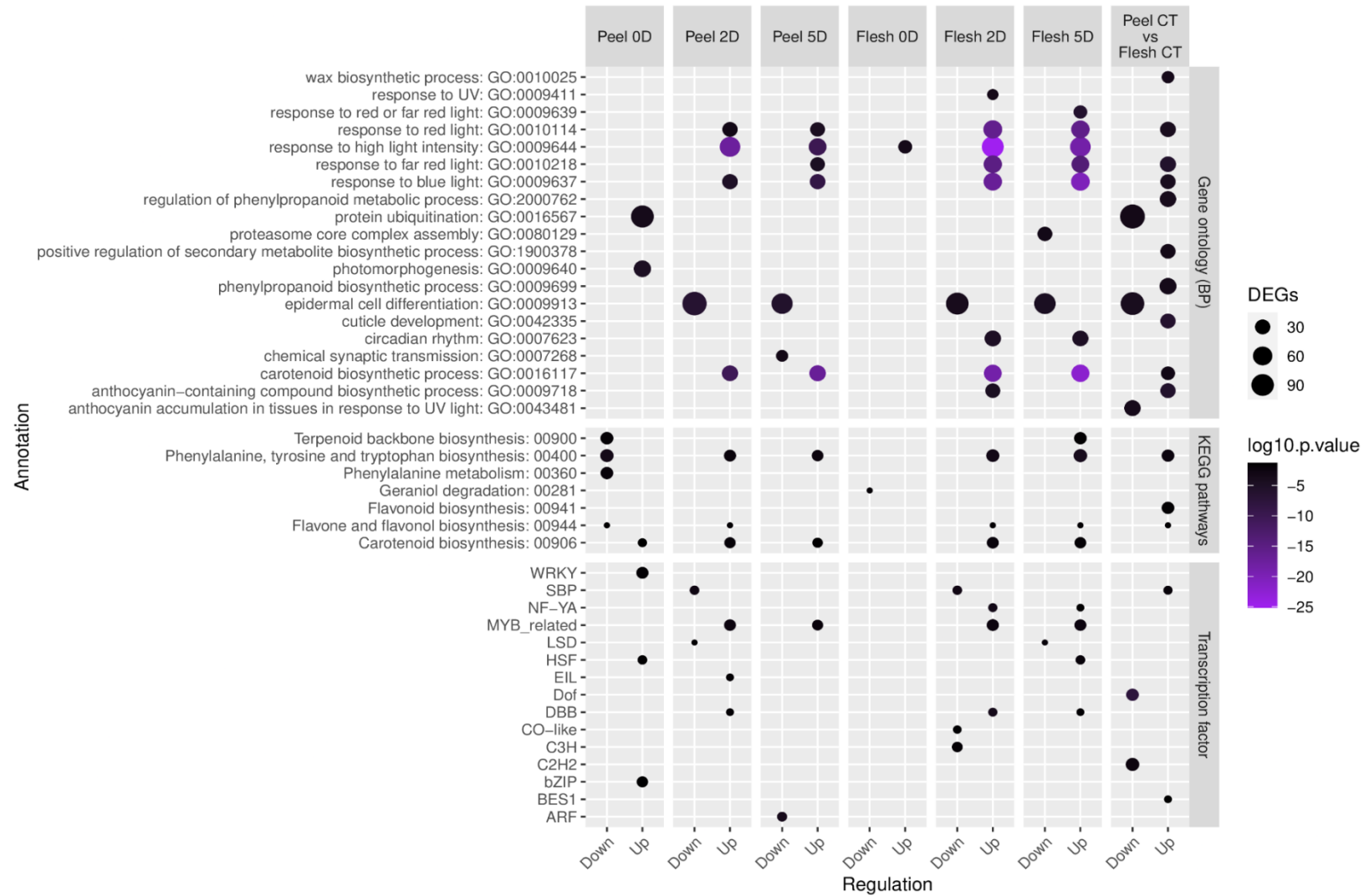
No que tange às vias metabólicas, identificamos um total de 75 vias enriquecidas com diferentes perfis de expressão diferencial de epicarpo e mesocarpo. Destas vias, encontramos enriquecimento para vias do metabolismo primário, como: Glycolysis / Gluconeogenesis (map00010), Fatty acid biosynthesis and degradation (map00061 e map00071, respectivamente), Carbon metabolism (map01200), Biosynthesis of amino acids (map01230), entre outras (FIGURA S4). Também encontramos vias enriquecidas que atuam direta ou indiretamente na biossíntese de antocianinas (FIGURA 9): Carotenoid biosynthesis (map00906), Flavone and flavonol biosynthesis (map00944), Flavonoid biosynthesis (map00941), Geraniol degradation (map00281), Phenylalanine metabolism (map00360), Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis (map00400) e Terpenoid backbone biosynthesis (map00900).

A classe gênica de fatores de transcrição (FT) desempenha importante papel na regulação da expressão gênica. Para essa classe, 12 famílias enriquecidas entre epicarpo e mesocarpo foram identificadas nos diferentes perfis de expressão diferencial (FIGURA 9). Dentre essas, algumas foram identificadas como enriquecidas em ambos os tecidos (mesocarpo e epicarpo), e em comum aos diferentes tempos de coleta. A família de fator de transcrição MYB-related foi enriquecida nos tempos de coleta de dois e cinco dias (comparação contra o controle) em ambos os tecidos. DBB foi enriquecida em dois dias para ambos os tecidos, e aos cinco dias no mesocarpo. A família SBP foi enriquecida no epicarpo e mesocarpo aos dois dias de coleta. Adicionalmente, a família NF-YA foi enriquecida no mesocarpo aos dois e cinco dias.

A anotação funcional de termos GO tem como um dos objetivos descrever e compreender melhor a função do produto gênico. Nesse contexto, identificamos termos GO enriquecidos em comum a ambos os tecidos epicarpo e mesocarpo em um ou mais pontos de coleta do fruto exposto à luz UV. Diversos termos GO relacionados a respostas à luz foram identificados, sendo os processos biológicos envolvidos na fotossíntese ou em processos do cloroplasto os que apresentaram maior número (17 termos GO). Entretanto, outros processos biológicos envolvidos com resposta à luz foram identificados como em comum aos diferentes perfis de expressão diferencial, como: carotenoid biosynthetic process (GO:0016117), chorismate biosynthetic process (GO:0009423), response to blue light (GO:0009637), response to red light (GO:0010114), enriquecidos em epicarpo e mesocarpo, ambos nos dias dois e cinco de exposição à luz quando comparado ao controle. O termo de response to far red light (GO:0010218) apresenta-se enriquecido no epicarpo no dia cinco de coleta e no mesocarpo nos dias dois e cinco. Response to high light intensity (GO:0009644) não está enriquecido apenas em epicarpo um dia de coleta, e response to UV-B (GO:0010224) está enriquecido em epicarpo aos dois dias, e em mesocarpo aos dois e cinco dias de coleta dos frutos expostos à luz (comparação ao controle).

Adicionalmente, nós identificamos o termo GO anthocyanin-containing compound biosynthetic process (GO:0009718) enriquecido exclusivamente em mesocarpo com dois dias de exposição à luz, ponto o qual observamos acúmulo inicial de antocianina nos frutos de tomate.

Figura 9 - Fatores de transcrição enriquecidos nos conjuntos de genes up e down regulados para os perfis de expressão diferencial.



Legenda: Peel (epicarpo); Flesh (mesocarpo).

Fonte: Da autora (2021).

5 DISCUSSÃO

5.1 A luz influencia a ativação da biossíntese de antocianina nas células do epicarpo e mesocarpo de frutos de tomateiro MT-*Aft/atv/hp2*

A biossíntese de antocianina em muitas espécies vegetais é influenciada por fatores ambientais, dentre eles a luz, tem sido um importante sinal para ativação da pigmentação em diversos órgãos vegetais (MENG *et al.*, 2004). Em alguns órgãos vegetais, a cinética do acúmulo de antocianina segue três padrões distintos: 1) induzido pela luz durante o desenvolvimento do órgão; 2) induzido pela luz durante a maturação do órgão e 3) não influenciado diretamente pela luz (JAAKOLA *et al.*, 2013; ZHENG *et al.*, 2013). Em nosso estudo, observamos que a cinética do acúmulo de antocianina é determinada pela luz durante o desenvolvimento do fruto em genótipo mutante triplo MT-*(Aft/atv/hp2)*, comprovamos por meio de análise visual que o acúmulo ocorre assim que exposto à luz. Tais resultados indicam que, para o genótipo em estudo, a luz é crucial para ativação do processo de biossíntese de antocianina nas células do pericarpo do fruto.

O genótipo MT-*(Aft/atv/hp2)*, assim como a grande maioria das espécies hortícolas economicamente importantes, apresentam pigmentação restrita às células subepidérmicas do fruto (BUTELLI *et al.*, 2008; SESTARI *et al.*, 2014). Entretanto, no presente estudo, obtivemos frutos do genótipo variante natural triplo MT-*(Aft/atv/hp2)*, com pigmentação visível nas células do mesocarpo, após a inibição da luz durante o seu desenvolvimento (30 dias após antese) e posteriormente exposto à luz por no mínimo, 5 dias (FIGURA 4D; 4H). Até o momento, nenhum outro estudo relatando pigmentação nas células do mesocarpo de genótipos de tomate induzidos naturalmente foi encontrado. Assim, nosso trabalho destaca-se como o pioneiro no processo de caracterização transcricional dos genes envolvidos na ativação da via de biossíntese de antocianinas no mesocarpo.

5.2 Fatores de transcrição e genes estruturais são regulados pela luz nas células do mesocarpo, após a inibição da luz no início do desenvolvimento

Diversos e complexos mecanismos de regulação gênica são induzidos por estímulos de desenvolvimento e fatores ambientais, podendo ativar ou reprimir a via biossintética das antocianinas (ALBERT *et al.*, 2014). Alguns fatores de transcrição respondem a estímulos ambientais como a luz e, em seguida, regulam a expressão de genes estruturais da via de

biossíntese das antocianinas (JUN *et al.*, 2015; MAHMOOD *et al.*, 2016; QIU *et al.*, 2016). Os genes reguladores de antocianina candidatos do complexo MBW foram identificados, incluindo reguladores MYB positivos e negativos (CAO *et al.*, 2017; KIFERLE *et al.*, 2015). Para melhor compreensão dos genes reguladores candidatos ao complexo MBW, envolvidos na biossíntese de antocianina no tomate mutante triplo MT-(*Aft/atv/hp2*) durante o desenvolvimento do fruto mediado pela luz, a expressão de 16 fatores de transcrição foi analisada, sendo dois genes da família bHLH, um bZIP, um DET, oito MYBs, três MYB-related, e um WDR, os quais foram previamente caracterizados como reguladores da biossíntese de antocianinas em tomateiro (CAO *et al.*, 2017; QIU *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2019).

HY5 é uma proteína bZIP que atua como um regulador central no acúmulo de antocianina ao induzir a expressão de genes biossintéticos de antocianina sob luz visível e UV-B (AN *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2018). Estudos em frutos de tomateiro ‘Indigo Rose’ comprovaram o papel central de *SIHY5* na transdução de sinal para ativação da biossíntese de antocianina (QIU *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2019). Neste estudo, constatamos que o nível de expressão de *SIHY5* foi induzido nas células do epicarpo imediatamente após exposição à luz em relação ao controle (exposição contínua à luz). Nas células do mesocarpo, o mesmo padrão de expressão diferencial de *SIHY5* foi observado para o tratamento zero e dois dias de exposição à luz, enquanto com cinco dias de exposição à luz o nível de expressão de *SIHY5* se torna similar aos níveis do tratamento controle (exposição contínua à luz). Tais resultados sugerem que o *SIHY5* seja regulado imediatamente à exposição à luz e que, possivelmente, o tempo de coleta pode ter interferido nessa diferença de expressão na exposição à luz (dia 0, logo após a retirada). Além disso, o alto nível de expressão em pouco tempo de exposição à luz precede o acúmulo de antocianina nas células do epicarpo e mesocarpo.

Em um estudo de perfil transcricional de genes biossintéticos da via da antocianina induzidos pela luz em frutos de berinjela (*Solanum melongena*), foi demonstrado que o nível de expressão de *SIHY5* pode ser regulado positivamente a partir de 0,5 hora após exposição à luz (LI *et al.*, 2018). Ademais, estudos em frutos de tomateiro ‘Indigo Rose’ relatam que a baixa intensidade de luz também pode ativar a expressão de *SIHY5* (QIU *et al.*, 2019). De fato, mesmo que nossa coleta tenha sido feita em um ambiente de pouca luminosidade, é possível que tenha interferido no nível de expressão de *SIHY5* nos frutos de tomateiro mutante triplo (*Aft/atv/hp2*), uma vez que se trata de um genótipo hipersensível à luz.

O aumento do nível de expressão de *SIHY5* nos primeiros dias de exposição à luz, está relacionado com transição do escuro para a luz, e com cinco dias de exposição à luz os níveis

de expressão se igualam ao controle (exposição contínua à luz), uma vez que um aumento na expressão de *SIHY5* precede um aumento da expressão dos genes que ele regula (QIU *et al.*, 2019). Sob condições de luz, os fotorreceptores atuam como promotores centrais para substituir a ubiquitinação e a degradação dos reguladores positivos da via de biossíntese de antocianina causada por COP1, como HY5 (SAIJO *et al.*, 2003). Apesar de *SIHY5* ser regulado positivamente nas primeiras horas de exposição à luz, COP1, não sofreu mudanças em seu nível de expressão em relação ao controle nos tratamentos mesocarpo zero e dois dias de exposição à luz, e foi regulado negativamente apenas no tratamento mesocarpo cinco dias de exposição à luz com relação ao tratamento controle (exposição contínua à luz). Nossos resultados mostram que a regulação negativa de COP1 no mesocarpo após cinco dias de exposição à luz pode estar relacionado com o acúmulo de antocianina quando há exposição gradual da luz após a formação do órgão.

Em análise comparativa na diferença de expressão dos genes *SIHY5* e *SICOP1* nas células do epicarpo e mesocarpo ambos para o tratamento controle (exposição contínua à luz), *SIHY5* é regulado positivamente e COP1 regulado negativamente nas células do epicarpo em comparação com as células do mesocarpo. Esse resultado indica a possibilidade de existência de o sombreamento nas células do mesocarpo, devido a pigmentação inicial nas células do epicarpo logo após a antese da flor, causando uma repressão no acúmulo de antocianina no mesocarpo. Sob condições de luz, os fotorreceptores são ativados e inibem a atividade de COP1, causando um acúmulo dos fatores de transcrição que promovem a fotomorfogênese, como por exemplo HY5 (HONG *et al.*, 2008).

HY5 interage diretamente com o promotor dos genes estruturais e fatores de transcrição MYBs relacionados com a via da biossíntese de antocianina, se destacando como um regulador no acúmulo de antocianina em muitas plantas (LEE *et al.*, 2007; SHIN *et al.*, 2013). Esses fatores de transcrição, por sua vez, regulam mais precisamente outros fatores de transcrição e genes estruturais que controlam o acúmulo de antocianina (LEE *et al.*, 2007; SHIN *et al.*, 2013). Em tomateiro, quatro genes estão relatados como reguladores da biossíntese de antocianina [*SIANT1* (Solyc10g086260), *SIANT1-like* (Solyc10g086270), *SIAN2* (Solyc10g086250) e *SIAN2-like* (Solyc10g086290)] pertencentes a família de fatores de transcrição MYB, caracterizados pela repetição R2R3 e estando localizados no cromossomo 10 do tomate (SUN *et al.*, 2019). Em nosso estudo, com exceção de *SIAN2* e *SIAN2-like*, os demais genes não apresentaram expressão diferencial em nenhuma das condições experimentais. Os genes *SIANT1* (*MYB113*) e *SIAN2* (*SIMYB75*), até pouco tempo,

eram tidos como possíveis candidatos responsáveis pelo fenótipo roxo de tomates que contém o loci *Aft* (POVERO *et al.*, 2011; SAPIR *et al.*, 2008; SCHREIBER *et al.*, 2012).

Entretanto, com o sequenciamento do genoma e uma nova análise detalhada dos primers usados para a análise transcricional descrita no trabalho de Povero *et al.* (2011), observou-se que os primers não eram específicos para amplificação do ANT1. De acordo com Chaves (2015), os oligonucleotídeos também se anelam ao cDNA dos homólogos geneticamente ligados *SIAN2/SIMYB75* (Solyc10g086250), *SIANT1-like/SIMYB28* (Solyc10g086270) e MYB114 (Solyc10g086290). Além disso, nos estudos de expressão (RT-qPCR) realizados por Chaves (2015), definiu-se que o fator de *SIAN2-like/MYB114* (Solyc10g086290) é expresso na epiderme do tomate roxo do mutante triplo (*Aft/atv/hp2*), enquanto o *SIANT1/MYB113* (Solyc10g086260) não apresenta nenhuma expressão, indicando assim que o *SIAN2-like/MYB114* seria o melhor candidato a compor o complexo ternário MYB-bHLH-WD40 (MBW) responsável pela indução dos genes estruturais da rota de biossíntese das antocianinas. Nossos resultados mostram claramente que o gene *SIANT1* e *SIANT1-like* não têm nenhum envolvimento na síntese de antocianina em fruto de tomateiro MT-*Aft/atv/hp2*, uma vez que não são expressos em nenhuma das condições analisadas.

Recentemente, novos estudos comprovaram que *Aft* codifica uma proteína R2R3-MYB, *SIAN2-like* e foi identificado como um regulador mestre na síntese de antocianina nas células do epicarpo do genótipo de tomate com loci *Anthocyanin fruit (Aft)* (CHAVES, 2015; SUN *et al.*, 2019). Em nosso estudo, o gene *SIAN2-like* (Solyc10g086290: 9,49 TPM) apresentou a maior média de expressão em todas as condições analisadas, o que corrobora com a sua identidade no locus *Aft*.

SIHY5 desempenha um papel crítico na transmissão do sinal de luz na síntese de antocianina, através da regulação positiva da expressão do gene *SIAN2-like* em frutos de tomateiro (QIU *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2019). Em nossa análise, verificamos que a expressão do gene *SIAN2-like* é regulada, pela expressão do gene *SIHY5* uma vez que sua expressão está presente mesmo em condições de baixa luminosidade. Nas células do epicarpo não houve expressão diferencial do *SIAN2-like* comparado ao controle (exposição contínua à luz), apenas verificamos uma leve repressão do gene nas células do pericarpo após exposição imediata à luz (dia 0 de coleta). Nas células do mesocarpo, após a fase de desenvolvimento “turning” observamos que o estímulo luminoso regula positivamente a expressão do gene *SIAN2-like* nos primeiros dias de exposição a luz (2 e 5 dias) com relação ao controle (mesocarpo exposição contínua à luz).

De fato, o gene *SIAN2-like* foi identificado por desempenhar um papel importante na transmissão do sinal da luz para o complexo MBW em frutos de tomateiro “Indigo rose” (SUN *et al.*, 2019). Porém, de acordo com nossas análises no mutante triplo *MT-Aft/atv/hp2*, o *SIAN2-like* não parece ser o único.

Estudos em tomate têm mostrado que a expressão do gene do regulador positivo que codifica a proteína bHLH *SIANI* desempenha um papel importante na biossíntese de antocianina (BASSOLINO *et al.*, 2013). Uma análise de RNA-seq em tecidos (epicarpo e mesocarpo) de frutos de tomateiro “Indigo Rose”, descreve que *SIANI* apresenta níveis muito baixos de expressão nas células do mesocarpo aciânicos e é fortemente expresso nas células do epicarpo ciânicos (LIU *et al.*, 2020). Além disso, a superexpressão do *SIANI* em tomate aumentou significativamente o acúmulo de antocianina nas folhas e na casca de frutos (BASSOLINO *et al.*, 2013; BOVY *et al.*, 2002; BUTELLI *et al.*, 2008; QIU *et al.*, 2016).

Neste estudo, verificamos que *SIANI* desenvolve um papel importante como um regulador positivo para ativação da pigmentação por antocianina, não apenas nas células do epicarpo, mas principalmente nas células do mesocarpo do genótipo mutante triplo *MT-Aft/atv/hp2*, e que este é nitidamente regulado pela luz. Observamos também que a expressão do *SIANI* foi baixa (TPM: 0,41) nas células do epicarpo logo após à exposição à luz (dia 0), enquanto que nas condições controle (exposição contínua à luz), dois e cinco dias de exposição à luz, a média de expressão foi mais elevada (TPM: 6,28; 7,98 e 7,27, respectivamente).

Ao analisar a expressão do *SIANI* nas células do mesocarpo, verificamos que o controle (exposição contínua à luz) e zero dia de exposição à luz apresentam médias de expressão baixas (TPM<1), e que nos tratamentos de dois e cinco dias de exposição à luz as médias de expressão foram mais elevadas (TPM: 7,05 e 6,72, respectivamente). O padrão de expressão nas células do mesocarpo nas condições dois e cinco dias de exposição à luz foi semelhante ao padrão nas células do epicarpo nas mesmas condições. Além disso, nas células do mesocarpo no tempo de coleta dois e cinco dias, o gene *SIANI* apresentou expressão diferencial significativa em relação ao controle (exposição contínua à luz), sendo altamente ativado.

Vários estudos mostram que o padrão de acúmulo de antocianina está ligado aos fatores ambientais e ao desenvolvimento de tecidos específicos que são regulados primariamente pelos fatores de transcrição R2R3-MYB que compõem o complexo ternário MYB-bHLH-WD40 (MBW). Porém, a produção de antocianina é induzida pela luz em petúnia e está associada à expressão aumentada do fator de transcrição bHLH, *ANI*, e dois

fatores R2R3-MYB (ALBERT *et al.*, 2011). Em *Arabidopsis*, a expressão de *TT8* é induzida por condições de alta luminosidade e suprimida por altas temperaturas (GONZALEZ *et al.*, 2009). Ademais, a expressão de vários fatores de transcrição bHLH são regulados positivamente durante o desenvolvimento, juntamente com as mudanças de pigmentação relacionadas com às antocianinas (QIU *et al.*, 2016, FU *et al.*, 2020). Por exemplo, a expressão de *ANI* é regulada positivamente durante o desenvolvimento da flor em petúnia (FU *et al.*, 2020). Recentemente, o fator de transcrição bHLH *SIANI* foi reportado como importante na síntese de antocianina durante o desenvolvimento de hipocótilos de mudas de tomateiro (QIU *et al.*, 2016). Estudos de expressão gênica (RT-qPCR) em frutos de tomate *MT-Aft/atv/hp2* identificaram que a expressão de *SIANI*, apresenta um maior nível de expressão com relação a polpa de tomate e que sua expressão é maior nos frutos em estágios maduros com relação ao estágio verde (REIS, 2020). Além disso, presumiram que o miR6024-3p pode regular a expressão de *SIANI*, pois a expressão do miR6024-3p é maior nos estágios verdes com relação ao estágio maduro dos frutos (REIS, 2020).

Diante dos resultados, podemos sugerir que a ausência de pigmentação nas células do mesocarpo em frutos de tomateiro *MT-Aft/atv/hp2* está relacionada com a falta de expressão do regulador positivo bHLH (*SIANI*). Podemos afirmar que a luz regula a expressão desse fator de transcrição e que sua regulação pela luz nas células do mesocarpo ocorre apenas quando as células do epicarpo não estão pigmentadas, após seu desenvolvimento completo até a fase de amadurecimento “turning”. Esses achados indicam que além da luz, a fase de desenvolvimento do fruto é importante para regulação da expressão do fator de transcrição bHLH *SIANI*. Ademais, podemos levantar a hipótese de que a luz, possa regular a expressão de bHLH *SIANI*, através da supressão da expressão do RNA de interferência (miR6024-3p), o qual foi sugerido no trabalho de Reis (2020), como regulador da expressão de *SIANI*.

Recentemente, a superexpressão do gene *SIAN2-like* em tomateiro cv. Micro-Tom aciânico teria substituído o estímulo luminoso e promovido o acúmulo de antocianina inclusive nas células do mesocarpo (SUN *et al.*, 2019). Porém, durante a análise, o fator luz não foi totalmente excluído e o acúmulo de antocianina ocorreu após a fase de desenvolvimento do fruto “turning”, quando ocorre a expressão do *SIANI*. Logo, é importante salientar que, mesmo com a superexpressão do *SIAN2-like*, é necessária a regulação da expressão do *SIANI*, que é ativada por fatores ambientais e de desenvolvimento.

Alguns estudos têm abordado a família de proteínas WRKY como importante na regulação de antocianina em espécies de *Arabidopsis* e petúnia. O *TTG2* em *Arabidopsis* codifica um fator de transcrição WRKY (GONZALEZ *et al.*, 2016; VERWEIJ *et al.*, 2016)

regulado pelo complexo MBW, assim como os genes biossintéticos tardios (LBGs). Posteriormente, as proteínas WRKY e WDR interagem fisicamente, possivelmente para formar um complexo transcricional separado, sem as proteínas MYB e bHLH que visa estreitamente a acidificação do vacúolo e genes de transporte (GONZALEZ *et al.*, 2016; LLOYD *et al.*, 2017).

Em nosso estudo verificamos que o gene *Solyc10g084380* homólogo ao TTG2 de *Arabidopsis* codifica um fator de transcrição WRKY regulado pela luz, nas células do mesocarpo nos dias dois e cinco de exposição à luz, enquanto nas células do epicarpo zero dia de exposição à luz, o TTG2 foi regulado negativamente. E nos demais dias, o TTG2 não apresentou diferença com relação ao controle. Esses resultados indicam que o TTG2 apresenta um importante papel na regulação da antocianina e que podemos levantar a hipótese do seu envolvimento na ativação dos genes transportadores e de acidificação do vacúolo, pois os transportadores putativos GST e PAT foram fortemente induzidos nas células do mesocarpo aos dois e cinco dias de exposição à luz, com relação ao tratamento controle (exposição contínua à luz).

Além dos transportadores, a expressão de 12 genes estruturais relacionados à síntese de antocianinas foi altamente induzida nas células do mesocarpo aos dois e cinco dias de exposição à luz em comparação com o controle (exposição contínua à luz), dentre eles, 6 genes biossintéticos iniciais (EBGs) PAL, CHS, CHS2, CHI, CHI-Like, F3H e outros 6 tardios (LBGs) F3'5'H, DFR, ANS, 3GT, RT e AAC. Fatores de transcrição considerados reguladores positivos e genes biossintéticos estruturais são altamente regulados pela luz em frutos de tomateiro MT-*Aft/atv/hp2*.

Os genes repressores R3MYB e R2R3-MYB, regulam a expressão dos genes estruturais da via de síntese de antocianina de forma indireta, evitando ou desestabilizando a formação do complexo MBW (NEMIE-FEYISSA *et al.*, 2014). Em tomate, os genes *SIMYBATV*, *SIMYBATV-like* e *SITRY*, foram identificados como repressores R3MYB e os genes *SIMYB3*, *SIMYB7*, *SIMYB32* e *SIMYBL2/MYB76*, foram identificados como repressores de R2R3-MYB (CAO *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2014).

Em nosso estudo nós descobrimos que o gene R3MYB *SIMYBATV* no genótipo MT-*Aft/atv/hp2* apresenta a mesma inserção de 4 bp no segundo exon, que leva a formação de uma proteína truncada sem o domínio R3, recentemente encontrada no genótipo Indigo Rose (SUN *et al.*, 2019). Mutações em genes repressores, levam a perda de função e promovem níveis de expressão mais elevados dos genes estruturais responsáveis pela síntese de antocianina e,

consequentemente, uma pigmentação mais acentuada (ALBERT *et al.*, 2011, 2014; YUAN *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2009).

Ademais, verificamos que *SIMYBATV*, *SIMYBATV-Like* e *SIMYBL2/MYB76*, apresentaram padrões de expressão semelhante e são altamente regulados positivamente nas células do mesocarpo aos dois e cinco dias de exposição à luz, e seus níveis de expressão são extremamente baixos ou quase inexistente nas células do mesocarpo controle, assim como os níveis de expressão de *SIANI* (FIGURA 5 e TABELA S3).

Esses resultados, indicam que *SIANI*, parece desempenhar um papel fundamental na regulação de antocianina, sugerindo que altos níveis de expressão de *SIANI* promove a expressão dos reguladores negativos de tomate. Esses resultados encaixam com modelo putativo desenvolvido para explicar a regulação de antocianina em tomate por Cao *et al.* (2017).

5.3 O acúmulo de antocianina nas células epidérmicas no início do desenvolvimento do fruto interfere na qualidade da luz que chega às células do mesocarpo do fruto de tomateiro MT-*Aft/atv/hp2*

As plantas utilizam muitos fotorreceptores para coordenar as respostas à luz ambiental (MA *et al.*, 2019). Com o intuito de verificar se as células do epicarpo pigmentadas com antocianina proporcionam sombreamento às células do mesocarpo, nós comparamos os níveis de transcrição dos genes fotorreceptores de luz, como os fitocromos sensores de luz vermelha e vermelho distante (*SIPHYA*, *SIPHYB1* e *SIPHYB2*), os criptocromos que percebem a luz azul/ultravioleta (*SICRY1a*, *SICRY1b*, *SICRY2* e *SICRY3*) e o fotorreceptor de UV-B (*SIUVR8*) (CHAVES *et al.*, 2011; CHRISTIE, 2007; JENKINS, 2014).

Em nossa análise, dentre os criptocromos, apenas o *CRY3* foi regulado positivamente nas células do epicarpo controle com relação às células do mesocarpo controle. Além disso, nas células do epicarpo zero dia de exposição à luz, *CRY3* foi regulado negativamente com relação ao epicarpo (controle), enquanto no mesocarpo, ao zero dia de exposição à luz não ocorreu diferença significativa com relação ao mesocarpo (controle) (FIGURA 8).

Alguns estudos vêm caracterizando o fotorreceptor *CRY3* na regulação da síntese de antocianina em berinjela, couve-flor e petúnia (FU *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2020). Ambos os trabalhos mostram que *CRY3* é regulado negativamente pelas condições de sombreamento e altamente regulado pela luz (FU *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2020). Além disso, *CRY3* em petúnia, apresentou mudanças no nível

de expressão em relação à qualidade da luz, sendo reprimidos em tratamentos com luz vermelha em relação aos tratamentos com luz branca e azul, enquanto CRY1 e CRY2 não apresentaram mudanças significativas quanto à qualidade da luz, o que significa que o CRY3 poderia ser incluído na via do sinal de luz azul (FU *et al.*, 2020).

No presente estudo, verificamos que CRY1 e CRY2 apenas apresentaram regulação positiva nas células do epicarpo e mesocarpo, dois e cinco dias de exposição à luz, com relação ao epicarpo e mesocarpo controle, respectivamente (FIGURA 8). Verificamos também que o termo “GO response to blue light” (GO:0009637) mostrou-se enriquecido nas células do epicarpo e mesocarpo (tratamento dois e cinco dias de exposição à luz) em comparação aos seus respectivos controles (FIGURA 9). Conforme essa abordagem, podemos propor que CRY3 seja um importante fotorreceptor em frutos de tomateiro, com funções críticas na regulação da produção de antocianina.

O fotorreceptor UVR8, que é responsivo a radiação UV-B, também foi regulado positivamente nas células do epicarpo controle em comparação com as células do mesocarpo controle. Além disso, o termo (GO:0010224) response to UV-B foi enriquecido em mesocarpo dois e cinco dias de coleta dos frutos expostos à luz (comparado ao controle) (FIGURA 9). Esses resultados indicam que tanto a luz azul quanto UV-B estejam envolvidas na transdução do sinal para desencadear a biossíntese de antocianina nas células do epicarpo e mesocarpo em tomate MT-*aft/atv/hp2*.

Alguns estudos em frutos de tomate *Aft*, demonstram o efeito positivo da luz UV-B no acúmulo de antocianina nas células do epicarpo, ambas apresentam um efeito sinérgico que induzem a expressão de alguns genes envolvidos na rota da biossíntese de antocianina como, por exemplo, CHS (Chalcona sintase) (FUGLEVAND *et al.*, 1996; KIM *et al.*, 2021). Em hipocótilos de nabo, a luz azul combinada com UV-B também favoreceu o acúmulo de antocianina (WANG *et al.*, 2012). A biossíntese e a distribuição da antocianina regulada pela luz azul e UV-B depende da percepção da luz pelos fotorreceptores e da transdução do sinal, através de HY5 e COP1 (PODOLEC; ULM, 2018).

Curiosamente verificamos em nosso estudo que os fotorreceptores relacionados ao fitocromo PHYB1 e PHYB2 foram regulados negativamente nas células do epicarpo controle com relação ao mesocarpo controle, enquanto PHYA não apresentou diferença significativa. Alguns estudos mostram que comprimentos de onda mais longos como a radiação vermelho e vermelho distante, não são tão eficazes no acúmulo de antocianina quanto comprimento de onda mais curtos como o caso de luz azul e UVB (WANG *et al.*, 2012; ZORATTI *et al.*, 2014).

Sob condições de irradiância vermelho (R), PHYA proporciona a síntese de antocianina em hipocótilos de tomate, porém PHYB2 pode inibir as respostas positiva ao acúmulo de antocianina, o que indica que a resposta mediada por PHYA pode ser regulada por PHYB2 (WELLER *et al.*, 2000). No entanto, sob condições de irradiância vermelho distante (FR), uma interação positiva entre PHYA e PHYB1 proporciona o aumento da síntese de antocianinas. Um equilíbrio na relação PHYA/PHYB parece ser essencial no acúmulo de antocianina, em relação à percepção e transdução do sinal (FU *et al.*, 2020; HUSAINID *et al.*, 2007; WELLER *et al.*, 2000).

Diante dessas abordagens, podemos levantar a hipótese que a pigmentação das células do epicarpo desde o início do desenvolvimento do fruto, interferem na qualidade da luz que chega até às células do mesocarpo. A pigmentação de antocianina nas células do epicarpo do fruto de tomate forma um filtro que impede a passagem de radiação com comprimento de ondas menores, não ativando a via de percepção e nem de transdução de sinal, importante para ativação de genes responsivos a biossíntese de antocianina.

5.4 Análise de enriquecimento permite identificar dois grupos de fatores de transcrição que possivelmente estão envolvidos na regulação da biossíntese de antocianina em frutos de tomate MT- *Aft/atv/hp2*

A análise de enriquecimento de diferentes classes de anotação funcional gênica em nosso estudo nos proporcionou revelar importantes alterações transcricionais associadas às células do epicarpo e mesocarpo nos tratamentos de exposição à luz e a comparação entre os tratamentos controles. Com relação a vias metabólicas, a luz proporcionou uma regulação positiva com relação a biossíntese de fenilalanina e flavonóides nas células do epicarpo e mesocarpo do fruto do tomate MT- (*Aft/atv/hp2*) com relação aos tratamentos controle (epicarpo e mesocarpo). Fenilalanina é o precursor inicial da via de síntese dos flavonóides e antocianina (TANAKA *et al.*, 2010). Com relação à biossíntese de antocianina, as células do mesocarpo foram enriquecidas positivamente no tempo de dois dias de exposição à luz, ponto que antecede a pigmentação visual nas células do mesocarpo.

Alguns fatores de transcrição foram enriquecidos pela luz nas células de epicarpo e mesocarpo, dois e cinco dias de exposição à luz, que podem estar associados à biossíntese de antocianina no fruto de tomate (*Aft/atv/hp2*).

O fator de transcrição SQUAMOSA promoter-binding protein-like (SBP box) (RUBIO-SOMOZA; WEIGEL, 2011) desempenha papéis importantes em diversos aspectos do desenvolvimento da planta, incluindo transição de fase, arquitetura da planta, distribuição de tricomas, padronização embrionária e biossíntese de antocianina (CHUCK *et al.*, 2007; GOU *et al.*, 2011; NODINE; BARTEL, 2010; SCHWAB *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2010). Alguns estudos têm abordado que RNAs de interferência (miR156 e miR157) estão envolvidos na supressão dos fatores de transcrição SPB-box, e promovendo resposta a biossíntese de antocianina em mirtilo, lichia e *Arabidopsis* (GOU *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2020; YAO *et al.*, 2015). Em nosso estudo, SBP-box, foi regulado negativamente nas células do epicarpo e mesocarpo nos dois dias de exposição à luz em comparação com os tratamentos controle (FIGURA 9), tais resultados indicam que a supressão de SBP-box pode estar associada à luz e favorece a atividade RNAs de interferência para promover o acúmulo de antocianina.

Os fatores de transcrição DBB (Double-box), são grupos estruturais da família de genes BBX (B-box) (TALAR; KIELBOWICZ-MATUK, 2021). Os diferentes membros da família de genes diferem amplamente na sua estrutura e cumprem funções distintas na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo fotomorfogênese de mudas, a biossíntese de antocianinas, regulação fotoperiódica da floração e vias hormonais (TALAR; KIELBOWICZ-MATUK, 2021). No presente estudo, os fatores de transcrição DBB, subclasse das proteínas BBX, foram regulados positivamente nas células do mesocarpo dois e cinco dias de exposição à luz em relação ao tratamento controle (FIGURA 9). Em alguns estudos em maçã e *Arabidopsis*, esses fatores de transcrição estão envolvidos na regulação positiva e negativa de genes chaves na síntese de antocianina.

Essas proteínas BBX parecem estar envolvidas no controle preciso da síntese de antocianina pela ligação à HY5 e com a regulação transcricional de genes MYBs (TALAR; KIELBOWICZ-MATUK, 2021). A modulação da expressão de genes essenciais envolvidos na produção de antocianina fornece uma nova compreensão da funcionalidade dos fatores de transcrição BBX.

Esses resultados indicam que muitas questões sobre a regulação da biossíntese de antocianina mediada pela luz que ainda precisam ser estudadas e respondidas.

6 CONCLUSÕES

Esse estudo, reúne informações inéditas sobre o acúmulo de antocianina nas células do mesocarpo do fruto de tomate *MT- Aft/atv/hp2* mediado pela luz. Os resultados demonstram que o acúmulo de antocianina nas células do epicarpo logo após a antese da flor, quando exposto à luz visível, parece estabelecer um filtro que dificulta a passagem de comprimentos de ondas menores como caso da luz azul e UV-B para as células do mesocarpo. A luz azul e UV-B, parecem ser sinais cruciais para ativação da biossíntese de antocianina no fruto de tomate *MT- Aft/atv/hp2*. Nas células do epicarpo do fruto, esses sinais são captados logo no início do seu desenvolvimento e a exposição à luz em poucas horas já regula genes essenciais do complexo ternário MBW para regulação de genes estruturais responsáveis pela formação da antocianina em frutos de tomate *MT- aft/atv/hp2*.

O gene *SIAN2-like* é o candidato subjacente ao loci *Aft* e é regulado pela luz, de maneira dependente do fator de transcrição *SIHY5*, sendo essencial para ativação do complexo MBW porém, verificamos também que o fator *SIANI* que codifica uma proteína bHLH desenvolve um papel importante como um regulador positivo para ativação da pigmentação de antocianina, e parece ser regulado pela luz independentemente de *SIHY5*. O filtro inicialmente estabelecido pela pigmentação das células do epicarpo inibe a ativação do fator de transcrição *SIANI* e de fatores de transcrição considerados repressores da biossíntese de antocianina como *SIMYBATV*, *SIMYBATV-like* e *SIMYBL2*. De acordo com nossas análises, o gene repressor *SIMYBATV*, candidato subjacente ao loci *atv* em tomate *MT- Aft/atv/hp2* não apresenta funcionalidade, o que gera um fenótipo com um acúmulo de antocianina uniforme em todo fruto, e com teores mais elevados.

A inibição da luz, desde o início do desenvolvimento do fruto por 30 dias e posteriormente, a exposição dos mesmos à luz por no mínimo cinco dias, promove o acúmulo de antocianina no fruto nas células do epicarpo e mesocarpo. Estas condições regulam positivamente os genes *SIANI*, *SIMYBATV*, *SIMYBATV-like* e *SIMYBL2* e conseqüentemente os genes estruturais, principalmente, os genes biossintéticos tardios (LBGs). A ativação do fator de transcrição *SIANI* nas células do mesocarpo é regulada pela luz e possivelmente pelo desenvolvimento do fruto, isso porque os genes chaves da biossíntese de antocianina nas células do mesocarpo são ativados pela luz quando o fruto já está completamente desenvolvidos em sua fase “turning”.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Em nosso estudo identificamos que a pigmentação das células do epicarpo logo no início do desenvolvimento do fruto (diferenciação celular) influencia na qualidade da luz que chega nas células do mesocarpo na fase em que ele se encontra completamente desenvolvido, inibindo a ativação do fator de transcrição bHLH *SIANI*, que compõe o complexo ternário MBW responsável por regular os genes estruturais da via da biossíntese de antocianina.

Estudos apontam que a expressão do microRNA miR6024-3p pode estar envolvida na regulação de *SIANI* durante a fase de desenvolvimento do fruto, e que possivelmente a luz possa reprimir a expressão do RNA de interferência e promover a expressão de *SIANI* nas células do mesocarpo quando exposto à luz, após a inibição da luz durante o seu desenvolvimento. Esses resultados abrem caminhos para novos estudos, direcionados à indução da expressão do fator de transcrição bHLH *SIANI*, potencialmente através da tecnologia de edição de genoma (sistema CRISPR/ Cas9) de seu repressor de miRNA com intuito de obter antocianina nas células do mesocarpo, sem a necessidade de indução pela luz.

Além disso, estudos biológicos e fisiológicos mais pontuais com relação à qualidade e intensidade da luz poderão auxiliar a explicar a ação das antocianinas como um filtro de comprimentos de ondas específicos.

Verificamos que outros fatores de transcrição que foram enriquecidos nas células do epicarpo e mesocarpo após a incidência de luz estão envolvidos na síntese de antocianinas, como o caso dos fatores de transcrição SBP e BBX. Estudos direcionados com esses fatores de transcrição podem melhorar a compreensão da regulação da via de biossíntese de antocianina em tomate.

Ademais, a análise de RNA-Seq em frutos de tomateiro MT- *aft/atv/hp2* sob condições de ausência de luz e posterior incidência de luz abre um leque vasto de estudos com relação a outras vias bioquímicas, relacionadas ou não à antocianina.

REFÊRENCIAS

- ALBERT, N. W. *et al.* Light-induced vegetative anthocyanin pigmentation in Petunia. **Journal of Experimental Botany**, v.60, n.7, p.2191-2202, 2009.
- ALBERT, N. W. *et al.* Members of an R2R3-MYB transcription factor family in Petunia are developmentally and environmentally regulated to control complex floral and vegetative pigmentation patterning. **The Plant Journal**, v.65, n.5, p.771-784, 2011.
- ALBERT, N. W. *et al.* A conserved network of transcriptional activators and repressors regulates anthocyanin pigmentation in eudicots. **The Plant Cell**, v.26, n.3, p.962-980, 2014.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, 1990.
- AMARO, L. F. *et al.* Influence of cultivar and storage conditions in anthocyanin content and radical-scavenging activity of strawberry jams. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 69, 2012.
- AN, J. P. *et al.* The bZIP transcription factor MdHY5 regulates anthocyanin accumulation and nitrate assimilation in apple. **Horticulture Research**, v.4, n.1, p. 1-9, 2017.
- ANDREWS, S. **FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data**. 2010. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Acesso em: 15 jun. 2021.
- AZUMA, A. *et al.* Light emitting diode irradiation at night accelerates anthocyanin accumulation in grape skin. In: **VII International Symposium on Light in Horticultural Systems**, v. 956, p.341-347, 2012.
- BENDIGER, P. A. *et al.* Interspecific reproductive barriers in the tomato clade: opportunities to decipher mechanisms of reproductive isolation. **Sexual Plant Reproduction**, v.24(3), p.171-187, 2011.
- BASSOLINO, L. *et al.* Accumulation of anthocyanins in tomato skin extends shelf life. **New Phytologist**, v.200, n.3, p.650-655, 2013.
- BLANDO, F. *et al.* Nutraceutical characterization of anthocyanin-rich fruits produced by “Sun Black” tomato line. **Frontiers in Nutrition**, v.6, p.133, 2019.
- BOVY, A. *et al.* High-flavonol tomatoes resulting from the heterologous expression of the maize transcription factor genes LC and C1. **The Plant Cell**, v.14, n.10, p.2509-2526, 2002.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v.30, n.15, p.2114-2120, 2014.

BUER, C. S., IMIN, N.; DJORDJEVIC, M. A. Flavonoids: new roles for old molecules. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.52, n1, p. 98-111, 2010.

BUTELLI E, *et al.* Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. **Nature Biotechnology**, v. 26, p.1301-8, 2008.

CAO, X., *et al.* A putative R3 MYB repressor is the candidate gene underlying atrovioiacium, a locus for anthocyanin pigmentation in tomato fruit. **Journal of Experimental Botany**, v.68, n.21-22, p. 5745-5758, 2017.

CASAL, J. J. Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade. **Annual Review of Plant Biology**, v.64, p. 403-427, 2013.

CHAVES, S. S. **Análise da regulação da via de biossíntese de antocianina em tecidos do fruto do tomateiro.** 140p. 2015. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2015.

CHAVES, I., *et al.* The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. **Annual Review of Plant Biology**, v.62, p.335-364, 2011.

CHAVES-SILVA, S., *et al.* Understanding the genetic regulation of anthocyanin biosynthesis in plants—tools for breeding purple varieties of fruits and vegetables. **Phytochemistry**, v.153, p.11-27, 2018.

CHRISTIE, J. M. Phototropin blue-light receptors. **Annual Review of Plant Biology**, v.58, p.21-45, 2007.

CHUCK, G. *et al.* The heterochronic maize mutant Corngrass1 results from overexpression of a tandem microRNA. **Nature Genetics**, v.39, n.4, p. 544-549, 2007.

COLANERO, S.; PERATA, P.; GONZALI, S. The atroviolacea gene encodes an R3-MYB protein repressing anthocyanin synthesis in tomato plants. **Frontiers in Plant Science**, v.9, p.830, 2018.

COLANERO, S. *et al.* Alternative splicing in the anthocyanin fruit gene encoding an R2R3 MYB transcription factor affects anthocyanin biosynthesis in tomato fruits. **Plant Communications**, v.1, n.1, p. 100006, 2020.

FAVORY, J. J. *et al.* Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in Arabidopsis. **The EMBO Journal**, v.28, n.5, p.591-601, 2009.

FERNANDEZ-POZO, N. *et al.* The Sol Genomics Network (SGN)—from genotype to phenotype to breeding. **Nucleic Acids Research**, v.43, n.D1, p. D1036-D1041, 2015.

FU, Z., *et al.* Systematic Identification of the Light-quality Responding Anthocyanin Synthesis-related Transcripts in Petunia Petals. **Horticultural Plant Journal**, v.6, n.6, p.428-438, 2020.

FUGLEVAND, G.; JACKSON, J. A.; JENKINS, G. I. UV-B, UV-A, and blue light signal transduction pathways interact synergistically to regulate chalcone synthase gene expression in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v.8, n.12, p. 2347-2357, 1996.

FENG, S. *et al.* Anthocyanin biosynthesis in pears is regulated by a R2R3-MYB transcription factor PyMYB10. **Planta**, v.232, n.1, p. 245-255, 2010.

GENTLEMAN, R. C. *et al.* Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biology**, v. 5, n.10, p. 1-16, 2004.

GEORGIEV, C. Anthocyanin fruit (Af). **Rep Tomato Genet Coop**, v.22, n.10, p. 10, 1992.

GONZALEZ, S.; MAZZUCATO, A.; PERATA, P. Purple as a tomato: towards high anthocyanin tomatoes. **Trends in Plant Science**, v.14, n.5, p. 237-241, 2009.

GONZÁLEZ, M. *et al.* Analysis of anthocyanin biosynthesis genes expression profiles in contrasting cultivars of Japanese plum (*Prunus salicina* L.) during fruit development. **Gene Expression Patterns**, v.21, n1, p. 54-62, 2016.

GOU, J. Y. *et al.* Negative regulation of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis by a miR156-targeted SPL transcription factor. **The Plant Cell**, v.23, n.4, p. 1512-1522, 2011.

GOULD, K. S.; DUDLE, D. A.; NEUFELD, H. S. Why some stems are red: cauline anthocyanins shield photosystem II against high light stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 10, p. 2707-2717, 2010.

GRABHERR, M. G. *et al.* Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644-652, 2011.

GU, Z.; EILS, R.; SCHLESNER, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. **Bioinformatics**, v. 32, n. 18, p. 2847-2849, 2016.

GUO, J.; HAN, W.; WANG, M. Ultraviolet and environmental stresses involved in the induction and regulation of anthocyanin biosynthesis: a review. **African Journal of Biotechnology**, v.7, n.25, 2008.

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.1, p.163-187, 2010.

HICHRI, I. *et al.* The basic helix-loop-helix transcription factor MYC1 is involved in the regulation of the flavonoid biosynthesis pathway in grapevine. **Molecular Plant** **3**, p.509-523, 2010.

HICHRI, I. *et al.* Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. **Journal of Experimental Botany**, v.62, n.8, p. 2465-2483, 2011.

HOLM, M. *et al.* Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in Arabidopsis. **Genes & Development**, v.16, n.10, p. 1247-1259, 2002.

HOLTON, T. A.; CORNISH, E. C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. **The Plant Cell**, v.7, n.7, p. 1071, 1995.

HONDA, C. *et al.* Thinning and bagging treatments and the growing region influence anthocyanin accumulation in red-fleshed apple fruit. **The Horticulture Journal**, p. OKD-010, 2017.

HONG, S. H. *et al.* CRY1 inhibits COP1-mediated degradation of BIT1, a MYB transcription factor, to activate blue light-dependent gene expression in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v.55, n.3, p.361-371, 2008.

HUSAINID, S. S. *et al.* Overexpression of homologous phytochrome genes in tomato: exploring the limits in photoperception. **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.3, p.615-626, 2007.

JAAKOLA, L.; HOHTOLA, A. Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. **Plant, Cell & Environment**, v.33, n.8, p.1239-1247, 2010.

JAAKOLA, L. New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. **Trends in Plant Science**, v.18, n.9, p. 477-483, 2013.

JENKINS, G. I. The UV-B photoreceptor UVR8: from structure to physiology. **The Plant Cell**, v.26, n.1, p.21-37, 2014.

JIN, J. *et al.* Plant TFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. **Nucleic Acids Research**, p. gkw982, 2016.

JUN, J. H. *et al.* The transcriptional repressor MYB2 regulates both spatial and temporal patterns of proanthocyanidin and anthocyanin pigmentation in *Medicago truncatula*. **The Plant Cell**, v.27, n.10, p. 2860-2879, 2015.

KANEHISA, M.; SATO, Y.; MORISHIMA, K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. **Journal of Molecular Biology**, v.428, n.4, p.726-731, 2016.

KENDRICK, R. E. *et al.* Photomorphogenic mutants of tomato. **Plant, Cell & Environment**, v.20, n.6, p.746-751, 1997.

KIFERLE, C. *et al.* Tomato R2R3-MYB proteins SIANT1 and SIAN2: same protein activity, different roles. **PLoS One**, v.10, n.8, p.0136365, 2015.

KIM, M. J. *et al.* Blue and UV-B light synergistically induce anthocyanin accumulation by co-activating nitrate reductase gene expression in Anthocyanin fruit (Aft) tomato. **Plant Biology**, v.23, p.210-220, 2021.

KOES, R.; VERWEIJ, W.; QUATTROCCHIO, F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. **Trends in Plant Science**, v.10, n.5, p.236-242, 2005.

LARKIN, M. A. *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LAU, O. S.; DENG, X. W. The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later. **Trends in Plant Science**, v.17, n.10, p. 584-593, 2012.

LEE, J.; FINN, C. E. Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.87, n.14, p. 2665-2675, 2007.

LIAO, Y.; SMYTH, G. K.; SHI, W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. **Bioinformatics**, v.30, n.7, p.923-930, 2014.

LI, Y. Y. *et al.* MdCOP1 ubiquitin E3 ligases interact with MdMYB1 to regulate light-induced anthocyanin biosynthesis and red fruit coloration in apple. **Plant Physiology**, v.160, n.2, p.1011-1022, 2012.

LI, P.; MA, F.; CHENG, L. Primary and secondary metabolism in the sun-exposed peel and the shaded peel of apple fruit. **Physiologia Plantarum**, v.148, n.1, p. 9-24, 2013.

LI, Y. Y. *et al.* Molecular cloning and functional analysis of a blue light receptor gene MdCRY2 from apple (*Malus domestica*). **Plant Cell Reports**, v.32, n.4, p. 555-566, 2013.

LI, J. *et al.* Combined transcriptomic and proteomic analysis constructs a new model for light-induced anthocyanin biosynthesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). **Plant, Cell & Environment**, v.40, n.12, p. 3069-3087, 2017.

LI, J. *et al.* Transcriptome profiling of genes related to light-induced anthocyanin biosynthesis in eggplant (*Solanum melongena* L.) before purple color becomes evident. **BMC Genomics**, v.19, n.1, p. 1-12, 2018.

LI, Y. *et al.* Genome-wide identification, characterization, and expression patterns analysis of the SBP-box gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2020.

LIN, T. *et al.* Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. **Nature Genetics**, v.46, n.11, p. 1220-1226, 2014.

LIU Y.; ZHOU J.; WHITE K. P. RNA-seq differential expression studies: more sequence or more replication? **Bioinformatics**, v.30, p.301-4, 2014.

LIU, J.; OSBOURN, A.; MA, P. MYB transcription factors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants. **Molecular Plant**, v.8, n.5, 689-708, 2015.

LIU, C. C. *et al.* The bZip transcription factor HY5 mediates CRY1a-induced anthocyanin biosynthesis in tomato. **Plant, Cell & Environment**, v.41, n.8, p. 1762-1775, 2018.

LIU, Y. *et al.* Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in Solanaceous vegetables: a review. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, p. 52, 2018.

LIU, C. *et al.* Transcriptomic profiling of purple broccoli reveals light-induced anthocyanin biosynthetic signaling and structural genes. **PeerJ**, v. 8, p. e8870, 2020.

LLOYD, A. *et al.* Advances in the MYB–bHLH–WD repeat (MBW) pigment regulatory model: addition of a WRKY factor and co-option of an anthocyanin MYB for betalain regulation. **Plant and Cell Physiology**, v.58, n.9, p.1431-1441, 2017.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v.15, n.12, p.1-21, 2014.

MA, D.; CONSTABEL, C. P. MYB repressors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants. **Trends in Plant Science**, v.24, n.3, p.275-289, 2019.

MAHMOOD, K. *et al.* The Arabidopsis transcription factor ANAC032 represses anthocyanin biosynthesis in response to high sucrose and oxidative and abiotic stresses. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p.1548, 2016.

MARTIN, C.; GERATS, T. Control of pigment biosynthesis genes during petal development. **The Plant Cell**, v.5, n.10, p. 1253, 1993.

MARTIN, C. *et al.* How can research on plants contribute to promoting human health? **The Plant Cell**, v. 23, n. 5, p. 1685-1699, 2011.

MATHEWS, H. *et al.* Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. **The Plant Cell**, v.15, n.8, p.1689-1703. 2003

MATSUI, K.; UMEMURA, Y.; OHME-TAKAGI, M. AtMYBL2, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v.55, n.6, p.954-967, 2008.

MENG, X.; XING, T.; WANG, X. The role of light in the regulation of anthocyanin accumulation in *Gerbera hybrida*. **Plant Growth Regulation**, v.44, n.3, p. 243-250, 2004.

MERZLYAK, M. N.; MELØ, T. B.; NAQVI, K. R. Effect of anthocyanins, carotenoids, and flavonols on chlorophyll fluorescence excitation spectra in apple fruit: signature analysis, assessment, modelling, and relevance to photoprotection. **Journal of Experimental Botany**, v.59, n.2, 349-359, 2008.

MES, P. J. *et al.* Characterization of tomatoes expressing anthocyanin in the fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 133, p.262-269, 2008.

MOGLICH, A. *et al.* Structure and function of plant photoreceptors. **Annual Review of Plant Biology**, v.61, p.21-47, 2010.

MUIR, S. R. *et al.* Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. **Nature Biotechnology**, v.19, n.5, p. 470-474, 2001.

MYERS, J. *et al.* Breeding tomatoes for increased flavonoids. In: Strengthening Community Seed Systems. **Proceedings... 6th Organic Seed Growers Conference**, Port Townsend, Washington, USA, 19-21 jan., 2012. Organic Seed Alliance, 2012. p. 50-51.

NEMIE-FEYISSA, D. *et al.* Nitrogen depletion and small R3-MYB transcription factors affecting anthocyanin accumulation in Arabidopsis leaves. **Phytochemistry**, v.98, p. 34-40, 2014.

NIU, S. S. *et al.* Coordinated regulation of anthocyanin biosynthesis in Chinese bayberry (*Myrica rubra*) fruit by a R2R3 MYB transcription factor. **Planta**, v.231, n.4, p. 887-899, 2010.

NODINE, M. D.; BARTEL, D. P. MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. **Genes & Development**, v. 24, n.23, p. 2678-2692, 2010.

ONSLow, M.W. **The Anthocyanin Pigments of Plants**. Cambridge University Press, v.9781107630901, p.324, 2014.

PENG, T. *et al.* Screening of UV-B-induced genes from apple peels by SSH: possible involvement of MdCOP1-mediated signaling cascade genes in anthocyanin accumulation. **Physiologia Plantarum**, v. 148, n.3, p.432-444, 2013.

PODOLEC, R.; ULM, R. Photoreceptor-mediated regulation of the COP1/SPA E3 ubiquitin ligase. **Current Opinion in Plant Biology**, v.45, p.18-25, 2018.

POVERO, G. *et al.* Transcriptional analysis in high-anthocyanin tomatoes reveals synergistic effect of *Aft* and *atv* genes. **Journal of Plant Physiology** v.168, p. 270-279, 2011.

QIU, Z. *et al.* Identification of candidate HY5-dependent and-independent regulators of anthocyanin biosynthesis in tomato. **Plant and Cell Physiology**, v.60, n.3, p.643-656, 2019.

QIU, Z. *et al.* The tomato Hoffman's anthocyaninless gene encodes a bHLH transcription factor involved in anthocyanin biosynthesis that is developmentally regulated and induced by low temperatures. **PloS One**, v. 11, n.3, p.e0151067, 2016.

QUATTROCCHIO, F. *et al.* PH4 of Petunia is an R2R3 MYB protein that activates vacuolar acidification through interactions with basic-helix-loop-helix transcription factors of the anthocyanin pathway. **The Plant Cell**, v.18, n.5, p.1274-1291, 2006.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2017. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 15 jun. 2021.

REIS, G. L. dos. **Novel microRNAs controlling the anthocyanin biosynthesis pathway in tomato**. 2020. 52 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2020.

RICK, C. M.; REEVES, A. F.; ZOBEL, R. W. Inheritance and linkage relations of four new mutants. **Rep Tomato Genet Coop**, v.18, p.34-35,1968.

RICK, C. M. *et al.* Abg—a gene on chromosome 10 for purple fruit derived from *S. lycopersicoides*. **Rep. Tomato Genet Coop**, v. 44, p. 29-30, 1994.

RIZZINI, L. *et al.* Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. **Science**, v. 332, n. 6025, p. 103-106, 2011.

RUBIO-SOMOZA, I.; WEIGEL, D. MicroRNA networks and developmental plasticity in plants. **Trends in Plant Science**, v. 16, n.5, p. 258-264, 2011.

SAIJO, Y. *et al.* The COP1–SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. **Genes & Development**, v.17, n.21, p. 2642-2647, 2003.

SANTOS, A. L. dos. **Análise da regulação transcricional da rota metabólica de antocianinas e de seus transportadores em diferentes tecidos do fruto de tomateiro.** 2017. 221 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

SAPIR, M. *et al.* Molecular aspects of Anthocyanin fruit tomato in relation to high pigment-1. **Journal of Heredity** v.99, n.292-303, 2008.

SASAKI, N. *et al.* The role of acyl-glucose in anthocyanin modifications. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 18747-18766, 2014.

SCARANO, A. *et al.* Combined dietary anthocyanins, flavonols, and stilbenoids alleviate inflammatory bowel disease symptoms in mice. **Frontiers in Nutrition**, v.4, n.75, 2018.

SCHIJLEN, E. *et al.* Pathway engineering for healthy phytochemicals leading to the production of novel flavonoids in tomato fruit. **Plant Biotechnology Journal**, v. 4, n. 4, p. 433-444, 2006.

SCHAEFER, H. M.; SCHAEFER, V.; LEVEY, D. J. How plant–animal interactions signal new insights in communication. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 19, n. 11, p. 577-584, 2004.

SCHREIBER, G. *et al.* ANTHOCYANIN1 from *Solanum chilense* is more efficient in accumulating anthocyanin metabolites than its *Solanum lycopersicum* counterpart in association with the ANTHOCYANIN FRUIT phenotype of tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 124, n. 2, p. 295-307, 2012.

SCHWAB, R. *et al.* Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. **Developmental Cell**, v. 8, n. 4, p. 517-527, 2005.

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

SHIN, D. H. *et al.* HY5 regulates anthocyanin biosynthesis by inducing the transcriptional activation of the MYB75/PAP1 transcription factor in *Arabidopsis*. **FEBS Letters**, v.587, n.10, p. 1543-1547, 2013.

STATISTICS DIVISION OF FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAOSTAT. **Agriculture Organization of the United Nations FAO statistical database.** Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em: 13 maio de 2021.

STRACKE, R. *et al.* The *Arabidopsis* bZIP transcription factor HY5 regulates expression of the PFG1/MYB12 gene in response to light and ultraviolet-B radiation. **Plant, Cell & Environment**, v. 33, n.1, p. 88-103, 2010.

SUN, C. *et al.* A transcriptional network promotes anthocyanin biosynthesis in tomato flesh. **Molecular Plant**, v.13, n.1, p. 42-58, 2020.

TALAR, U.; KIELBOWICZ-MATUK, A. Beyond Arabidopsis: BBX Regulators in Crop Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, n.6, p.2906, 2021.

TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. **The Plant Journal**. v. 54, p. 733–749, 2008.

TANAKA, Y. *et al.* Flower color modification by engineering of the flavonoid biosynthetic pathway: practical perspectives. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, p.1007282070-1007282070, 2010.

UBI, B. E. *et al.* Expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in apple skin: effect of UV-B and temperature. **Plant Science**, v.170, n.3, p. 571-578, 2006.

ULEBERG, E. *et al.* Effects of temperature and photoperiod on yield and chemical composition of northern and southern clones of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, n.42, p.10406-10414, 2012.

VERWEIJ, W. *et al.* Functionally similar WRKY proteins regulate vacuolar acidification in petunia and hair development in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v.28, n.3, p. 786-803, 2016.

YAN, S. *et al.* Anthocyanin Fruit encodes an R2R3-MYB transcription factor, SIAN2-like, activating the transcription of SIMYBATV to fine-tune anthocyanin content in tomato fruit. **New Phytologist**, v. 225, n. 5, p. 2048-2063, 2020.

YAO, F. *et al.* MicroRNAs and targets in senescent litchi fruit during ambient storage and post-cold storage shelf life. **BMC plant biology**, v.15, n. 1, p. 1-12, 2015.

YU, N. *et al.* Temporal control of trichome distribution by microRNA156-targeted SPL genes in Arabidopsis thaliana. **The Plant Cell**, v. 22, n. 7, p.2322-2335, 2010.

YUAN, Y. W. *et al.* Genetic dissection of a major anthocyanin QTL contributing to pollinator-mediated reproductive isolation between sister species of *Mimulus*. **Genetics**, v.194, n. 1, p. 255-263, 2013.

WAGNER, J. R. *et al.* A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome. **Nature**, v. 438, n. 7066, p. 325-331, 2005.

WANG, J. W.; CZECH, B.; WEIGEL, D. miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in Arabidopsis thaliana. **Cell**, v. 138, n. 4, p. 738-749, 2009.

WANG, S. Y.; CHEN, C. T.; WANG, C. Y. The influence of light and maturity on fruit quality and flavonoid content of red raspberries. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 676-684, 2009.

WANG, Y. *et al.* S. UV-A light induces anthocyanin biosynthesis in a manner distinct from synergistic blue+ UV-B light and UV-A/blue light responses in different parts of the hypocotyls in turnip seedlings. **Plant and Cell Physiology**, v.53, n. 8, p.1470-1480, 2012.

WEI, Y. Z. *et al.* Differential expression of anthocyanin biosynthetic genes in relation to anthocyanin accumulation in the pericarp of Litchi chinensis Sonn. **PloS One**, v. 6, n. 4, p. 19-455, 2011.

WELLER, J. L. *et al.* Physiological interactions of phytochromes A, B1 and B2 in the control of development in tomato. **The Plant Journal**, v.24, n.3, p. 345-356, 2000.

WIMALANATHAN, K.; LAWRENCE-DILL, C. J. Gene Ontology Meta Annotator for Plants (GOMAP). **Plant Methods**, v.17, n.1, p.1-14, 2021.

ZHANG, Y. *et al.* Multi-level engineering facilitates the production of phenylpropanoid compounds in tomato. **Nature Communications**. 2015.

ZHANG, B. *et al.* Evolutionary comparison of competitive protein-complex formation of MYB, bHLH, and WDR proteins in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 12, p. 3197-3209, 2019.

ZHAO, P. *et al.* Genome-wide identification and characterization of R2R3MYB family in *Solanum lycopersicum*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 289, n. 6, p.1183-1207, 2014.

ZHENG, Y. *et al.* Anthocyanin profile and gene expression in berry skin of two red *Vitis vinifera* grape cultivars that are sunlight dependent versus sunlight independent. **Australian Journal of Grape and Wine Research** v.19, p. 238-248, 2013.

ZHOU, Y. *et al.* Transcriptome analysis and transient transformation suggest an ancient duplicated MYB transcription factor as a candidate gene for leaf red coloration in peach. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p.1-13, 2014.

ZHU, D. *et al.* Biochemical characterization of Arabidopsis complexes containing CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1 and SUPPRESSOR OF PHYA proteins in light control of plant development. **The Plant Cell**, v. 20, n.9, p. 2307-2323, 2008.

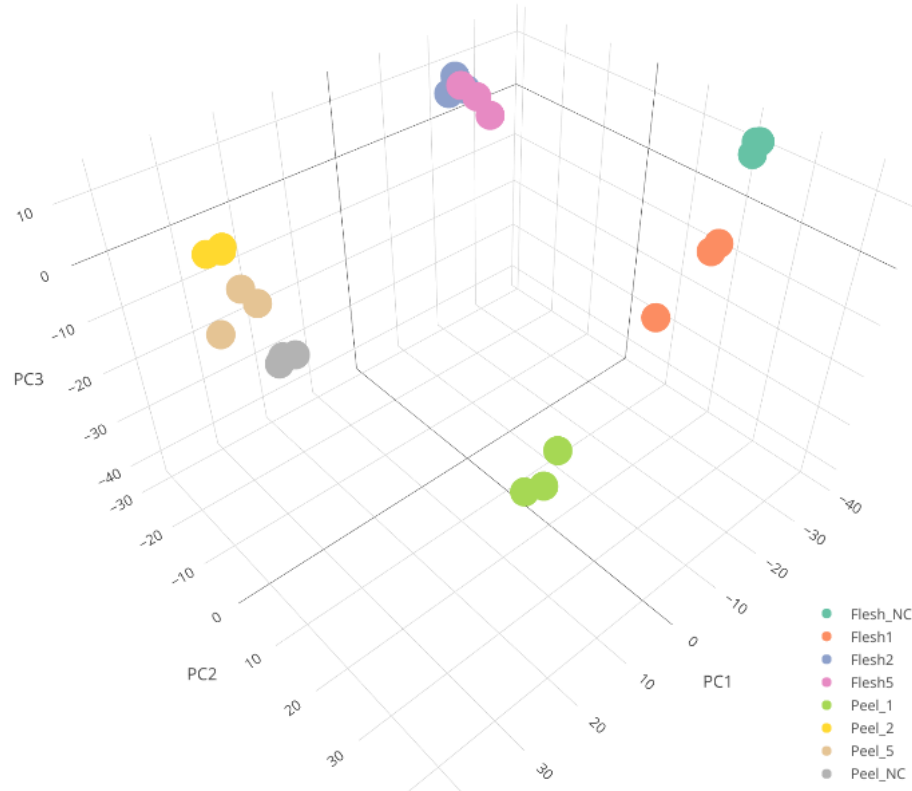
ZHU, H. F. *et al.* CPC, a single-repeat R3 MYB, is a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis. **Molecular Plant**, v. 2, n. 4, p. 790-802, 2009.

ZORATTI, L. *et al.* Monochromatic light increases anthocyanin content during fruit development in bilberry. **BMC Plant Biology**, v. 14, n.1, p. 1-10, 2014.

ZULUAGA, D. L. *et al.* *Arabidopsis thaliana* MYB75/PAP1 transcription factor induces anthocyanin production in transgenic tomato plants. **Functional Plant Biology**, v. 35, n. 7, p. 606-618, 2008.

APÊNDICE A - Dados suplementares

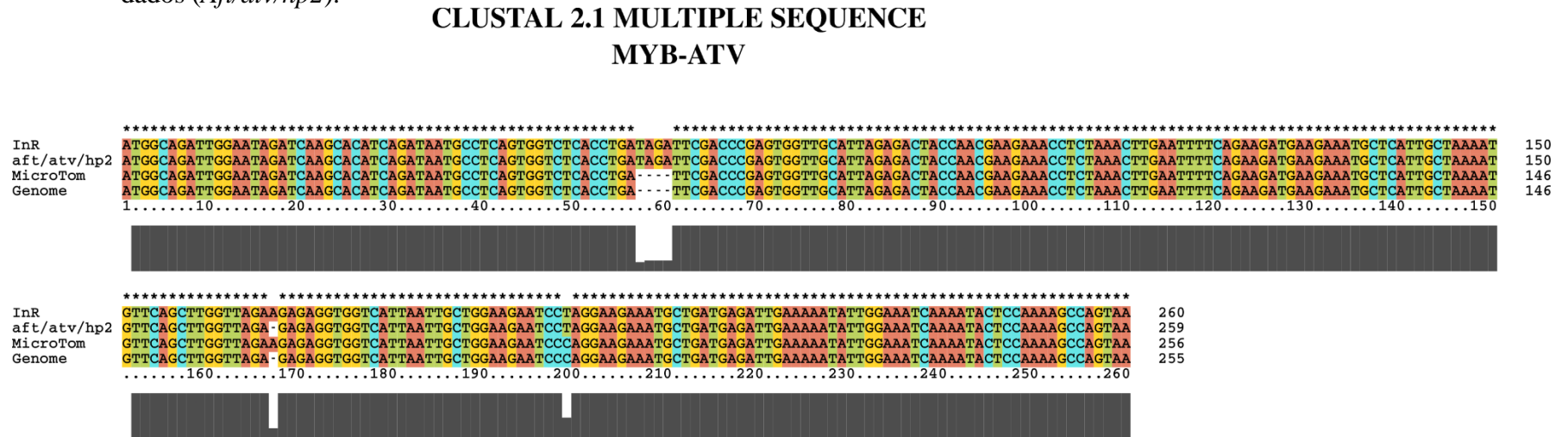
Figura S1 - Gráfico de controle de qualidade das bibliotecas de mRNA-seq por análise de componentes principais baseada nos valores expressão.



Legenda: Peel (epicarpo); Flesh (mesocarpo).

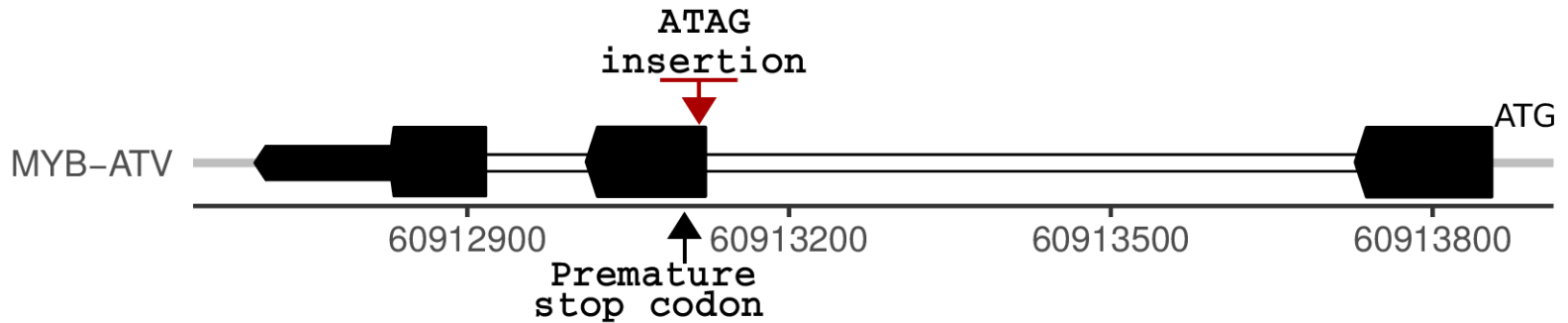
Fonte: Da autora (2021).

Figura S2 - Alinhamento global de transcritos MYB-ATV de cultivares Indigo Rose (InR), Micro-Tom, genoma (Heinz) e isolados de nossos dados (*Aft/atv/hp2*).



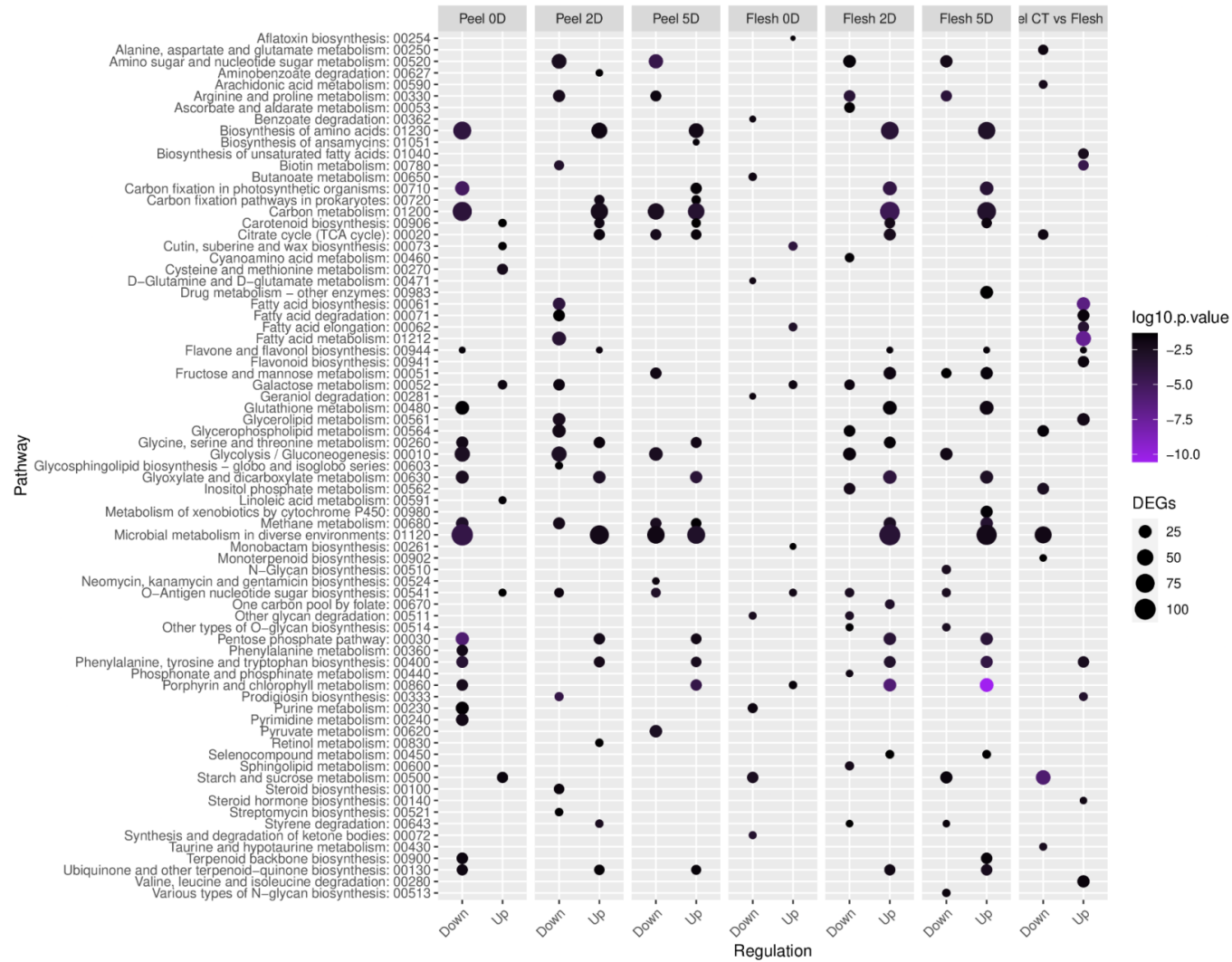
Fonte: Da autora (2021).

Figura S3 - Representação esquemática da mutação do gene MYB-ATV para o triplo mutante *Aft/atv/hp2*.



Fonte: Da autora (2021).

Figura S4 - Vias metabólicas enriquecidas para os diferentes perfis de expressão diferencial.



Legenda: Peel (epicarpo); Flesh (mesocarpo).

Fonte: Da autora (2021).

Tabela S1 - Sumário de limpeza, mapeamento e contagem das *reads* sobre o genoma de referência do tomate.

Libraries	Trimmomatic (trimming)			STAR (mapping)			featureCounts (counting)	
	Input	Output (#)	Output (%)	Input	Output (#)	Output (%)	Counted (#)	Counted (%)
Peel 0 - 1	24625955	23817678	96.72	23817678	22582991	94.82	20940821	92.73
Peel 0 - 2	23224760	22366775	96.31	22366775	21077019	94.23	19488346	92.46
Peel 0 - 3	22443390	21626959	96.36	21626959	19913393	92.08	18412051	92.46
Peel 2 - 1	25618472	25020119	97.66	25020119	23621843	94.41	21871092	92.59
Peel 2 - 2	25093982	24508653	97.67	24508653	23042693	94.02	21314132	92.50
Peel 2 - 3	24078770	23570852	97.89	23570852	22207057	94.21	20568018	92.62
Peel 5 - 1	24539050	23583511	96.11	23583511	21776141	92.34	20130065	92.44
Peel 5 - 2	24495128	23863556	97.42	23863556	22362398	93.71	20718849	92.654
Peel 5 - 3	25070292	24231332	96.65	24231332	22831826	94.22	21128384	92.54
Peel NC - 1	22232531	21633800	97.31	21633800	20052321	92.69	18618384	92.85
Peel NC - 2	25463534	24847731	97.58	24847731	23389404	94.13	21628368	92.47
Peel NC - 3	25894885	25281492	97.63	25281492	23604128	93.37	21853831	92.58
Flesh 0 - 1	22603705	22011011	97.38	22011011	20912399	95.01	19526720	93.37
Flesh 0 - 2	26846397	26279578	97.89	26279578	24875142	94.66	23158324	93.10
Flesh 0 - 3	27071532	26108777	96.44	26108777	24544548	94.01	22756149	92.71
Flesh 2 - 1	26124014	25178555	96.38	25178555	23666934	94.00	21904682	92.55
Flesh 2 - 2	23361163	22812397	97.65	22812397	21555841	94.49	20019109	92.87
Flesh 2 - 3	21756876	21013616	96.58	21013616	19860084	94.51	18402751	92.66
Flesh 5 - 1	25475415	24748880	97.15	24748880	23318164	94.22	21575300	92.53
Flesh 5 - 2	22300613	21740871	97.49	21740871	20425694	93.95	18925789	92.66
Flesh 5 - 3	27339099	26663725	97.53	26663725	25045590	93.93	23197867	92.62
Flesh NC - 1	22854540	22214436	97.2	22214436	20874901	93.97	19397406	92.92
Flesh NC - 2	22138429	21324427	96.32	21324427	19901740	93.33	18465849	92.79
Flesh NC - 3	24969585	24375453	97.62	24375453	22974494	94.25	21355008	92.95
Average	24400921	23701007	97.12	23701008	22267364	93.94	20639887	92.69
Total	585622117	568824184						

Fonte: Da autora (2021).

Tabela S2 - Número de genes diferencialmente expressos por intervalo de log2FC.

Intervalo de log2FC	Controle							Dias			
	Epicarpo (dias)			Mesocarpo (dias)			Epi. vs meso.	Epicarpo (dias)		Mesocarpo (dias)	
	1	2	5	1	2	5		2 x 1	5 x 2	2 x 1	5 x 2
Up	2288	2813	1990	996	3024	2774	2783	3683	512	2798	519
>6	123	111	62	70	136	128	252	170	17	106	6
4~6	179	126	58	73	169	146	229	209	9	127	11
2~4	303	334	201	127	455	406	490	722	42	451	65
1~2	373	737	490	158	1009	898	647	1066	122	933	111
0~1	1310	1505	1179	568	1255	1196	1165	1516	322	1181	326
0~1	1000	1283	911	358	1398	1255	1316	1901	424	1694	384
-1~2	674	869	556	223	776	543	558	1038	192	610	144
-2~4	384	628	341	99	394	287	400	757	149	329	43
-4~6	120	179	73	25	76	59	250	285	52	122	16
<-6	93	87	29	21	37	19	511	163	18	63	5
Down	2271	3046	1910	726	2681	2163	3035	4144	835	2818	592
Total	4559	5859	3900	1722	5705	4937	5818	7827	1347	5616	1111

Fonte: Da autora (2021).

Tabela S3 - Expressão de genes de interesse referente a Figura 6.

Gene	Symbol	Average - log2(TPM)								Log2FC										
		Peel				Flesh				Peel CT			Flesh CT			Peel vs Flesh	Peel		Flesh	
		0	2	5	Control	0	2	5	Control	0	2	5	0	2	5		2 vs 0	5 vs 2	2 vs 0	5 vs 2
Solyc01g095640	SITRY	0.00	0.79	1.65	0.40	0.07	0.25	0.31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Solyc09g065100	SIAN1 AH	0.46	7.98	7.27	6.29	0.21	7.05	6.72	0.21	-7.72	1.75	1.05	0.00	10.02	9.66	9.10	9.47	0.00	9.89	0.00
Solyc10g086250	SIAN2	0.97	0.63	0.68	1.54	0.04	0.12	0.04	0.78	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-5.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Solyc10g086260	SIANT1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Solyc10g086270	SIANT1-like	0.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Solyc10g086290	SIAN2-like	7.96	10.89	11.09	10.63	6.29	10.50	10.29	8.23	-2.03	0.00	0.00	0.00	2.55	2.28	2.53	2.32	0.00	3.69	0.00
Solyc03g097340	SIAN11	6.35	9.57	8.40	7.63	6.18	7.94	7.98	6.43	-1.36	2.00	0.84	0.00	1.81	1.82	1.35	3.36	-0.56	1.95	0.00
Solyc08g081140	SIJAF13	4.47	4.80	4.45	4.21	4.51	5.50	4.53	4.33	0.00	0.66	0.00	0.00	1.50	0.46	0.00	0.48	0.00	1.18	-1.05
Solyc01g056340	SIDET1	2.21	1.97	2.23	1.95	2.03	2.05	1.92	2.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Solyc07g052490	SIMYB-ATV	0.63	8.78	7.67	5.24	0.00	8.08	7.08	0.62	-5.97	3.64	2.54	-4.63	9.35	8.25	6.24	9.61	0.61	13.98	-1.10
Solyc12g005795	SIMYB-ATV-like	0.18	4.83	4.97	4.29	0.00	0.98	3.46	0.00	-6.91	0.00	0.00	0.00	6.39	9.73	10.41	7.55	0.00	6.46	3.34
Solyc05g008250	SIMYBL2 SIMYB76	0.04	5.74	6.98	6.21	0.04	2.89	5.57	0.46	-11.19	0.00	0.00	0.00	4.40	7.24	7.59	10.77	0.00	8.15	2.84
Solyc06g065100	SIMYB3	5.33	5.74	5.80	5.59	3.85	4.42	4.29	4.34	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.56	0.00	0.00	0.00	0.00
Solyc01g111500	SIMYB7	2.40	4.34	3.93	3.13	2.70	4.21	3.57	2.13	0.00	1.23	0.00	0.00	2.61	1.90	1.46	2.32	0.00	1.80	0.00
Solyc10g055410	SIMYB32	5.55	8.11	7.24	6.97	4.22	6.50	6.01	4.52	0.00	0.00	0.00	0.00	2.24	1.67	2.58	2.22	0.00	2.16	0.00
Solyc03g120620	HBZIP (GLABRA)	3.02	7.62	6.38	6.56	3.23	5.84	5.47	4.22	-3.53	1.12	0.00	0.00	1.89	1.51	2.47	4.65	-0.58	2.89	0.00
Solyc10g084380	WRKY (TTG2)	1.21	8.29	7.09	6.15	0.29	5.10	5.18	0.65	-5.33	0.00	0.00	0.00	6.07	6.03	6.90	7.54	0.00	7.19	0.00
Solyc12g005950	SICOP1	4.52	4.44	4.48	4.16	4.51	3.96	4.19	4.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.43	0.00
Solyc05g014130	COP1	3.88	3.11	3.45	3.27	4.03	3.66	3.49	4.34	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.72	-1.08	-0.71	0.00	0.00	0.00
Solyc08g061130	SIHY5	5.70	3.74	3.05	4.21	4.67	3.98	2.17	2.78	2.03	0.00	0.00	2.54	1.58	0.00	1.70	-2.48	0.00	0.00	-2.14

Fonte: Da autora (2021).

Tabela S4 - Expressão dos genes pertencentes a via de biossíntese de antocianinas da Figura 7.

Symbol	Gene	Average - log ₂ (TPM)								Log ₂ FC											
		Peel				Flesh				Peel vs Flesh	Flesh CT			Peel CT			Flesh		Peel		
		0	2	5	Control	0	2	5	Control		0	2	5	0	2	5	2 vs 0	5 vs 2	2 vs 0	5 vs 2	
PAL5	Solyc09g007900	6.50	9.83	10.84	9.66	3.73	9.57	10.46	5.23	4.58	-1.43	4.63	5.52	-3.04	0.00	1.24	6.06	0.00	3.27	0.00	
C4H	Solyc05g047530	0.75	3.60	2.79	3.74	0.48	0.09	0.99	1.09	3.66	0.00	-3.81	0.00	-4.17	0.00	0.00	0.00	4.13	3.99	0.00	
4CL	Solyc06g068650	1.91	7.00	6.99	5.42	2.56	5.31	6.39	3.99	0.00	0.00	0.00	2.71	-3.27	0.00	0.00	2.51	0.00	4.89	0.00	
CHS1	Solyc09g091510	3.25	12.31	11.21	10.71	0.84	11.29	10.82	1.06	10.63	0.00	11.37	10.89	-7.43	1.64	0.00	11.77	0.00	9.06	0.00	
CHS2	Solyc05g053550	8.40	13.21	13.10	12.63	4.06	12.03	11.86	3.07	9.87	0.00	9.43	9.26	-2.96	0.00	0.00	6.36	0.00	3.59	0.00	
CHI	Solyc05g010320	2.87	8.79	7.67	6.19	3.61	8.59	9.14	4.02	2.35	0.00	4.96	5.43	-3.03	2.68	1.63	5.16	0.00	5.72	0.00	
CHI-LIKE	Solyc05g052240	4.46	10.93	10.40	9.20	1.84	9.42	9.65	2.03	7.58	0.00	8.01	8.20	-4.59	1.78	1.28	8.28	0.00	6.37	0.00	
F3H	Solyc02g083860	8.99	12.89	12.17	11.38	4.30	12.50	11.89	6.20	5.08	-1.75	6.34	5.75	-2.45	1.56	0.00	8.09	0.00	4.00	0.00	
F3'H	Solyc03g115220	3.55	7.97	7.46	5.73	1.65	5.27	3.05	2.00	4.29	0.00	3.94	2.03	-2.38	2.26	1.71	4.27	-1.91	4.63	0.00	
FLS	Solyc11g013110	9.03	9.58	9.38	9.66	4.30	7.41	5.48	6.48	3.31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.58	-1.88	0.00	0.00	
F3'5'H	Solyc11g066580	0.57	11.11	10.60	9.98	0.37	9.67	9.86	0.75	10.63	0.00	10.47	10.71	-11.06	1.18	0.00	11.59	0.00	12.23	0.00	
DFR	Solyc02g085020	1.24	12.39	11.65	10.72	0.79	11.81	11.44	1.85	9.47	-1.68	10.70	10.33	-10.35	1.72	1.02	12.39	0.00	12.07	0.00	
ANS	Solyc08g080040	2.84	12.73	11.87	10.74	2.77	12.59	12.03	3.44	7.57	0.00	9.56	9.01	-8.05	2.04	1.25	10.20	0.00	10.08	0.00	
3GT	Solyc10g083440	9.47	12.28	11.66	11.14	4.51	11.87	11.05	5.37	5.85	0.00	6.72	5.90	-1.75	1.19	0.00	7.14	0.00	2.94	0.00	
RT	Solyc09g059170	4.72	13.65	12.62	12.00	2.85	12.34	12.08	4.95	7.01	-2.13	7.50	7.26	-7.23	1.70	0.00	9.63	0.00	8.93	0.00	
AAC	Solyc12g088170	1.40	12.05	11.20	10.26	0.62	11.91	11.15	1.28	9.75	0.00	11.56	10.79	-9.44	1.85	0.00	12.89	0.00	11.28	0.00	
5GT	Solyc09g092500	7.71	5.99	6.27	5.29	7.45	8.32	7.91	6.47	0.00	0.00	2.23	0.00	2.91	0.00	0.00	0.00	0.00	-2.09	0.00	
GST	Solyc02g081340	1.19	12.45	11.92	11.25	1.06	12.18	11.58	1.74	10.02	0.00	11.10	10.51	-10.97	1.25	0.00	12.15	0.00	12.22	0.00	
PAT	Solyc03g025190	1.08	11.60	11.06	10.07	0.54	10.95	10.71	0.98	10.17	0.00	11.20	10.97	-9.92	1.58	1.09	12.15	0.00	11.51	0.00	
HCT	Solyc12g010980	0.51	1.89	0.32	0.13	0.41	0.48	1.44	0.86	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.05	0.00	0.00	0.00	2.88	-3.61	
C3'H	Solyc01g096670	2.36	6.97	6.12	5.65	1.79	6.96	6.49	3.34	2.41	-1.76	3.90	3.37	-3.59	1.41	0.00	5.66	0.00	4.99	0.00	
CCoAOMT	Solyc02g093270	5.15	6.77	6.33	6.29	3.89	4.91	5.89	5.86	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.62	0.00	

Fonte: Da autora (2021).

Tabela S5 - Expressão dos genes relacionados a percepção de luz em tomate, os fotorreceptores, Figura 8.

Gene	Symbol	Average - log2(TPM)								Log2FC											
		Peel				Flesh				Peel			Flesh			Peel vs Flesh	Flesh		Peel		
		0	2	5	Control	0	2	5	Control	0	2	5	0	2	5		2 vs 0	5 vs 2	2 vs 0	5 vs 2	
Solyc10g044670	SIPHYA	5.89	6.32	5.96	5.74	5.51	6.07	5.78	5.49	0.00	0.64	0.00	0.00	0.88	0.00	0.00	0.70	0.00	0.53	0.00	
Solyc01g059870	SIPHYB1	4.38	3.64	3.46	3.80	4.38	4.40	3.95	4.78	0.55	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.64	-0.91	0.00	-0.55	-0.66	0.00	
Solyc05g053410	SIPHYB2	5.12	3.35	3.77	4.64	4.90	3.86	4.19	6.29	0.00	-1.33	-0.89	-1.27	-2.22	-1.94	-1.58	-0.95	0.00	-1.74	0.00	
Solyc04g074180	SICRY1a	4.92	4.96	5.05	4.99	5.33	5.37	5.17	5.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
Solyc12g057040	SICRY1b	6.03	7.44	7.41	6.64	6.40	7.31	7.11	6.59	0.00	0.86	0.80	0.00	1.02	0.79	0.00	1.09	0.00	1.45	0.00	
Solyc09g090100	SICRY2	6.24	6.46	6.58	5.86	6.32	6.77	6.70	6.23	0.00	0.66	0.76	0.00	0.81	0.69	0.00	0.55	0.00	0.00	0.00	
Solyc08g074270	CRY3	2.14	4.62	3.94	3.75	1.92	4.49	3.16	2.69	-1.94	0.97	0.00	0.00	2.12	0.00	1.19	3.01	-1.39	2.91	0.00	
Solyc05g018630	SIUVR8	6.63	7.16	7.22	6.86	6.17	6.67	6.80	6.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.64	0.72	0.69	0.64	0.00	0.63	0.00	
Solyc12g042770	PIF1	4.84	6.61	7.16	6.68	6.29	7.07	7.74	6.82	-1.93	0.00	0.00	0.00	0.00	1.16	0.00	0.94	0.00	1.93	0.00	
Solyc01g102300	PIF3	7.05	6.90	7.43	6.83	6.80	5.89	6.67	6.55	0.00	0.00	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.80	0.74	0.00	0.00	
Solyc07g043580	PIF4	5.12	4.32	4.31	4.58	5.34	4.63	4.89	5.03	0.48	0.00	0.00	0.42	0.00	0.00	0.00	-0.55	0.00	-0.71	0.00	
Solyc09g063010	PIFa1	3.98	4.23	4.37	3.67	3.35	3.84	3.44	3.30	0.00	0.00	0.77	0.00	0.87	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
Solyc06g008030	PIFb1	4.93	3.88	4.66	4.52	3.99	2.20	3.50	3.70	0.00	0.00	0.00	0.00	-1.44	0.00	1.00	-1.89	1.45	-1.00	0.00	

Fonte: Da autora (2021).