



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EXPRESSÃO DE
FAMÍLIAS GÊNICAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO
DE SACAROSE EM FRUTOS DE TOMATEIRO SOB
DÉFICIT HÍDRICO**

ANA CLÁUDIA OLIVEIRA BARBOSA

ILHÉUS – BAHIA - BRASIL

Fevereiro de 2020

ANA CLÁUDIA OLIVEIRA BARBOSA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EXPRESSÃO DE
FAMÍLIAS GÊNICAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO
DE SACAROSE EM FRUTOS DE TOMATEIRO SOB
DÉFICIT HÍDRICO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual
de Santa Cruz, como parte das exigências para
obtenção do título de mestre em Genética e
Biologia Molecular.

ILHÉUS – BAHIA - BRASIL

Fevereiro de 2020

B238

Barbosa, Ana Claudia Oliveira.

Caracterização molecular e expressão de famílias gênicas envolvidas no metabolismo de sacarose em frutos de tomateiro sob déficit hídrico / Ana Claudia Oliveira Barbosa. – Ilhéus, BA: UESC, 2020.

ix,77 f. : il.; anexos.

Orientador: Márcio Gilberto Cardoso Costa.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

Inclui referências.

Genética vegetal. 2. Tomate – Melhoramento

genético. 3. Invertase. 4. Sacarose. 5. Açúcar – Inversão.

6. Expressão gênica. I. Título.

CDD 581.35

ANA CLÁUDIA OLVEIRA BARBOSA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EXPRESSÃO DE FAMÍLIAS
GÊNICAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DE SACAROSE
EM FRUTOS DE TOMATEIRO SOB DÉFICIT HÍDRICO

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de
Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção
do título de mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e melhoramento
vegetal

APROVADA: 27 de fevereiro de 2020

Prof^a Dr^a Martielly Santana dos Santos
(UESC)

Prof^a Dr^a Milena do Amaral Santos
(UESC)

Prof^a Dr^a Cláudia Fortes Ferreira
(EMBRAPA- CPMF)

Dr^o Márcio Gilberto Cardoso Costa
(Orientador - UESC)

ILHÉUS – BAHIA - BRASIL

Fevereiro de 2020

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não foi uma tarefa fácil, mas as pessoas que eu encontrei pelo caminho fizeram deste período muito prazeroso e cheio de afeto. Foram muitos os percalços, mas na vida quando existe apoio conseguimos construir e realizar objetivos, por isso tenho que agradecer por chegar até aqui.

Meus sinceros e eternos agradecimentos:

Ao povo brasileiro que custeou meus estudos em uma Universidade Pública e de qualidade desde a graduação até o presente momento na pós-graduação.

À FABESB por financiar minha trajetória de pesquisa durante a Iniciação Científica (IC).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante o mestrado.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGGBM) pela oportunidade e suporte.

Ao Centro de Biotecnologia em Genética (CBG), ao Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT) e Biologia Molecular (LBM) pelo espaço físico para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao meu orientador, Prof^o Márcio Gilberto Cardoso Costa, que, com carinho, apoio, cuidado, paciência, otimismo e humildade, guiou-me com seus ensinamentos durante o desenvolvimento da pesquisa. Gratidão por possibilitar todo o conhecimento teórico e prático que tive sob sua orientação, e, ao final, por segurar minha mão rumo à defesa.

À minha coorientadora, Dr^a Prof^a Luciana Rodrigues Camillo, pelos ensinamentos, colaboração, disponibilidade, pelas palavras de encorajamento e de empatia.

À Cláudia Fortes, minha orientadora da iniciação científica que foi e é meu referencial de pesquisadora, ensinando muito do que sou hoje como profissional e pessoa. Escolhi a genética e biologia molecular pela sua excelente orientação.

À toda a equipe do CBG. Aos técnicos, em especial a Flávio que sempre esteve disponível para me ajudar em diversos momentos, que com cuidado e presteza trouxe mais organização e alegria ao LCT.

Aos meus irmãos Cristiane, Rogério e Mônica por todo amor, apoio e carinho. Com vocês comigo a caminhada é mais leve! Obrigada por acreditar em mim em tantos momentos que nem eu pensei que fosse ser capaz... amo vocês de todo o meu ser!

Às lindas pessoas que conquistei durante essa etapa:

À Gláucia que foi meu presente nesse mestrado. No primeiro abraço, no primeiro sorriso não nos largamos mais. Grata pelo amor, afeto, carinho, paciência, pelos valiosos ensinamentos acadêmicos, pelas risadas, por fazer eu não desistir...Você é luz por onde passa e me iluminou nesses dois anos. Você é minha inspiração!

À Dilson que foi meu grande companheiro de experimento e de laboratório e eu o levarei para a vida! Obrigada meu amigo pelos ensinamentos científicos e de vida e pelas conversas infindáveis (um geminiano e uma leonina). Aprendi muito contigo! Obrigada por ter caminhado comigo nesses dois anos!

À Grazy pelo companheirismo, amizade, afeto, palavras de incentivo e abraços energizadores.

Aos amigos da vida, que estão comigo em toda e qualquer circunstância:

À Idália, Paulinho, Cátia, Andresa, Dalma, Vanessa, Diogo, Reiza e Lorena vocês são a família que eu escolhi. Obrigada por tudo sempre! Amo vocês e isso é para sempre...

Às leoninas Letícia e Ariana por te me acolhido de abraços abertos quando cheguei em Ilhéus. Gratidão!

Minha gratidão a todas mulheres que lutaram e possibilitaram que hoje pudéssemos fazer ciência.

E a todos e todas que não foram citados (as), mas que de alguma forma foram importantes para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos, e vos digo...

...sem vossas preciosas contribuições, mais difícil seria a superação desse importante desafio em minha vida.

Esse mestrado não é só meu, também é de vocês.

Gratidão!

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS	13
2.1 Geral	13
2.2 Específicos.....	13
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1 Aspectos gerais da cultura.....	14
3.2 Metabolismo da sacarose e o estresse hídrico	15
3.3 Déficit hídrico e o tomateiro.....	22
4. METODOLOGIA.....	26
4.1 Análises <i>in silico</i>	26
4.2 Material vegetal e condições experimentais.....	26
4.3 Análises químicas.....	27
4.4 Análises fisiológicas.....	27
4.5 Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)	28
4.6 Análises estatísticas.....	28
5. RESULTADOS.....	29
5.1 Identificação e caracterização molecular das famílias gênicas envolvidas no metabolismo da sacarose em tomateiro.....	29
5.1.1 Sacarose sintase - SUSY.....	29
5.1.2 Sacarose fosfato sintase – SPS.....	34
5.1.3 INVs neutras/alcalina – CIN.....	36
5.1.4 INVs ácidas – CWIN e VIN.....	38
5.2 Efeitos do déficit hídrico em caracteres da folha e do fruto.....	42
5.3 Caracterização transcricional das famílias gênicas envolvidas no metabolismo de sacarose em tomateiro.....	46
5.4 Cis-elementos regulatórios responsivos ao estresse hídrico presentes na região promotora das <i>SISUSYs</i> , <i>SISPSs</i> , <i>SICWINs</i> , <i>SIVINs</i> , <i>SICINs</i>	49
5.5 Potenciais sítios de fosforilação.....	50

6. DISCUSSÃO.....	52
7. CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
SUPPORTING INFORMATION.....	72

RESUMO

BARBOSA, Ana Cláudia Oliveira, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, Fevereiro de 2020. **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EXPRESSÃO DE FAMÍLIAS GÊNICAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DE SACAROSE EM FRUTOS DE TOMATEIRO SOB DÉFICIT HÍDRICO.** Orientador: Dr. Márcio Gilberto Cardoso Costa. Coorientador (a): Dra. Luciana Rodrigues Camillo.

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das principais hortaliças cultivadas no mundo e um modelo biológico para o desenvolvimento de frutos carnosos. Estudos recentes mostraram que o déficit hídrico contribui para o aumento da concentração de açúcares solúveis em frutos carnosos. Tal incremento pode ser resultante dos efeitos da desidratação, por exercer um efeito de concentração, do acúmulo ativo de solutos ou da quebra do amido, embora a causa exata ainda seja desconhecida. Dada a importância que as enzimas metabolizadoras de sacarose desempenham no metabolismo de açúcares em frutos de tomate, e dos efeitos pouco conhecidos do déficit hídrico sobre essas enzimas, o presente estudo teve como objetivo caracterizar, em nível molecular e transcricional, genes que codificam as principais enzimas metabolizadora de sacarose em frutos de tomate, sob déficit hídrico e identificar aqueles potencialmente envolvidos no acúmulo de sacarose induzida por seca e ABA em frutos. Para tanto, nesse trabalho, plantas de tomate foram submetidas a experimentos controle e de deficiência hídrica e foram caracterizados *in silico* 25 genes envolvidos no metabolismo da sacarose, distribuídos em cinco famílias, sendo sete genes da família *SISUSY*, quatro da *SISPS*, oito da *SICIN*, quatro da *SICWIN* e dois da *SIVIN*. As regiões promotoras dos genes apresentaram elementos *cis*-elementos regulatórios responsivos à luz, ABA (ABRE), etileno (ERE), seca (MBS) e estresse por baixa temperatura (LTR). A análise das sequências de aminoácidos indicou que as enzimas de sacarose em tomate variam de 57 a 119 KDa e são todas hidrofílicas. As proteínas apresentaram domínios e motivos conservados previamente caracterizados em outras espécies, indicando que são funcionais. As análises fisiológicas demonstraram diminuição significativa da taxa fotossintética (*A*), taxa transpiratória (*E*), condutância estomática (*gs*) e potencial hídrico foliar (Ψ_w) em plantas de tomate submetidas a deficiência hídrica. O Ψ_w do controle variou entre -0,1 à -0,3 MPa e o do déficit hídrico moderado variou entre -0,4 à -0,6 MPa. Os frutos, resultantes do déficit hídrico apresentaram maior conteúdo de sólidos solúveis totais (SSC; °Brix). Os dados de RNA-seq e PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) dos frutos indicaram que os genes do metabolismo da sacarose possuem uma expressão coordenada durante o desenvolvimento do fruto e responsividade à deficiência hídrica e ao ácido abscísico (ABA). Os genes codificadores de *SISPS*, *SISUSY* e *INVs* foram expressos principalmente na fase de amadurecimento do fruto, em condições irrigadas. Os genes *SISUSY1* e 4, *SICWIN2*, *SISPS1*, *SICIN3* e *SIVIN2* foram induzidos nos tratamentos por ABA e deficiência hídrica. Esses resultados possibilitam inferir que o déficit hídrico moderado influencia positivamente a expressão de genes da sacarose no fruto, contribuindo com incremento de açúcares. Desta forma, esses genes poderão ser utilizados como ponto de partida para futuros estudos visando a adaptação de frutos carnosos a restrição hídrica, contribuindo com a melhoria da qualidade do fruto.

Palavras-chave: Invertases; Sacarose sintase; Sacarose fosfato sintase; Melhoramento genético; Açúcares solúveis; *Solanum lycopersicum*. Qualidade de fruto.

ABSTRACT

BARBOSA, Ana Claudia Oliveira, M.S., Santa Cruz State University, Ilhéus-BA, February 2020. **MOLECULAR CHARACTERIZATION AND EXPRESSION OF GENE FAMILIES INVOLVED IN THE SUCROSE METABOLISM IN TOMATO FRUITS UNDER WATER DEFICIT.** Advisor: Dr. Márcio Gilberto Cardoso Costa. Co-Advisor: Dr. Luciana Rodrigues Camillo.

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the main vegetables grown in the world and a biological model for the development of fleshy fruits. Recent studies have shown that water deficit contributes to the increase in the concentration of soluble sugars in fleshy fruits. Such an increase may be due to the effects of dehydration, as it exerts a concentration effect, active accumulation of solutes or the breakdown of starch, although the exact cause is still unknown. Given the importance that sucrose-metabolizing enzymes play in the metabolism of sugars in tomato fruits, and the little-known effects of water deficit on these enzymes, the present study aimed to characterize, at the molecular and transcriptional levels, genes that encode the main sucrose metabolizing enzymes in tomato fruits and their responses to water deficit and to identify those potentially involved in the drought-induced accumulation of sucrose and ABA in fruits. Thus, tomato plants were subjected to control and water deficiency experiments and 25 genes were characterized *in silico*, distributed in five families: four genes from SISUSY, four from SISPS, eight from SICIN, four from SICWIN and two from SIVIN. The promoter regions of the genes showed *cis*-acting regulatory elements responsive to ABA (ABRE), ethylene (ERE), drought (MBS) and low temperature stress (LTR). Analysis of the amino acid sequences indicated that the sucrose enzymes in tomatoes vary from 57 to 119 KDa and are all hydrophilic. They presented conserved domains and motifs previously characterized in other plant species, indicating that they are functional. Physiological analyzes showed a significant decrease in the photosynthetic rate (*A*), transpiratory rate (*E*), stomatal conductance (*gs*) and leaf water potential (Ψ_w) in tomato plants subjected to water deficiency. The Ψ_w of the control plants varied between -0.1 to -0.3 MPa and that of the moderate water deficit varied between -0.4 to -0.6 MPa. Fruits from plants subjected to water deficit showed a higher content of total soluble solids (SSC; °Brix). RNA-seq data and real-time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis of the fruits indicated that the sucrose metabolism genes have a coordinated expression during fruit development and responsiveness to water deficiency and abscisic acid (ABA). The genes coding for SISPS, SISUSY and INVs were expressed mainly in the fruit ripening stage under irrigated conditions. SISUSY1 and 4, SICWIN2, SISPS1, SICIN3 and SIVIN2 genes were induced by ABA and water deficiency treatments. Collectively, these results indicate that the moderate water deficit positively influences the expression of sucrose metabolizing enzyme genes in the fruit, contributing to an increase in sugars. In this way, these genes can be used as a starting point for future studies aiming at the adaptation of fleshy fruits to water restriction, contributing to the improvement of the quality of the fruit.

Keywords: Invertases; Sucrose synthase; Sucrose phosphate synthase; Genetic improvement; Sugars; *Solanum lycopersicum* L. Fruit quality.

1. Introdução

O tomateiro é cultivado em regiões tropicais e subtropicais, destacando-se por ser a segunda hortaliça mais consumida em nível global. Atualmente a China lidera a produção mundial, seguida da Índia e Estados Unidos (FAOSTAT, 2017). No ranking mundial, o Brasil ocupa a nona posição e é o primeiro em produtividade na América Latina (IBGE, 2016). Além disso, o tomate é considerado um modelo biológico para desenvolvimento de frutos carnosos, principalmente por seu ciclo curto de geração, metodologia de transformação bem otimizada e disponibilidade de recursos genéticos e genômicos (BARONE et al, 2008; SANT'ANA e LEFSRUD, 2018).

Diante das consequências das mudanças climáticas em nível global, a agricultura tem enfrentado períodos cada vez mais longos e frequentes de seca. No futuro, espera-se que dentre os fatores de estresse abióticos, a diminuição da oferta de água exerça o impacto mais adverso sobre o crescimento e a produtividade de espécies vegetais. Os melhoristas precisarão adaptar as plantas cultivadas à menor disponibilidade hídrica e aproveitar os efeitos benéficos associados ao déficit hídrico (RIPOLL et al, 2014; RIPOLL et al, 2016). De acordo com estudos recentes, déficits hídricos controlados podem ser usados para manejar o sabor e a concentração de compostos envolvidos na qualidade dos frutos carnosos, por meio do acúmulo de compostos aromáticos e nutricionais (principalmente açúcares e antioxidantes), que aumentam as defesas das plantas (RIPOLL et al, 2014; RIPOLL, et al, 2016; ALBERT et al, 2016).

Na maioria das espécies vegetais, o carbono assimilado é transportado como sacarose (NGUYEN-QUOC; FOYER, 2001; DAHIYA et al, 2017). A sacarose constitui-se como um elemento essencial do ciclo de vida das plantas, sendo o principal produto da fotossíntese. Desempenha papel crucial no desenvolvimento, armazenamento, transdução de sinal e homeostase osmótica sob condições de estresse abiótico e produtividade, gerando uma variedade de açúcares para estimular o crescimento e sintetizar compostos essenciais e como sinais para regular fatores de transcrição e outros genes (RUAN et al, 2014; JIANG et al, 2015).

Durante seu metabolismo ocorre a atuação de pelo menos nove enzimas:frutoquinase, invertases, hexoquinase, fosfoglicomutase, fosfoglicose isomerase, sacarose sintase (SUSY), sacarose fosfato sintase (SPS), sacarose fosfato fosfatase (SPP) e UDP-glicose pirofosforilase (UGPase). Destas, as quatro últimas enzimas, estão mais envolvidas no processo de síntese do que degradação, quando

comparadas com as outras cinco enzimas (JIANG et al, 2015). Neste trabalho, estudaremos as enzimas SUSYs, as INVs ácidas e neutras e as SPSs, que estão envolvidas no processo de degradação e síntese, respectivamente.

A síntese, transporte, armazenamento e degradação da sacarose são etapas determinantes para alocação de biomassa e produtividade das culturas (BRAUN et al, 2014). A utilização da sacarose como fonte de carbono e energia depende da sua hidrólise em hexose. Nas plantas essa reação é catalisada reversivelmente pela SUSY (SUS; EC 2.4.1.13), produzindo UDP-glicose e frutose, e irreversivelmente pelas INVs (β -frutosidase; EC 3.2.1.26), produzindo glicose e frutose.

As INVs são classificadas de acordo com seu ponto isoelétrico, seu pH ótimo de atividade e sua localização celular. Com base no seu pH ótimo, as INVs são classificadas em dois grupos principais, INV ácida e neutra/alcalina (CIN). As invertases ácidas são ainda classificadas em INV vacuolar (VIN) e ligada à parede celular (CWIN), que pertencem a família da glycosyl hidrolase 32 (GH32), enquanto as CINs pertencem a família da glycosyl hidrolase 100 (GH100) (ROITSCH e GONZÁLEZ, 2004). As INVs desempenham papéis importantes na tolerância ao calor em órgãos reprodutores (LI et al, 2011) e na tolerância a altas temperaturas em frutos jovens (JUÁRES-COLUNGA et al, 2018). No entanto, evidências sugerem a importância dessas enzimas no desenvolvimento e respostas à estresses bióticos e abióticos em várias espécies vegetais, como *Arabidopsis thaliana* (XIANG et al, 2011) *Oryza sativa* (JIA et al, 2008) e *Lotus japonicus* (WELHAM et al, 2009).

A SUSY é uma enzima citosólica que é crucial para utilização da sacarose no desenvolvimento de frutos, existindo uma correlação entre a atividade dessa enzima, a taxa de crescimento e a quantidade de amido em frutos do tomateiro (NGUYEN-QUOC; FOYER, 2001). A SUSY já foi identificada e caracterizadas em várias espécies vegetais, incluindo *Arabidopsis thaliana* (BAUD et al, 2004), *Oryza sativa* (HIROSE et al, 2008), *Zea mays* (AN et al, 2014) e *Malus domestica* (TONG et al, 2017), e seus níveis de expressão demonstraram respostas à estresse salino, seca (ZHU et al, 2017), frio e luz (XIAO et al, 2014).

A SPS (SPS; EC 2.4.1.14) é uma enzima reguladora da biossíntese de sacarose e tem sido associada ao controle do crescimento e rendimento das culturas (CASTLEDEN et al, 2004). Sua atividade em milho (*Zea mays*) foi correlacionada como crescimento em plantas jovens, rendimento de matéria seca e rendimento de grãos (PRIOUL et al, 1999; BERTIN e GALLAIS, 2001). Em arroz (*Oryza sativa*), a atividade do gene *OsSPS1*

induziu a expansão foliar e a altura das plantas (SENEWEERA et al, 1995), enquanto que em cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) o acúmulo de sacarose nos caule foi dependente da atividade da SPS (ZHU et al, 1997).

O metabolismo da sacarose é altamente responsivo a sinalização ambiental e pode, por sua vez, influenciar a aclimação ao estresse, configurando-se como um protetor osmótico que auxilia na tolerância aos estresses abióticos (KOCH, 2004). O conteúdo de açúcares solúveis, incluindo sacarose, tem sido demonstrado aumentar em vários frutos carnosos sujeitos ao déficit hídrico, a depender do genótipo e do estágio de desenvolvimento do fruto (revisado por Ripoll et al, 2014), contribuindo para a tolerância do fruto à desidratação e melhoria de sua qualidade organoléptica. O que permanece pouco claro é se o aumento relatado no conteúdo de açúcares solúveis é devido a real estimulação da sua biossíntese ou, alternativamente, devido ao efeito de concentração baseado na redução do tamanho do fruto e conteúdo de água.

Apesar de estar bem documentado na literatura o importante papel que as enzimas metabolizadoras da sacarose desempenham no metabolismo de açúcares no fruto (revisado por Beckles et al, 2012), pouco é conhecido acerca dos efeitos do déficit hídrico sobre essas enzimas em órgãos drenos (Ripoll et al, 2014). Um aumento da atividade de SUSY foi observado em frutos de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osb.) sob estresse hídrico (Hockema e Etxeberria, 2001). Esse conhecimento poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias de melhoramento para o aumento da tolerância à seca e qualidade de frutos, de modo a melhorar a adaptação das plantas de frutos carnosos à baixa disponibilidade hídrica frente às mudanças climáticas. Portanto, a hipótese desse estudo é que existe uma correlação entre o acúmulo de sacarose, indução da expressão de genes envolvidos no metabolismo de sacarose e a regulação do potencial osmótico em frutos de tomate sob déficit hídrico, visto que a sacarose é um açúcar que tem um importante papel na osmoproteção dos componentes celulares.

2. Objetivo

2.1 Geral

Caracterizar, em nível molecular e transcricional, genes que codificam para as principais enzimas envolvidas no metabolismo da sacarose em frutos de tomate, visando compreender os efeitos do déficit hídrico sobre esses genes e identificar aqueles potencialmente envolvidos na acumulação de sacarose induzida por seca em frutos.

2.2 Específicos

Caracterizar *in silico* os genes pertencentes às famílias da sacarose sintase (SUSY), sacarose fosfato sintase (SPS), invertase da parede celular (CWIN), invertase vacuolar (VIN) e invertase citoplasmática (CIN);

Caracterizar os *cis*-elementos regulatórios das regiões promotoras;

Realizar análises fisiológicas e fenotipagem dos frutos, em plantas de tomate sob condições irrigadas e de deficiência hídrica;

Caracterizar a expressão de genes do metabolismo da sacarose em frutos de tomateiro sob condições irrigadas e de deficiência hídrica, e tratamento com ABA.

3. Revisão de literatura

3.1 Aspectos gerais da cultura do tomate

Difundido mundialmente, o tomateiro (*Solanum lycopersicum L.*) representa uma das culturas mais importante em nível global. Se desenvolve bem em climas tropicais de altitude, subtropical e temperado, permitindo seu cultivo nas diferentes regiões do mundo. O tomate não é apenas comercializado no mercado de produtos frescos, mas também é utilizado na indústria de processamento, como pastas, concentrado, suco e ketchup. Além de ser uma fonte de nutrientes importantes, como licopeno, β -caroteno e vitamina C, todos com contribuição positiva na saúde humana (HEUVELINK, 2018).

Segundo os dados da FAOSTAT (2018), a produção mundial de tomate foi de 182 milhões de toneladas em 2017. China, Índia e Turquia são os principais responsáveis pela produção mundial de 59, 20,7 e 12,7 milhões de toneladas, respectivamente. O Brasil encontra-se na nona posição mundial, com uma estimativa de 4,3 milhões de toneladas para o ano de 2017, o que representa crescimento de 6,1% em relação ao ano anterior (IBGE 2019). A produção nacional em 2018 foi de 4,5 milhões de toneladas, sendo o estado de Goiás o maior produtor, respondendo por 36,6% da produção nacional, seguido por São Paulo, com 19,8%, Minas Gerais com 12,6% e Bahia com 6,4% do total produzido, de acordo com a safra de 2018. Estima-se que em 2019 a produção de tomate na Bahia cresça cerca de 20%, representando um aumento de 45 mil toneladas (IBGE, 2019).

O tomateiro tem sua origem na região andina, desde o Equador e contemplando também porções do Peru e do Chile. O local de sua domesticação ainda é inconclusivo, existindo duas teorias a respeito: a mexicana e a peruana. Evidências moleculares e morfológicas indicam que a origem do tomateiro e a sua domesticação iniciou na região andina (hipótese peruana) e foi finalizada na Mesoamérica, seguida da sua introdução na Europa e depois se espalhou para as demais regiões do mundo (BLANCA et al., 2012, BERGOUNOUX, 2014, LIN et al., 2014).

Taxonomicamente o tomateiro pertence à classe Dicotyledoneae, ordem Tubiflorae e família Solanaceae. Considerada autógama, o tomateiro é uma planta herbácea com flores pequenas e inflorescências geralmente curtas. Os segmentos da corola são de coloração pálida, anteras curtas e a superfície do seu estigma não é projetada para muito além da ponta do cone de anteras, contribuindo para seu alto nível de

autopolinização (BEDINGER et al., 2010). Comporta-se como uma planta anual mesmo sendo considerada uma planta perene: do início (semeadura) ao fim do ciclo (produção de novas sementes), com uma duração de 4 a 7 meses, contando com 1 a 3 meses de colheita, podendo esse ciclo estender-se em casa de vegetação (FILGUEIRA, 2011). As espécies silvestres ancestrais do tomateiro (*S. lycopersicum*) fornecem uma grande diversidade de sistemas de cruzamento e biologia reprodutiva, o que sugere que algumas dessas espécies apresentem uma taxa de fecundação cruzada mais elevada (RICK, 1988).

O tomate é considerado um modelo biológico para o desenvolvimento de frutos carnosos. Isso se deve a possibilidade de cultivo em diferentes condições, permitindo a compreensão de sua adaptabilidade à diferentes estresses abióticos (frio, seca, temperatura, salino etc.). Apresenta também um ciclo de geração relativamente curto, com produção de frutos em um pequeno período, alta fertilidade e tolerância por endogamia. Possui uma metodologia de transformação genética bem conhecida. Seu genoma é relativamente pequeno, compreendendo 12 pares de cromossomos com um tamanho total de 950 Mb e um total estimado de aproximadamente 35.000 genes (Tomato Genome Consortium, 2012, BERGOUGNOUX, 2014). Dentre outros organismos modelo, como *Arabidopsis*, milho e arroz, o tomate se destaca devido à distância filogenética desses organismos e por possuir características morfológicas específicas que não são compartilhadas com outras plantas modelo, como a presença de frutos carnosos (LOZANO et al., 2009).

O desenvolvimento do fruto de tomate inicia-se após a fertilização e o processo é marcado por diversas alterações na estrutura do fruto. Após a fertilização, dá-se início a um processo de intensa divisão celular que dura aproximadamente 14 dias, levando a um aumento considerável nas células de pericarpo. Após esse período, a divisão celular diminui rapidamente e se inicia a etapa de expansão celular, que ocorre em torno de 12 a 30 dias após a fertilização e que confere um aumento no tamanho de fruto. No estágio de Verde-Maduro (MG- mature green) o fruto se encontra totalmente expandido e com as sementes maduras e coloração verde. Após esse estágio, inicia-se o amadurecimento do fruto, que é a fase final do seu desenvolvimento. O amadurecimento começa no estágio de Breaker (BR), em que há uma série de alterações metabólicas, sendo que, o processo que caracteriza esse estágio é a conversão de cloroplastos em cromoplastos, causando mudanças na coloração do fruto de verde para amarelo-alaranjado. O estágio final do amadurecimento é chamado de Vermelho-Maduro (RR – red ripe) (GIOVANNONI, 2004; PESARESI et al., 2014).

3.2 Metabolismo da sacarose e o estresse hídrico

A sacarose é um elemento essencial do ciclo de vida das plantas, produzida principalmente pela fotossíntese e exportada para os demais órgãos, onde serve como fonte de energia para várias vias metabólicas (LUNN e MACRAE, 2003). Durante os estresses abióticos, como frio, seca e alta salinidade, a acumulação de sacarose favorece a estabilidade de membranas e proteínas nas células vegetais. Além disso, a sacarose fornece energia para sustentar o metabolismo quando as plantas se recuperam desses estresses (STRAND et al., 2003).

A sacarose também participa de vários processos fundamentais, como divisão celular, indução de floração, diferenciação de tecido vascular, germinação de sementes, transdução de sinal, e aclimação às tensões ambientais nas plantas, gerando açúcares como metabólitos que estimulam o crescimento e que atuam como precursores de compostos essenciais, incluindo proteína, celulose e amido (KOCH, 2004, JIANG et al., 2015, DAHIYA et al., 2017). A sacarose é altamente responsiva à sinalização ambiental e pode, por sua vez, influenciar o desenvolvimento das plantas e aclimação ao estresse, apresentando papel importante na osmorregulação, contribuindo para o aumento da tolerância à estresses abióticos (KOCH, 2004).

Resumidamente, o metabolismo da sacarose se inicia nos cloroplastos a partir da produção das trioses fosfato (Triose-P) pelo ciclo de Calvin-Benson, que são transportadas para o citoplasma, a partir do qual são sintetizados Frutose 6-fosfato. Os produtos são utilizados para produzir glicose 6-fosfato e subsequentemente glicose 1-fosfato por ação da fosfoglicose isomerase e fosfoglicomutase, respectivamente. A UDP-glicose pirofosforilase (UDPGP) é utilizada para catalisar glicose 1-fosfato em UDP-glicose, a partir da qual a sacarose 6-fosfato é produzida pela sacarose fosfato sintase (SPS). Finalmente, a sacarose é sintetizada a partir de sacarose 6-fosfato por ação da sacarose fosfato fosfatase (SPP). Por outro lado, a sacarose também é degradada pela sacarose sintase (SuSy) ou invertase. Sob SuSy, a sacarose é degradada em UDP-glicose e frutose, que é uma reação reversível. Sob a invertase, a sacarose é invertida em frutose e glicose. A frutose é usada para sintetizar frutose 6-fosfato por meio da frutoquinase e a glicose é convertida em glicose 6-fosfato de sob ação da hexoquinase (Figura 1).

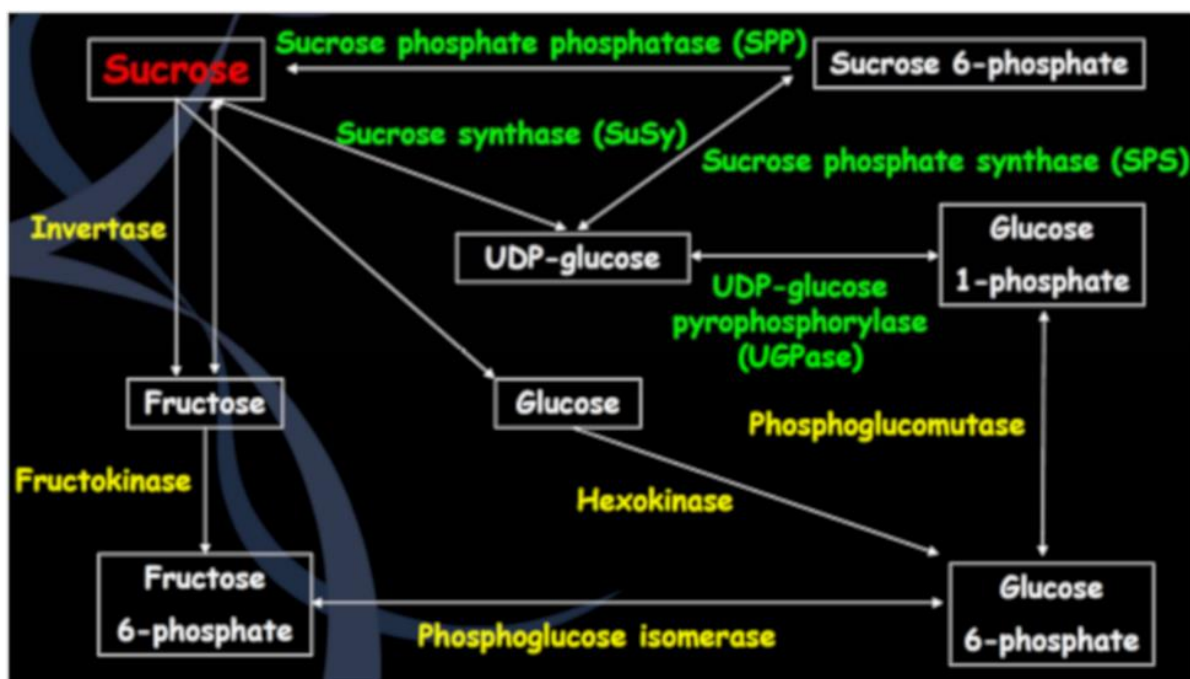


Figura 1: Representação esquemática do metabolismo da sacarose (JIANG et al., 2015). Sucrose (sacarose); Fructose (frutose); Fructose-6-phosphate (frutose-6-fosfato); Fructokinase (frutoquinase); Phosphoglucose isomerase (fosfoglicose isomerase); Hexokinase (hexoquinase); UDP-glucose (Uridina difosfato-glicose); UDP-glucose pyrophosphorylase (Uridina difosfato-pirofosforilase); Phosphoglucomutase (fosfoglucomutase); Phosphoglucose isomerase (fosfoglicose isomerase); Glucose 6-phosphate (glicose-6-fosfato); Glucose 1-phosphate (glicose 1-fosfato); Sucrose 6-phosphate (sacarose 6-fosfato); Sucrose phosphate phosphatase (SPP) (sacarose fosfato fosfatase); Sucrose synthase (SuSy) (sacarose sintase)

Açúcares tais como glicose, frutose e sacarose servem como reservas de energia e fornecem esqueletos de carbono para reações metabólicas. Estudos mostram que em condições de deficiência hídrica ocorre um aumento da atividade das INVs, o que propicia aumento no conteúdo de glicose e frutose e, a redução no teor de sacarose, devido a sua degradação pela ação das invertases (WAN et al., 2018). As flutuações nos níveis de açúcar envolvem a expressão diferencial de várias proteínas específicas relacionadas ao metabolismo de carboidratos sob deficiência hídrica (Wingler et al., 2000). Com isso, um metabolismo eficiente de carboidratos constitui uma das bases estratégicas para a sobrevivência das plantas, sujeitas à diversos estresses ambientais.

As INVs são classificadas em duas subfamílias de acordo com a solubilidade, localização celular, ponto isoelétrico e pH ótimo e inclui três classes: invertases citoplasmáticas (CINs), também chamadas de invertases neutras/alcalinas, e as invertases ácidas, localizadas na parede celular (CWINs) e no vacúolo (VINs) (WAN et al., 2018). A clivagem da sacarose em glicose e frutose representa um aumento expressivo na pressão osmótica celular, sugerindo que as invertases têm papel importante na expansão celular, no desenvolvimento, produtividade, bem como na resposta das plantas a vários estresses abióticos e bióticos (RUAN, 2014, QIAN et al., 2016). Estudos evolutivos, funcionais e de expressão, referentes às famílias gênicas das INVs, foram realizados em diversas plantas como *Arabidopsis* (NONIS et al., 2008), arroz (JI et al., 2005), maçã (HYN et al., 2011), mandioca (YAO et al., 2015), uva (NONIS et al., 2008), milho (JUÁREZ-COLUNGA et al., 2018), pimenta (SHEN et al., 2018) e tomate (GODT e ROISTCH, 1997), demonstrando que as INVs atuam em diversos processos essenciais para a sobrevivência e desenvolvimento das plantas.

As INVs também participam das fases de desenvolvimento reprodutivo das plantas como floração, desenvolvimento de frutos e germinação das sementes. LI et al (2011) sugeriu que as CWINs desempenham papéis importantes na tolerância ao calor nos órgãos reprodutores do tomate, enquanto as VINs podem contribuir para tolerância a alta temperatura em frutos jovens. Sob deficiência hídrica, a atividade da VINs e CWINs torna-se muito baixa nos ovários de milho, quando comparados com os controles bem hidratados. Isso ocasiona o aborto severo dos ovários, ativando a expressão de genes responsáveis pela morte celular programada (PCD). Em folhas maduras de milho sob estresse hídrico, ocorre a indução da atividade das VINs, resultante do acúmulo de hexoses (glicose e frutose). Esses resultados abordam a ocorrência de uma resposta específica das INVs em órgãos e tecidos, quando submetidas à estresses abióticos (MCLAUGHLIN e BOYER, 2004, JUÁREZ-COLUNGA et al., 2018).

As CINs têm localizações subcelulares diferentes, como citosol, mitocôndrias, cloroplasto e núcleo. Apresentam papel importante na respiração, no estresse oxidativo e na regulação da expressão de genes por açúcares (MARTIN et al., 2013). Ainda são restritos os estudos das respostas das CINs frente à estresses bióticos e abióticos. As hexoses geradas pela atividade das INVs, apresentam destinos e funções diferentes, como mostrado na Figura 2.

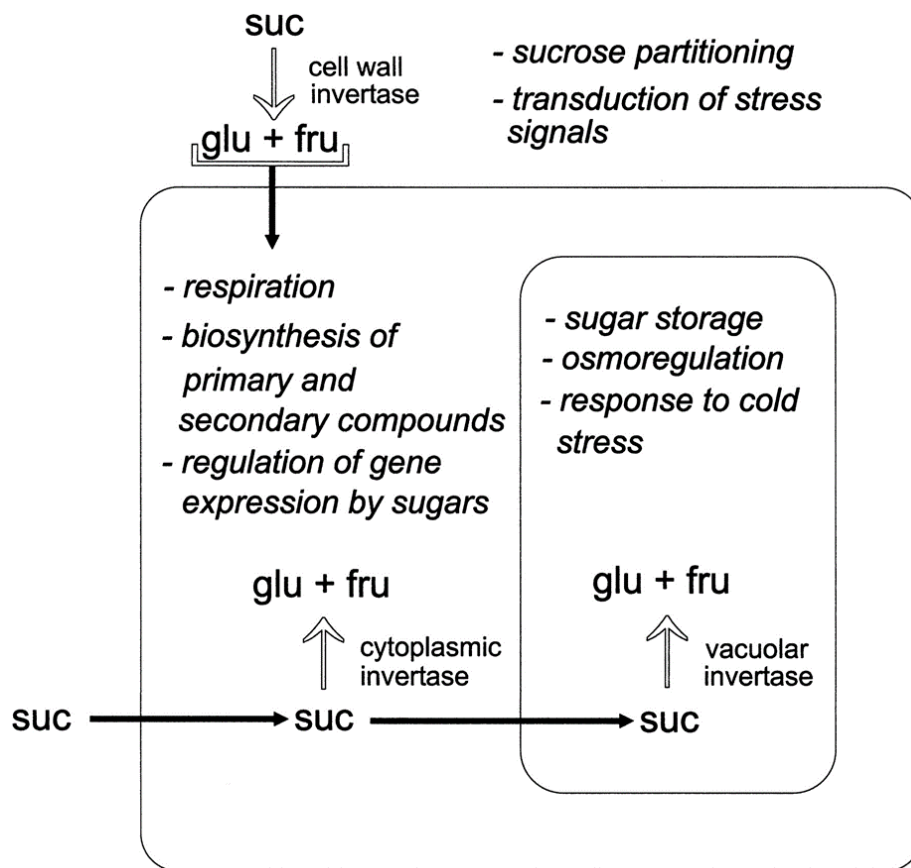


Figura 2: Localização subcelular e funções das invertases em plantas. Fonte: STURM, 1999.

Estudos com ênfase na redução da atividade da invertase observaram a conversão do armazenamento de hexose em sacarose, demonstrando que em frutos de tomate as INVs controlam a composição de açúcar (QIAN et al., 2016). Conclusões semelhantes foram tiradas de um estudo de acúmulo de açúcar durante o estresse por frio, em tubérculos de batata (ZRENNER et al., 1996). Assim, as INVs funcionam nesse processo como um regulador da composição do açúcar sob estresses abióticos.

A sacarose sintase (SUSY) é uma das principais enzimas que regulam o metabolismo da sacarose em plantas. Catalisa a reação reversível de sacarose em glicose difosfato de uridina (UDP-glicose) e frutose e, está envolvida no processo de síntese e degradação da sacarose. A SUSY é frequentemente descrita como uma enzima citoplasmática, embora também esteja associada à membrana plasmática. A forma citosólica degrada a sacarose e fornece carbono para respiração e síntese de polissacarídeos da parede celular, enquanto a forma associada à membrana plasmática pode direcionar o carbono da sacarose para a celulose (WANG et al., 2018). Essas

enzimas apresentam grande importância em diversos processos metabólicos como, distribuição de sacarose, biossíntese de amido, síntese de celulose na parede celular e respostas a estresses abióticos (ZHU et al., 2017).

Com o sequenciamento do genoma de várias espécies vegetais, membros da família gênica da *susy* foram identificados e caracterizados em várias culturas. Em *Arabidopsis* foram identificados e caracterizados seis genes (*AtSUS*) (BAUD et al. 2004), seis genes também em *Oryza sativa* (*OsSUS1*) (HIROSE et al., 2008), cinco genes em *Zea mays*, 15 genes em *Populus trichocarpa* (AN et al. 2014), 11 genes em *Malus domestica* (*MdSUSs*) (TONG et al., 2017) e sete genes em *Solanum lycopersicum* (GODT; ROITSCH, 1997).

Os níveis de expressão dos genes da *susy* em *Arabidopsis* (*AtSS1*) (BAUD et al., 2004), cevada (*HvSS1* e *HvSS3*) (BARRERO et al. 2011) e seringueira (*HbSS5*) (XIAO et al. 2014) foram aumentados por tratamento com frio e seca, respondendo significativamente a baixas temperaturas e a tensões provenientes do déficit hídrico. Em folhas de uva, os membros *VvSS3* e *VvSS5* da família *SUS* foram mais expressos em estresse salino e no escuro, enquanto os membros *VvSS1* e o *VvSS4* tiveram uma expressão positiva sob estresse hídrico (ZHU et al. 2017).

Em pepino, a superexpressão da sacarose sintase 4 (*CsSUS4*) resultou em maior teor de açúcares, flores e frutos. Esses resultados demonstram que a *CsSUS4* desempenha papéis importantes no crescimento e desenvolvimento de flores e frutos de pepino (FAN et al. 2018). Em tomate, a regulação positiva da atividade da *SUSY* influenciou o desenvolvimento do fruto, afetando seu tamanho final. A *sacarose sintase 3* (*SlSUSY3*) apresentou regulação positiva nas raízes e a *SlSUSY1* foi expressa mais fortemente no estágio de fixação de frutos, além de ser expressa nos tecidos vasculares (SUN et al. 1992; GOREN et al. 2011). Em tabaco (*Nicotiana tabacum*), a regulação positiva dos genes *SUSY* aumentou o rendimento total de biomassa e de celulose, sem afetar a porcentagem de celulose na biomassa (COLEMAN et al. 2006).

A SPS está correlacionada com o acúmulo de sacarose, crescimento e desenvolvimento das plantas e desempenha um papel importante na tolerância aos estresses ambientais (LUNN; MACRAE, 2003). A sua expressão gênica é responsiva ao estresse por luz e ao estresse osmótico. Na folha de espinafre foi encontrado três sítios de fosforilação: Ser₁₅₈, Ser₂₂₉ e Ser₄₂₄, envolvidos na regulação da luz/escurecimento, e na ativação do estresse osmótico (WINTER e HUBER, 2000). Na folha de milho, a Ser₁₆₂ das SPSs está envolvida na regulação clara/escuro (WINTER e HUBER, 2000).

Os genes que codificam as enzimas SPS também podem ser regulados em nível transcricional durante o desenvolvimento das plantas. Como observado no aumento dos transcritos *SPS* durante o desenvolvimento de folhas de arroz (MARTÍNEZ et al., 2004) e em frutas de tangerina (KOMATSU et al., 1996), banana (NASCIMENTO et al., 1997) e kiwi (LANGENKÄMPER et al., 1998).

3.3 Déficit hídrico e o tomateiro

Os frutos carnosos, como o tomate, são os alimentos economicamente mais importantes do mundo depois dos cereais e representam ingredientes chave para uma dieta saudável devido ao seu alto teor de fitonutrientes, vitaminas e antioxidantes. O consumo de frutas de alta qualidade cresce progressivamente e com isso exige dos pesquisadores esforços contínuos no melhoramento das variedades (RIPOLL et al. 2014).

Por serem organismos sésseis, durante o seu desenvolvimento, as plantas estão sujeitas a condições bióticas e abióticas desfavoráveis, das quais o déficit hídrico é o mais prejudicial, limitando o crescimento, produtividade e o rendimento das culturas (ÇELIK et al. 2017). O tomateiro apresenta suscetibilidade a várias condições de estresse abiótico, especialmente a seca e as altas temperaturas, limitando o desenvolvimento das variedades consideravelmente, tornando-se imprescindível o estudo das respostas fisiológicas e moleculares da cultura quando submetida à essas condições, visando avaliar e melhorar essas características nas variedades existentes (ÇELIK et al. 2017).

A demanda pelo consumo de vegetais cresce em nível global. Com isso, seu cultivo aumentou, principalmente nas regiões áridas e semiáridas, em que a escassez de água é frequente. Como consequência do déficit hídrico ocorre redução do tamanho das plantas e da área foliar, diminuição da condutância estomática foliar, expansão do sistema radicular para aquisição de água e nutrientes, inibição da fotossíntese, redução da transpiração, melhor osmorregulação, maior atividade antioxidante estimulada pelo estresse oxidativo, aumento do movimento do ABA no xilema em resposta ao fechamento estomático devido a restrição hídrica e diminuição do potencial hídrico foliar (WANG e FREI et al. 2011, NORA et al. 2012, KUMAR et al. 2017, KHAPTE et al. 2019) (Figura 3).

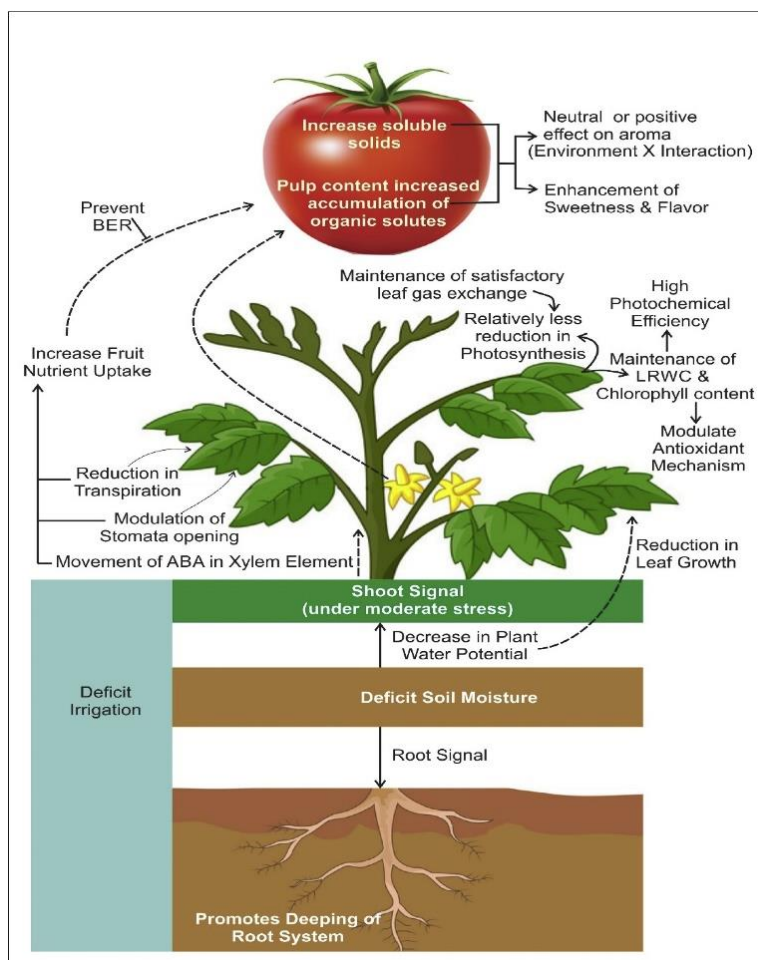


Figura 3: Resposta fisiológica causada pelo déficit hídrico em frutos de tomate. Fonte: KHAPTE et al. (2019).

Wang e Frei (2011) descreveram padrões de resposta na qualidade dos frutos à vários estressores abióticos, como aumento no valor nutricional, mas perda no sabor. Assim, sugere-se que o equilíbrio esperado entre rendimento e qualidade da colheita possam ser alcançados sob condições controladas de déficit hídrico, desde que se tenha acesso a informações não apenas relacionadas à produtividade, mas também à qualidade do fruto.

Diante da redução da oferta de água acometida por longos períodos de estiagem, pesquisadores estão em busca de estratégias que eleve a eficiência no uso da água (WUE), a fim de alcançar um equilíbrio satisfatório entre produção, qualidade e o uso da água (COSTA et al, 2007; RIPOLL, et al 2014; KUMAR et al, 2017). Com o objetivo de reduzir a quantidade de água utilizada durante o ciclo de vida do tomate, com perda mínima na qualidade dos frutos, tem sido utilizadas formas alternativas, como por exemplo, irrigação por déficit convencional (CDI), irrigação por déficit regulado (RDI) e

secagem parcial da zona radicular (PRD). Essas estratégias permitem que as plantas explorem mais efetivamente o solo com suas raízes, estimulando a produção do ácido abscísico (ABA), fitohormônio envolvido nas respostas ao estresse abiótico (KHAPTE, et al, 2019). Essas técnicas são promissoras, mas seus estudos são voltados para manutenção da produção, desconsiderando outras características com a qualidade dos frutos (RIPOLL et al., 2014).

O potencial impacto do déficit hídrico em fases específicas do desenvolvimento do fruto de tomate, e sua influência no tamanho do fruto, na concentração de sólidos solúveis totais (SSC), na acidez titulável (AT), na firmeza, nos aromas e na concentração de fitonutrientes, excluindo o estresse severo, foi sumarizado por Ripoll et al. (2014). Durante a divisão celular o déficit moderado pode influenciar na massa fresca e no incremento dos teores de açúcares (RIPOLL et al., 2014; KHAPTER et al., 2019), embora esse efeito nos frutos de tomates pareça depender das variações ano a ano. No período do endurecimento do endocarpo, o déficit hídrico pode aumentar a razão SSC/AT, sendo contrastante com a firmeza e o tamanho do fruto. Durante o crescimento do fruto, o déficit hídrico contribui para o aumento do conteúdo de açúcares solúveis e provoca redução do tamanho dos frutos. No estágio de amadurecimento ocorre o incremento de vitamina C, açúcares solúveis e ácidos orgânicos (RIPOLL et al., 2014); em contrapartida durante esse estágio o déficit hídrico pode afetar o crescimento dos frutos (KHAPTER et al., 2019) (Figura 4).

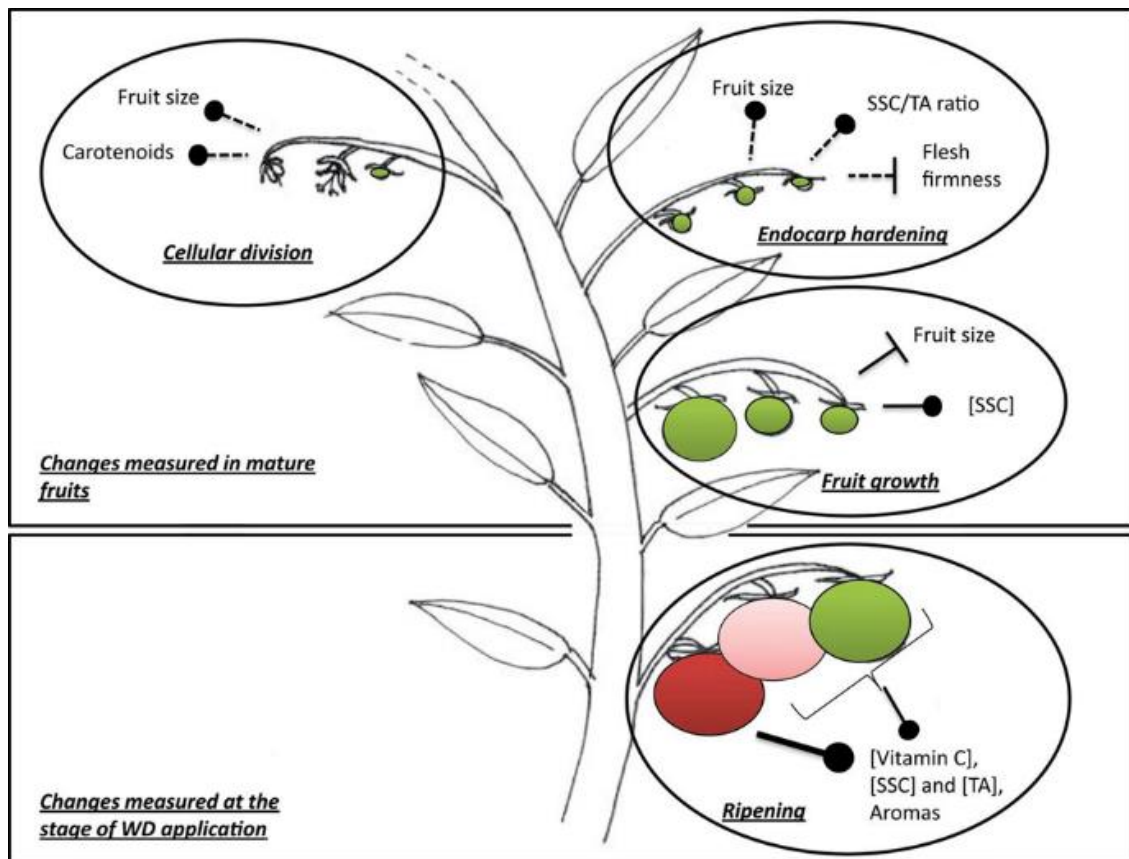


Figura 4: Efeito do déficit hídrico durante as diferentes fases do desenvolvimento dos frutos de tomate. Efeito estimulante é expresso por linhas que terminam em círculos; as linhas que terminam com barras expressam um efeito inibitório, enquanto as setas pontilhadas expressam efeitos hipotéticos ou dependentes do ano de aplicação do déficit hídrico (RIPOLL et al., 2014).

4. Metodologia

4.1 Análises *in silico*

Informações sobre as sequências de codificação (CDS), estrutura exon-ínton e sequências preditas de aminoácidos foram obtidas no banco de dados Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) e Sol genomics (<https://solgenomics.net/>). As estruturas exon / intron foram construídas usando o GSDS – Gene Structure Display Server 2.0 (GUO et al, 2007) (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>). As localizações físicas dos genes foram determinadas conforme anotação disponível no banco de dados genômicos de *S. lycopersicum* (<https://solgenomics.net/>) e o software MapChart (2.30) (<https://www.wur.nl/en/show/Mapchart-2.30.htm>) foi usado para plotar a localização dos genes nos respectivos cromossomos. Análise de *cis*-elementos regulatórios presentes na região promotora de 1500pb antes do sítio de início da transcrição gênica foi realizada usando a ferramenta plantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>). O GRAVY (grande média de hidropatia), o peso molecular (MW) e o ponto isoelétrico (pI) das sequências deduzidas de aminoácidos foram preditos com a ferramenta PROTPARAM disponível no Expert Analysis System (ExPASy) no servidor de proteômica (<http://web.expasy.org/protparam/>). A predição da localização subcelular foi realizada usando a ferramenta PSORTII, disponível no banco de dados GenScript (<https://www.genscript.com/tools/psort>). A ferramenta Deep-Loc (1.0) também foi usada para predição da localização subcelular das proteínas (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc/>). O programa do servidor NetPhos (3.1) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) foi utilizado para identificar potenciais sítios de fosforilação. As sequências de aminoácidos foram alinhadas com o auxílio do software ClustalX 2.1 (THOMPSON et al., 1994), o dendrograma de similaridade foi gerado com o uso do método Neighbor-Joining (NJ) (SAITOU; NEI, 1987), com bootstrap de 1000 replicações. Os dendrogramas foram construídos com o auxílio do programa MEGA7 (KUMAR et al., 2007).

A expressão relativa dos genes *SUSY*, *SPS* e das *INVs* do tomate foram determinadas a partir de dados de RNA-Seq Illumina obtidos do The Tomato Genome Consortium (2012) (<https://www.nature.com/articles/nature11119#MOESM67>) e usados

para gerar perfis comparativos dos genes em três estágios de desenvolvimento do fruto de tomate (MG, Breaker e RR).

Dados de bibliotecas de RNA-seq (Illumina, San Diego, EUA) publicados por Mou et al. (2015) foram utilizados para gerar os perfis comparativos da expressão dos genes *SISUSY*, *SISPS* e das INVs em frutos de *S. lycopersicum* no estágio de desenvolvimento MG (mature green) submetidas aos tratamentos controle (CK), tratados com ABA exógeno e com NDGA (Nordihydroguaiaretic acid ABA biosynthesis inhibitor), um potente inibidor de ABA.

4.2 Material vegetal e condições experimentais

O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação no Campus da Universidade Estadual de Santa Cruz, localizada próxima à região urbana do município Ilhéus, BA (14°47'00" S, 39°02'00" W). Foram utilizadas sementes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Santa Clara, que apresenta suscetibilidade a seca (ROCHA et al., 2016). As plântulas de tomateiro, quando atingiram o estágio de 4-6 folhas verdadeiras, foram transplantadas para vasos plásticos de 5L de capacidade contendo uma mistura de solo e areia lavada (proporção de 2:1), e cultivadas em condições ótimas de disponibilidade de água e nutrientes, em casa de vegetação antes do início da aplicação dos tratamentos. No estágio de fixação de frutos (38 dias após o transplante), os vasos foram vedados com papel alumínio, para evitar a perda de água por evaporação. As plantas (10 plantas/tratamento) foram em seguida submetidas aos seguintes tratamentos: **i.** controle, em que o Ψ_w variou entre -0,1 à -0,3 MPa durante todo o experimento, sendo as plantas irrigadas até 90% da capacidade de campo do substrato (CC; $\text{cm}^{-3} \text{cm}^{-3}$), quando o conteúdo de água decrescia para 75% da CC e **ii.** déficit hídrico moderado, em que o Ψ_w variou entre -0,4 à -0,6 MPa durante todo o experimento, em que as plantas receberam 40% do suprimento total de irrigação aplicado no tratamento controle (CHEN et al. 2013). A manutenção do controle da irrigação foi feita por gravimetria. Os tratamentos foram aplicados no estágio de fixação do fruto e mantidos até o estágio de maturação completa dos frutos (estádio vermelho maduro).

4.3 Análises físico químicas

Os frutos foram coletados sete dias após o início do estágio 'Breaker' (B+7), em média 35 dias após a aplicação dos tratamentos. O peso fresco (FW) dos frutos foi obtido por meio de pesagens em balança analítica de precisão (modelo Bel M214AIH, precisão de 0,0001g, SP, Brasil) e os diâmetros dos frutos foram medidos com auxílio de um paquímetro manual. O pH foi determinado usando um pHmetro digital (PHS-3E-BI; Ion, Araucária, Brasil) e as mesmas amostras de suco dos frutos foram utilizadas para medições de conteúdo sólidos solúveis totais (SSC), com auxílio de um refractômetro analógico (0 a 32% Brix - RHB32, ASKO, Brasil), sendo os valores expressos em °Brix.

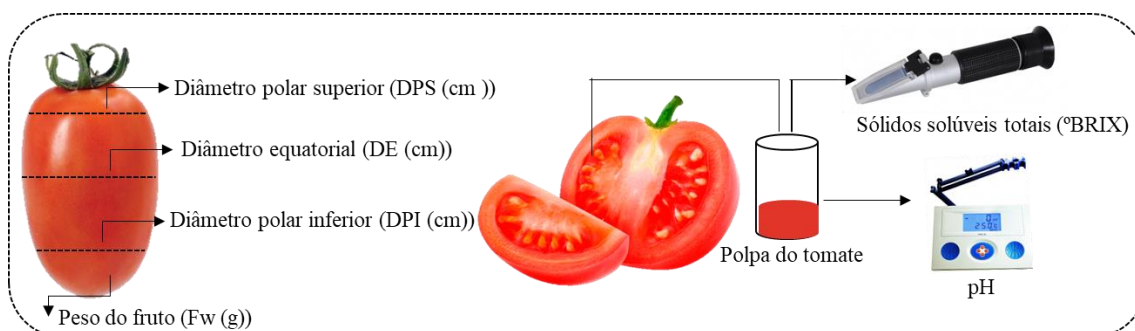


Figura 1: Esquema das análises físico químicas realizadas nos frutos de tomate.

4.4 Análises fisiológicas

A segunda ou terceira folha totalmente expandida e madura a partir do ápice da planta foi utilizada para determinar o potencial hídrico foliar (Ψ_w) no período entre 1 - 3 horas da manhã (potencial hídrico antemanhã), utilizando uma câmara de pressão Scholander (PMS Instrument Co., Albany, OR, EUA), segundo a metodologia descrita por Scholander et al. (1965).

As medições das trocas gasosas foram realizadas em folhas maduras e totalmente expandidas, das 07 às 10h da manhã, utilizando-se um sistema portátil de medição de fotossíntese Li-Cor (LI-6400 XT, Marca, USA). Foram medidas a taxa fotossintética líquida (A), a condutância estomática (g_s), a transpiração (E) e a razão entre as concentrações interna e externa de CO_2 (C_i/C_a), sob luz saturante artificial de $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a concentração atmosférica de CO_2 (C_a) de $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$. A eficiência instantânea de uso da água (A/E), foi calculada pela razão entre a taxa fotossintética líquida (A) e a taxa de transpiração (E); a eficiência intrínseca de uso da água (A/g_s) foi

calculada pela razão entre a taxa fotossintética líquida (A) e a condutância estomática (g_s) e a eficiência instantânea da carboxilação (A/C_i) foi estimada pela razão entre a taxa fotossintética líquida (A) e a concentração interna de CO_2 (C_i).

4.5 Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

O RNA total dos frutos foi isolado utilizando o reagente TRIzol®, seguindo as instruções do fabricante. A qualidade e a integridade do RNA isolado foram avaliadas por análise de gel de agarose à 1% e quantificadas com o auxílio do NANODrop (Thermo Scientific™, ND2000USCAN, EUA). As amostras de RNA foram então tratadas com DNase I sem RNase (Invitrogen, Califórnia, USA), seguindo as instruções do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada usando o kit RevertAid H Minus (Fermentas Life Science), seguindo as instruções do fabricante. Os genes de referência *GAPDH* (*Solyc05g014470*), *RPL2* (*Solyc10g006580*) e *ACT* (*Solyc03g078400*) foram amplificados juntamente com os genes alvo como controles endógenos para normalizar a expressão entre as diferentes amostras. Para a escolha do melhor gene de referência, foi utilizado o programa NormFinder (ANDERSEN et al., 2004) (<https://moma.dk/normfinder-software>). As sequências dos genes alvo e controles endógenos estão descritas na Tabela S1. Para quantificação da expressão gênica foi utilizado o método comparativo de Ct: $2^{-\Delta Ct}$ (LIVAK et al., 2001), com dados de pelo menos três repetições biológicas que foram validadas individualmente com uso do kit Ampliqon RealQPlus 2x Master Mix Green Low Rox™. Reações controle, desprovidas de cDNA (NTC), também foram usadas em todos os experimentos.

4.6 Análises estatísticas

O delineamento experimental adotado foi em blocos inteiramente casualizados, com dez repetições, com dois regimes hídricos (controle e déficit hídrico moderado). Os dados foram testados inicialmente para distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk, com nível de significância de 5%. Confirmada a hipótese, as diferenças estatísticas foram avaliadas com base na análise de variância (ANOVA) e as médias foram separadas pelo teste de t-student, com valor crítico de $P \leq 0,05$. A análise de correlação de Pearson foi realizada para verificar a associação entre as variáveis fisiológicas com auxílio dos pacotes

“*corrplot*” e “*corrgram*” ($P \leq 0.05$). Os mapas de calor da expressão gênica e dos dados de RPKM foram plotados com auxílio do pacote “*ComplexHeatmap*”. Para os dados de peso de fruto, produtividade e número de frutos foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney (Tabela 2). Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R (R Development Core Team, 2017).

5. Resultados

5.1 Identificação e caracterização molecular das famílias gênicas envolvidas no metabolismo da sacarose em tomateiro

5.1.1 Sacarose sintase - SUSY

As análises com base em buscas das sequências nos bancos de dados genômicos resultou na identificação de sete genes codificadores de SUSY no genoma de tomate (*SISUSY1*, *SISUSY2*, *SISUSY3*, *SISUSY4*, *SISUSY5*, *SISUSY6*, *SISUSY7*). Conforme ilustrado na Tabela 1, o tamanho da região CDS (from coding sequence) dos genes da *SISUSY* variam de 771pb (*SISUSY2*) a 2676 pb (*SISUSY6*), as proteínas *SISUSY* contêm entre 256 e 891 aminoácidos (pesos moleculares variando de 29,5 a 100,7 kDa), com pontos isoelétricos (pI) estimados entre 5,87 e 8,42. A predição subcelular indica que as proteínas *SISUSYs* estão localizadas no citoplasma (Tabela 1). Os setes genes codificadores da *SISUSY* estão distribuídos nos cromossomos 2 (*SISUSY7*), 3 (*SISUSY6*), 7 (*SISUSY3* e *SISUSY5* duplicados em tandem), 9 (*SISUSY4*) e 12 (*SISUSY1* e *SISUSY2*) de *S. lycopersicum* (Tabela 1; Figura S1).

O dendrograma de similaridade com base nas sequências de aminoácidos apresentou três grupos, sendo o primeiro com quatro enzimas, o segundo grupo com duas enzimas e o último grupo com apenas uma enzima, o que coaduna com os resultados da análise da estrutura de éxons-íntrons (Figura 2A-B). Além disso, todas as sete sequências de aminoácidos *SISUSY* compartilham dois domínios conservados de sacarose sintase e glycosyl transferase, que foram sugeridos como assinaturas típicas das proteínas *SUSY* do tomate (Figura 3). A análise da estrutura gênica dos sete *SISUSY* de tomate evidenciou a ocorrência de 11 a 15 éxons. Entretanto, os genes *SISUSY4* e 6 exibiram distintas características, em comparação com *SISUSY1* e 3 (Figura 2B). *SISUSY4* e 6 são caracterizados por apresentarem um éxon adicional (éxon 13), *SUSY1* e 3 por ter o éxon

11 de maior comprimento, e *SISUSY7* por apresentar o éxon 13 de menor comprimento. Além disso, *SISUSY5* é caracterizada por possuir apenas 11 éxons, devido à união do éxon 2 e 3, dos éxons 5 e 6 e dos éxons 9 e 10, em comparação com *SISUSY4* e 6, o que justifica sua diminuição no número de éxons. *SISUSY2* apresentou o menor número de éxons (5 éxons) (Figura 2B).

Tabela 1. Características das enzimas da sacarose que codificam genes em *Solanum lycopersicum* L.L. GRAVY: grande média de hidropaticidade; Mw: peso molecular; pI: ponto de isoeletrico.

Enzima	Transcrito	Localização cromossômica	CDS (pb)	Tamanho do polipeptídeo (aa)	Mw (KDa)	pI	GRAVY	Predição de localização subcelular
SISUSY1	Solyc12g009300	ch12:2573935..2577879	2418	805	92,5	5.94	-0.251	Citoplasma
SISUSY2	Solyc12g040700	ch12:43028228..43031386	771	256	29,5	7.53	-0.062	Citoplasma
SISUSY3	Solyc07g042550	ch07:55976889..55982494	2418	805	92,5	5.96	-0.254	Citoplasma
SISUSY4	Solyc09g098590	ch09:72380198..72385562	2439	812	92,9	5.91	-0.292	Citoplasma
SISUSY5	Solyc07g042520	ch07:55816657..55820439	2412	803	91,6	5.97	-0.298	Citoplasma
SISUSY6	Solyc03g098290	ch03:60636360..60640569	2676	891	100,7	5.87	-0.296	Citoplasma
SISUSY7	Solyc02g081300	ch02:45315741..45320028	2655	884	100,6	8.42	-0.39	Citoplasma
SISPS1	Solyc08g042000	ch08:24345525..24352756	3138	1045	117,5	6.21	-0.383	Citoplasma
SISPS2	Solyc09g092130	ch09:71269146..71277256	3195	1064	119,5	6.13	-0.477	Citoplasma
SISPS3	Solyc11g045110	ch11:31768096..31775364	3003	1000	113,1	6.59	-0.404	Citoplasma
SISPS4	Solyc07g007790	ch07:2438924..2447625	3165	1054	118,4	6.05	-0.44	Citoplasma
SICIN1	Solyc01g100810	ch01:90737614..90743352	1962	653	74,4	8.18	-0.317	Cloroplasto
SICIN2	Solyc01g111100	ch01:97477472..97482570	1818	605	69,0	6.95	-0.3	Cloroplasto
SICIN3	Solyc04g081440	ch04:65414803..65419467	1713	571	65,2	5.97	-0.29	Citoplasma

SICIN4	Solyc06g065210	ch06:40659646..40663785	1656	551	62,7	6.16	-0.201	Citoplasma
SICIN5	Solyc11g007270	ch11:1652454..1656955	1968	655	73,5	5.84	-0.231	Cloroplasto
SICIN6	Solyc11g020610	ch11:11747788..11752875	1608	535	60,8	6.11	-0.221	Citoplasma
SICIN7	Solyc11g067050	ch11:52804241..52807353	1926	641	72,4	6.35	-0.223	Cloroplasto
SICIN8	Solyc01g058010	ch01:64953319..64958618	1521	506	57,1	5,38	-0,274	Cloroplasto
SICWIN1	Solyc09g010080	ch09:3475480..3479343	1755	584	67,2	9.2	-0.361	Parede celular
SICWIN2	Solyc10g083290	ch10:63110526..63115912	1749	582	65,8	9.23	-0.393	Parede celular
SICWIN3	Solyc09g010090	ch09:3480545..3484159	1752	583	66,1	6.93	-0.428	Parede celular
SICWIN4	Solyc10g083300	ch10:63123100..63127293	1770	589	66,8	8.94	-0.347	Parede celular
SIVIN1	Solyc08g079080	ch08:62722555..62726754	1959	652	72,7	6.21	-0.325	Vacúolo
SIVIN2	Solyc03g083910	ch03:53851092..53855368	1947	648	71,3	5.54	-0.219	Vacúolo

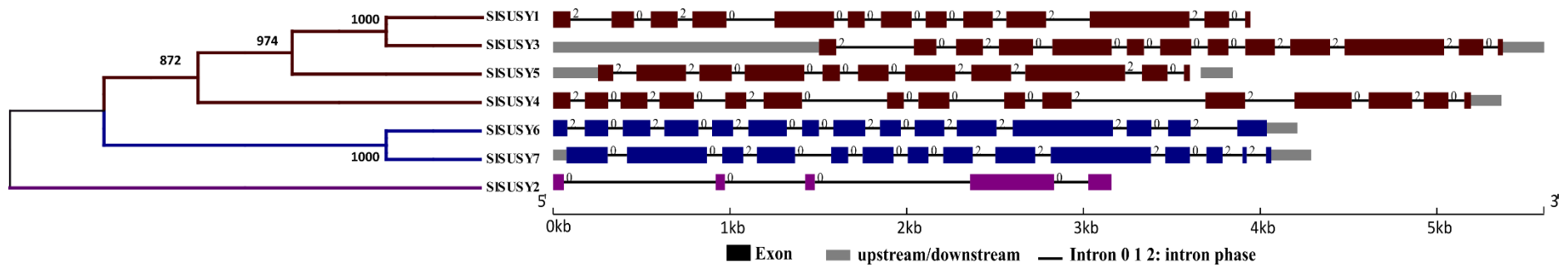


Figura 2. Características da família gênica da sacarose sintase (SUSY) em *Solanum lycopersicum*. Dendrograma de similaridade (A) e estrutura de íntron-éxon da família gênica da SUSY em *S. lycopersicum* (B).

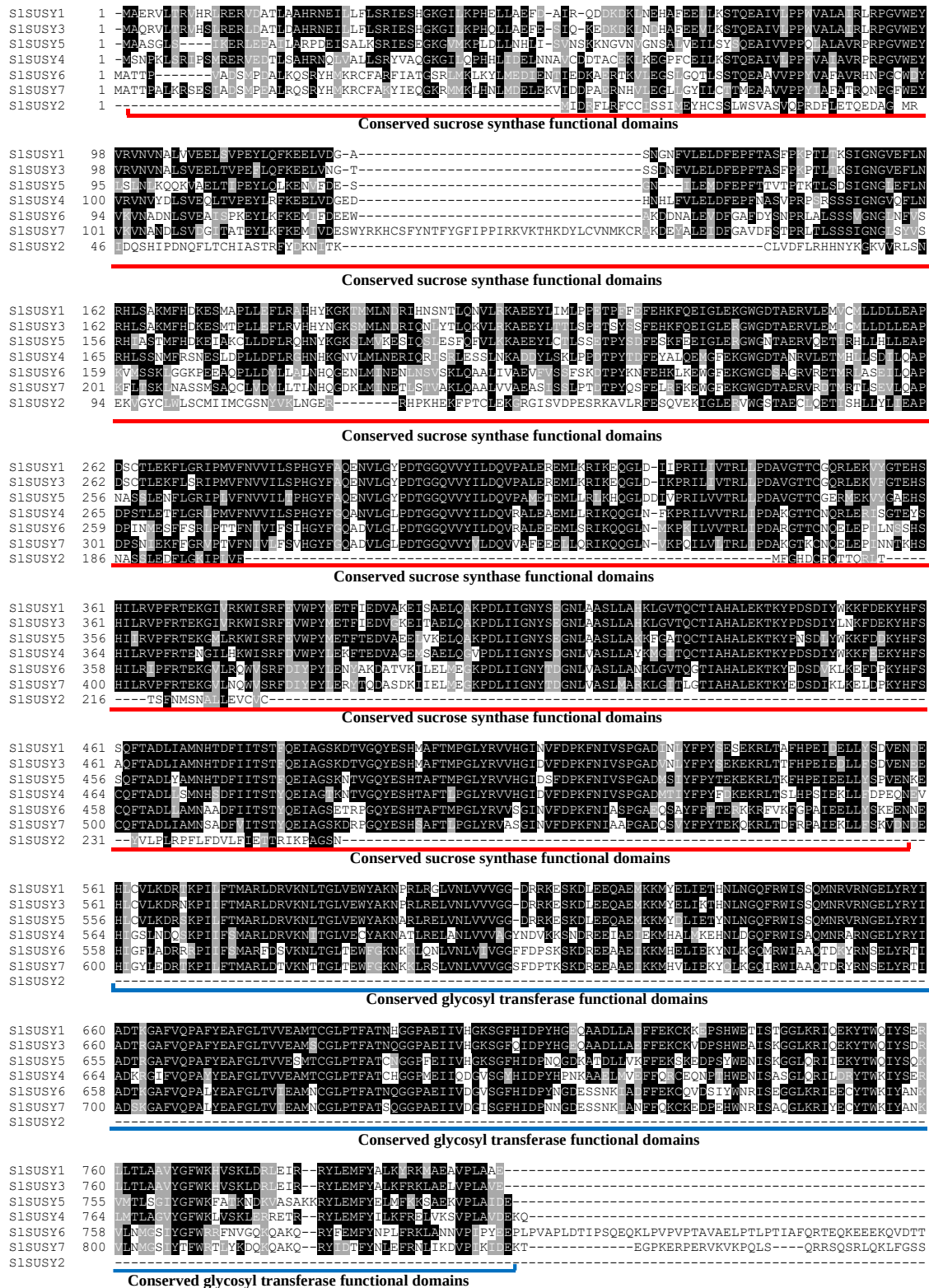


Figura 3. Alinhamento das sequências de aminoácidos das SISUSYs. As linhas abaixo indicam domínios conservados. As linhas vermelha e azul indicam um domínio de sacarose sintase e um domínio de glicosil transferase, respectivamente. Em preto e cinza indicam aminoácidos conservados.

5.1.2 Sacarose fosfato sintase – SPS

Nossa análise identificou quatro genes codificadores de SPS (*SlSPS1*, *SlSPS2*, *SlSPS3*, *SlSPS4*) em tomate. O tamanho da região CDS dos quatro genes da SlSPS variam entre 3003 à 3195pb. As sequências de aminoácidos evidenciaram que as proteínas SlSPS variam de 1000 a 1064 aminoácidos, com peso molecular entre 113,1 e 119,5 KDa e pI de 6,05 a 6,59. As proteínas SlSPSs estão localizadas no citoplasma (Tabela 1). Os quatro genes codificadores da *SlSPS* foram mapeados no cromossomo 7 (*SlSPS1*), 8 (*SlSPS2*), 9 (*SlSPS3*) e 11 (*SlSPS4*) (Tabela 1; Figura S1).

A família da SPS apresenta três domínios proteicos, sacarose sintase (N-terminal), glycosyl transferase e o domínio sacarose-6F-fosfato fosfo-hidrolase (C-terminal) (Figura S2), três sítios de ligação conservados (F6P binding site, UDPG binding site, osmotic site) e presença de aspartato-prolina (DP) (Figura 4C). O dendrograma de similaridade com base nas sequências de aminoácidos apresentou três grupos, o primeiro com dois genes (*SlSPS 1 e 2*), o segundo e o terceiro com apenas um gene cada (*SlSPS3 e SlSPS4*), o que coaduna com a estrutura de éxons-íntrons (Figura 4A-B). A análise da estrutura dos genes *SlSPS* revelou uma variação no número e tamanho das sequências exônicas e intrônicas (Figura 4B). Os genes *SlSPS1*, 2 e 3 apresentaram estruturas e número de éxons e íntrons similares, enquanto que *SlSPS4* apresentou 14 éxons, devido ao acréscimo do éxon 5. O gene *SlSPS3* apresentou 12 éxons, devido à ausência do éxon 2 e éxon 5, que foram encontrados em *SlSPS1*, 2 e 4, respectivamente (Figura 4B).

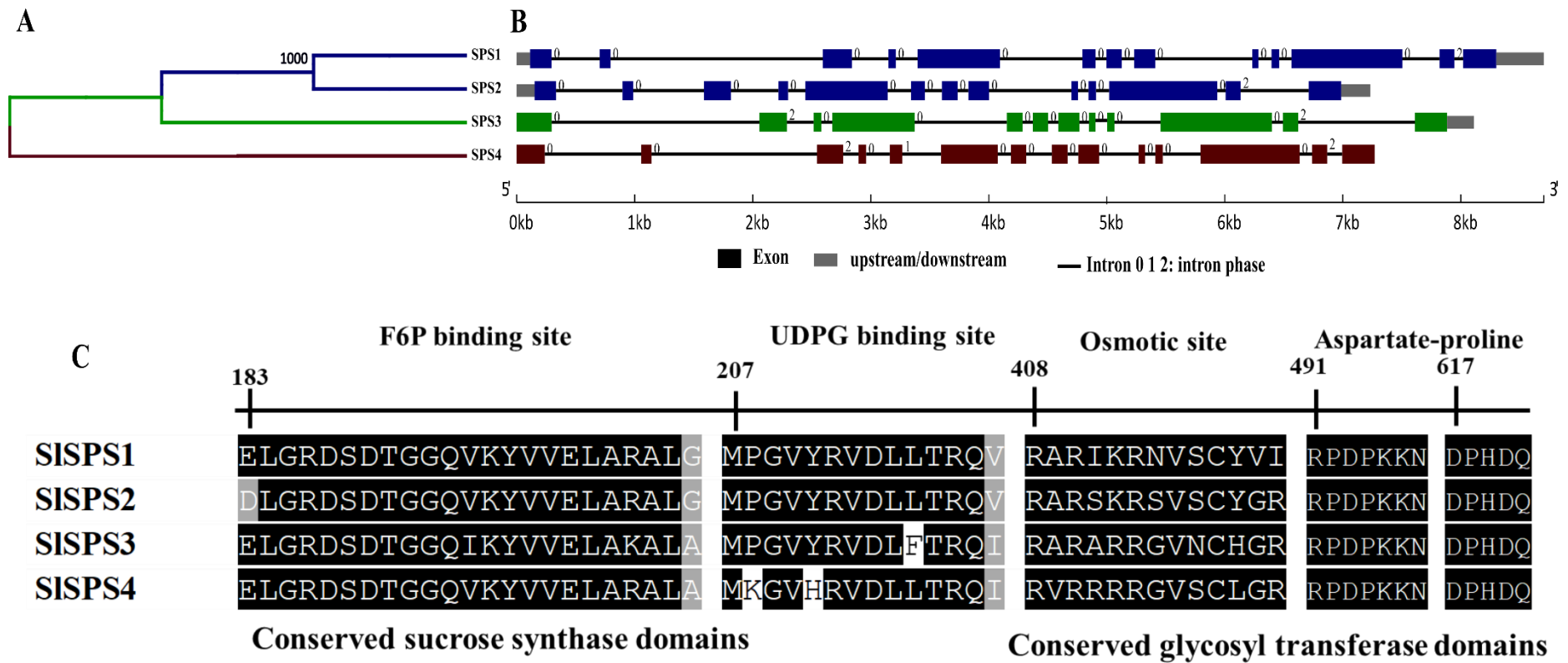


Figure 4. Características da família gênica da sacarose fosfato sintase (SPS) em *Solanum lycopersicum*. Dendrograma de similaridade (A); estrutura de íntron-éxon da família gênica da SISPS em *S. lycopersicum* (B); Alinhamento das regiões conservadas dos quatro membros da família gênica da SISPSs (C). Em preto e cinza indicam aminoácidos conservados.

5.1.3 INVs neutras/alcalina - CIN

Foram identificados oito genes da INV neutra ou citoplasmática (*SICIN1*, *SICIN2*, *SICIN3*, *SICIN4*, *SICIN5*, *SICIN6*, *SICIN7*, *SICIN8*) no genoma do tomate (Tabela 1). A região CDS desta família multigênica variou de 423 a 1968 pb, com as respectivas proteínas contendo entre 140 e 655 aminoácidos, com peso molecular de 17 a 74,4 KDa e o pI estimado entre 5,12 a 9,51. De acordo com a predição celular as proteínas estão localizadas no cloroplasto e no citoplasma (Tabela 1). Os oito genes que codificam as *SICINs* estão localizados nos cromossomos 1 (*SICIN1*, *SICIN2* e *SICIN8*), 4 (*SICIN3*), 6 (*SICIN4*) e 11 (*SICIN5*, *SICIN6* e *SICIN7*) (Tabela 1; Figura S1).

Os *SICINs* abrigam um domínio proteico, glycosyl hydrolase 100, abrangendo aproximadamente 80% da proteína (Figura S3). Além disso, um dendrograma de similaridade com oito sequências de aminoácidos *SICIN* foi construído para investigar as relações filogenéticas entre as enzimas da família CIN no tomate.

O dendrograma (Figura 5A) dividiu as *SICINs* em dois grupos principais que diferem consistentemente em oito resíduos de aminoácidos nos motivos conservados (C273V, C277S, V286I, Y287H, V371L, S372Q, R439P e V450T), com base na numeração de aminoácidos de *SICIN4* (Figura 5C). O grupo α contém *SICIN1*, 5, 7 e 8, enquanto o grupo β contém *SICIN2*, 3, 4 e 6 (Figura 5A). Para *SICIN*, a caracterização da estrutura gênica dos oito genes evidenciou que os mesmos normalmente consistem em 3 ou 6 éxons alternados por extensas regiões intrônicas (Figura 5B). *SICIN1*, 2, 5, 7 apresentaram 6 éxons e *SICIN1* revelou um padrão de estrutura exônica distinta dos demais genes da família. *SICIN3*, 4, e 8 apresentaram 4 éxons e em *SICIN8* ocorreu o aumento do éxon 1 e a diminuição dos éxons 2 e 3 (Figura 5B).

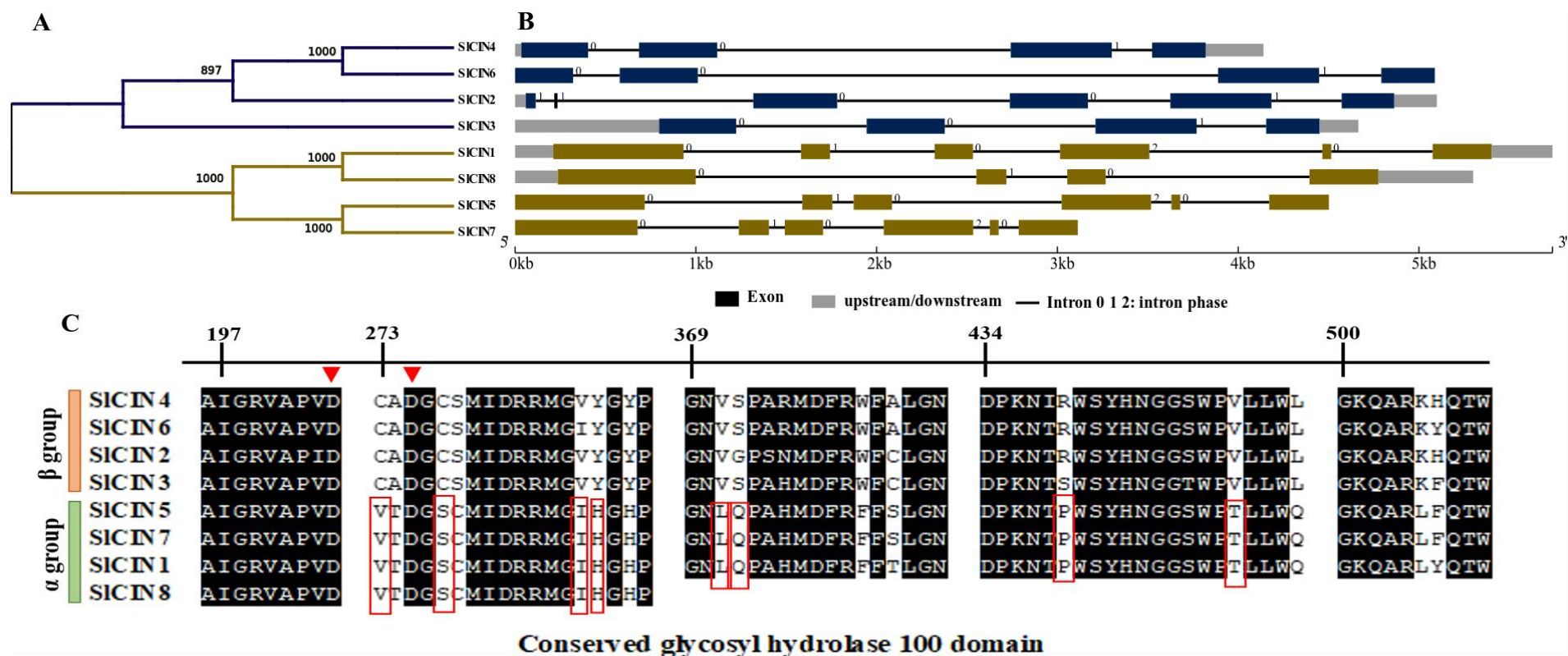


Figure 5. Características da família gênica da Invertase citoplasmática (CIN) em *Solanum lycopersicum*. Dendrograma de similaridade (A); estrutura de íntron-éxon da família gênica da *SICIN* em *S. lycopersicum* (B); Alinhamento das regiões conservadas dos oito membros da família gênica *SICINs* (C). Em preto indicam os aminoácidos conservados. As caixas em vermelho indicam os aminoácidos presente em apenas um grupo da família *SICIN*.

5.1.4 INV_s ácidas – CWIN e VIN

Foram identificados e caracterizados seis genes da INV ácida. Desses, quatro membros estão localizados na parede celular (SICWIN1, SICWIN2, SICWIN3, SICWIN4) (Tabela 1) e dois no vacúolo (SIVIN1, SIVIN2) (Tabela 1). O tamanho da região CDS das INV ácidas da parede celular (SICWIN) variaram de 1749 a 1770 pb. As proteínas desta família contêm entre 582 a 589 aminoácidos e apresentam peso molecular de 65,8 a 67,2 KDa, com pI entre 6,93 a 9,23. Todas as proteínas SICWINs do tomateiro apresentaram localização subcelular no vacúolo (Tabela 1). As INV ácidas vacuolares (SIVIN) apresentaram o tamanho da região CDS de 1947 a 1959 pb, contendo 648 e 652 aminoácidos e peso molecular de 71,3 e 72,7 KDa, com pI entre 5,54 e 6,21, respectivamente. As proteínas SIVINs do tomateiro apresentaram localização no vacúolo (Tabela 1). Todas as famílias das proteínas descritas apresentaram GRAVY negativo, indicando que são hidrofílicas.

Os genes das INV ácidas vacuolares estão distribuídos nos cromossomos 3 (SIVIN1), 8 (SIVIN2), enquanto aqueles das INV ácidas da parede celular estão duplicados em tandem nos cromossomos 9 (SICWIN1 e SICWIN3) e 10 (SICWIN2 e SICWIN4) (Tabela 1; Figura S1).

O dendrograma revelou que as famílias de INV_s ácidas foram separadas em dois clados, um dos quais é inferido como direcionado para a parede celular enquanto o último para o vacúolo (Figura 6A-B). As INV_s da CWIN apresentam o domínio glycosyl hydrolases na porção N e C-terminal para todas as enzimas (Figura 6C; Figura S4). A análise das enzimas da família SIVIN revelaram três domínios, sendo o domínio de função desconhecida (DUF3357) na porção N-terminal e dois domínios glycosyl hydrolases na porção C-terminal (Figura 7). A estrutura gênica dos quatro integrantes da família das INV ácidas (SICWINs) evidenciou 6 éxons, com alto padrão de conservação. Os genes SICWIN 1 e 3 e SICWIN 2 e 4 apresentaram o mesmo padrão de conservação dos éxons, visto que eles estão duplicados em tandem no cromossomo 9 e 10, respectivamente (Figura 6B). A caracterização da estrutura gênica da família das INV ácidas de tomate (SICVINs) apresentou 7 éxons bem conservados para os dois genes (Figura 6B).

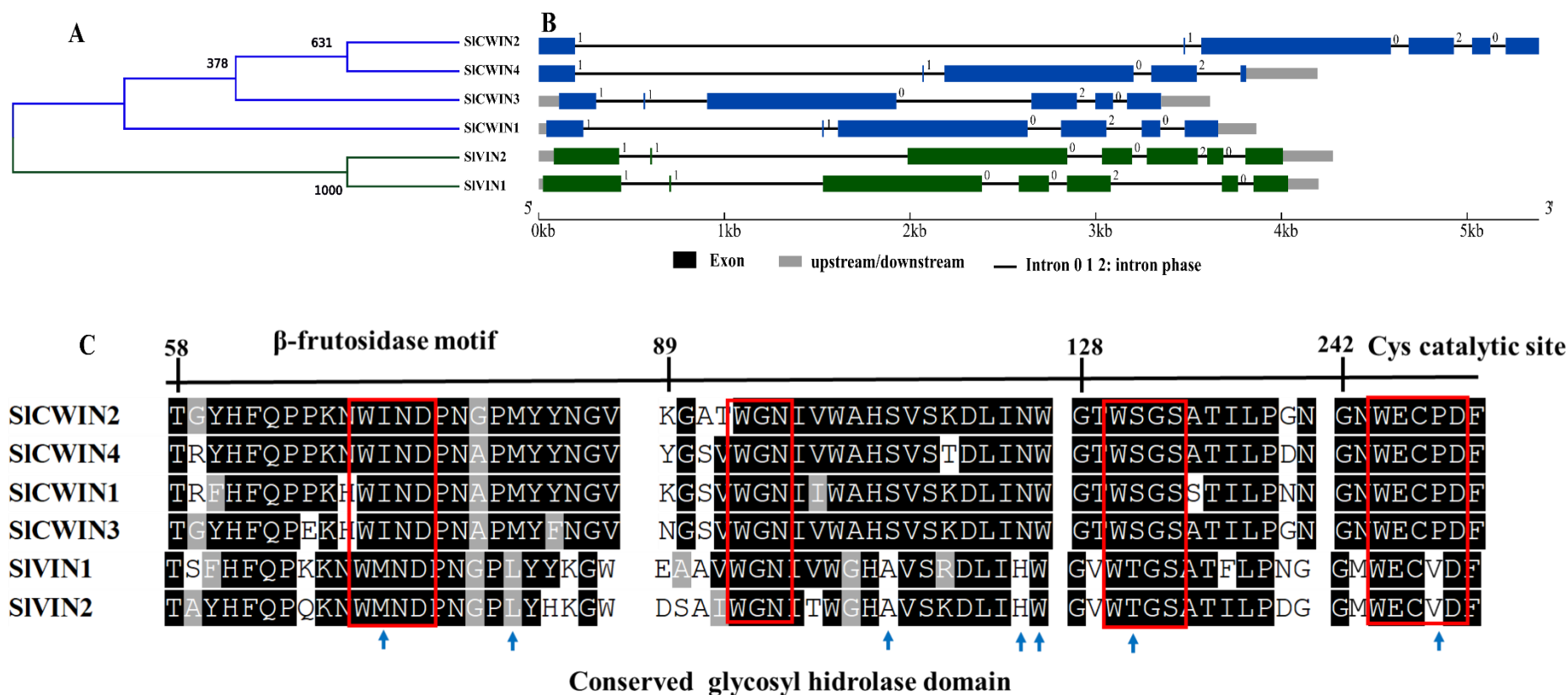


Figure 6. Características das famílias gênicas da Invertases ácidas (SICWINs e SIVINs) em *Solanum lycopersicum*. Dendrograma de similaridade (A); estrutura de íntron-éxon das famílias gênicas da SICWINs e SIVINs em *S. lycopersicum* (B); Alinhamento das regiões conservadas dos quatro membros da família gênica SICWINs e dos membros da família gênica SIVINs (C). Em preto e cinza indicam aminoácidos conservados. As setas azuis indicam aminoácidos conservados característicos de cada família gênica de acordo com sua localização subcelular. As caixas vermelhas indicam os motivos conservados das famílias das INVs ácidas.

5.2 Efeitos do déficit hídrico em caracteres da folha e do fruto

Os resultados da análise de variância indicam que houve diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os regimes hídricos, para todas as variáveis analisadas da folha (Ψ_w , E , gs e A) (Figura 8A-D). Os menores valores de Ψ_w foram observados com 41 dias após a aplicação do tratamento. gs e A apresentaram diferenças significativas entre tratamentos aos 27 e 34 dias após a aplicação do tratamento de deficiência hídrica, ocorrendo uma diminuição significativa de seus valores, no final do período analisado (Figura 8 C-D). A análise de variância demonstrou que E apresentou diferenças significativas entre os tratamentos ao longo de todo o período analisado, com uma redução de seus valores no final do período (Figura 8B).

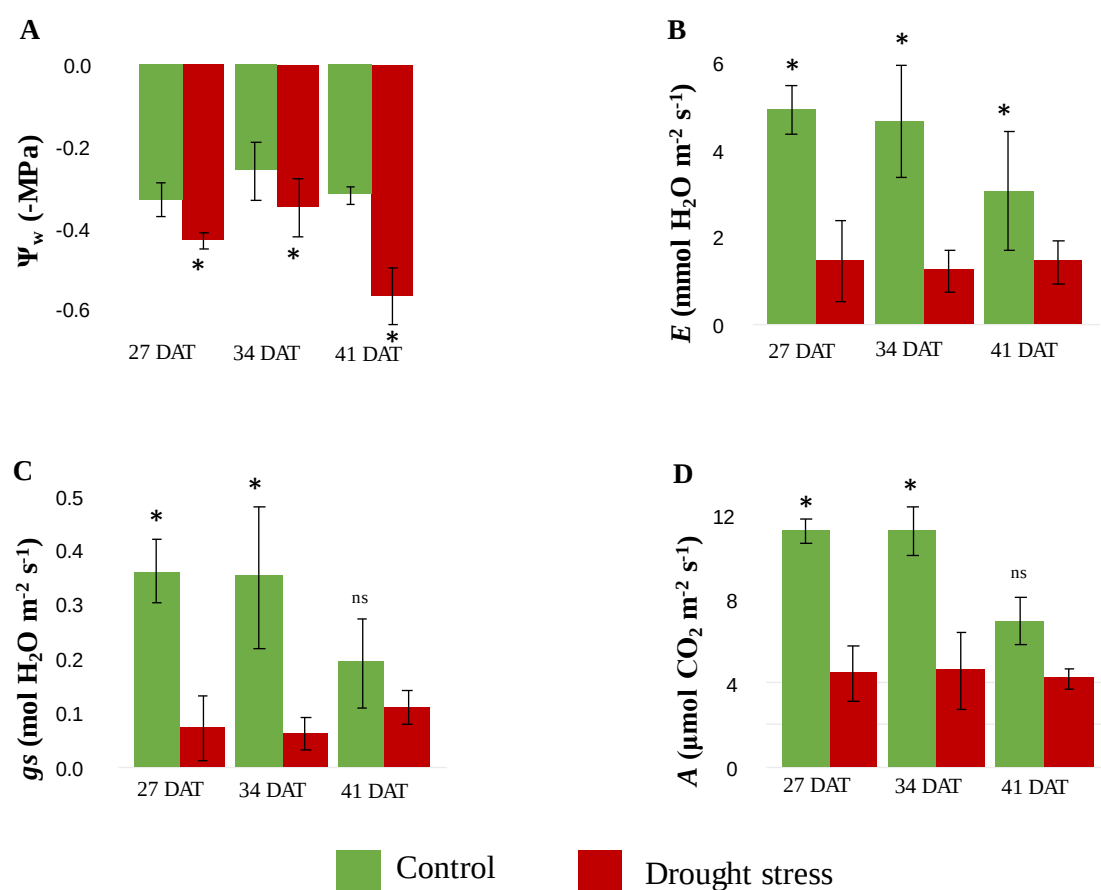


Figure 8. A: Potencial hídrico antemanhã; B: taxa transpiratória; C: condutância estomática D: Taxa fotossintética em plantas de *Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara submetidas ao deficit hídrico. As barras representam o erro padrão da média e (*) indica a significância $P \leq 0,05$, ns indica não significante de acordo com o teste de t-student e DAT (dias após o tratamento).

Em relação aos pH dos frutos analisados, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 9A). No entanto, o SSC dos frutos sob deficiência hídrica foi significativamente maior ($P \leq 0,05$) do que aqueles do tratamento controle (Figura 9B).

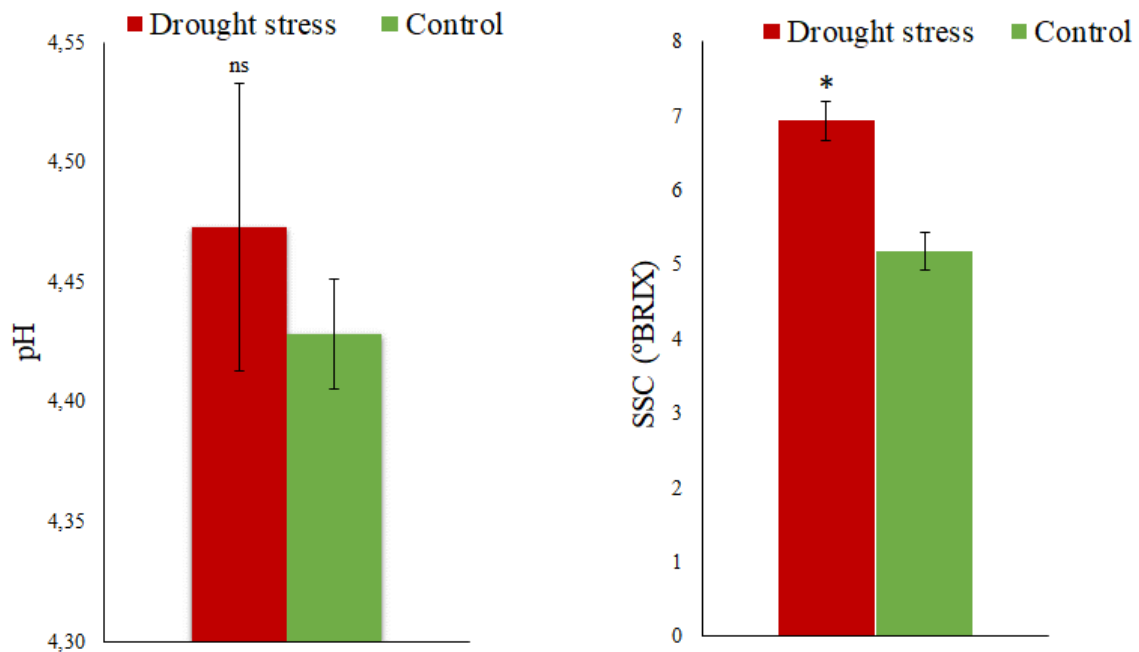


Figure 9. A: pH dos frutos; **B:** SSC (°BRIX) em plantas de *Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara submetidas ao deficit hídrico. As barras representam o erro padrão da média e (*) indica a significância $P \leq 0,05$, ns indica não significante de acordo com o teste de t-student.

A análise descritiva dos dados evidenciou significância de $P \leq 0,05$ para as variáveis peso do fruto (Fw), produtividade e número de frutos, entretanto para diâmetro polar superior, inferior e equatorial não houve diferenças entre as médias para os tratamentos controle(irrigado) e déficit hídrico moderado (Tabela 2).

Tabela 2: Análise descritiva (média, desvio-padrão, CV (%) e os valores médios (*P-value*) para as variáveis peso de fruto (Fw(g)), produtividade, número de frutos, diâmetro polar superior (DPS), diâmetro polar inferior (DPI) e diâmetro equatorial (DE), sob os tratamentos controle e de deficiência hídrica.

Variáveis	Tratamentos	Média	Desvio padrão	CV (%)	<i>P-value</i>
Fw (g)	Control	37,40	8,84	4,23	0,005
	Drought stress	21,56	3,77	5,71	
Produtividade	Control	10,92	4,04	2,70	0,027
	Drought stress	3,93	2,55	1,54	
Número de frutos por planta (NFP)	Control	4,89	1,05	4,63	0,005
	Drought stress	2,2	2,68	0,82	
DPS (cm)	Control	3,34	0,65	5,12	0,28
	Drought stress	2,98	0,24	12,10	
DPI (cm)	Control	2,43	0,71	3,42	0,20
	Drought stress	2,19	0,31	7,02	
DE (cm)	Control	3,72	0,88	4,21	0,25
	Drought stress	3,41	0,48	7,02	

$P > 0,05$ ns; $P < 0,05$ *; $P < 0,01$ **

Análises de correlação entre as diferentes variáveis da folha e do fruto mostraram que existem correlações positivas significativas, conforme esperado, entre Ψ_w e A (0,93), Ψ_w e *gs* (0,91), *gs* e A (0,85), A/E e A (0,94), *gs* e A/E (0,89), Ψ_w e A/E (0,89), A/Ci e A/*gs* (0,91), DPI e DPS (0,79), DPI e FW (0,82), DPI e DE (0,83), DPS e FW (0,91), DPS e DE (0,9), FW e *gs* (0,91), *gs* e Prod. (0,94) (Figura 10). Por outro lado, correlações negativas significativas foram registradas entre Ψ_w e SSC (-0,93) e A/E e SSC (-0,96) (Figura 10).

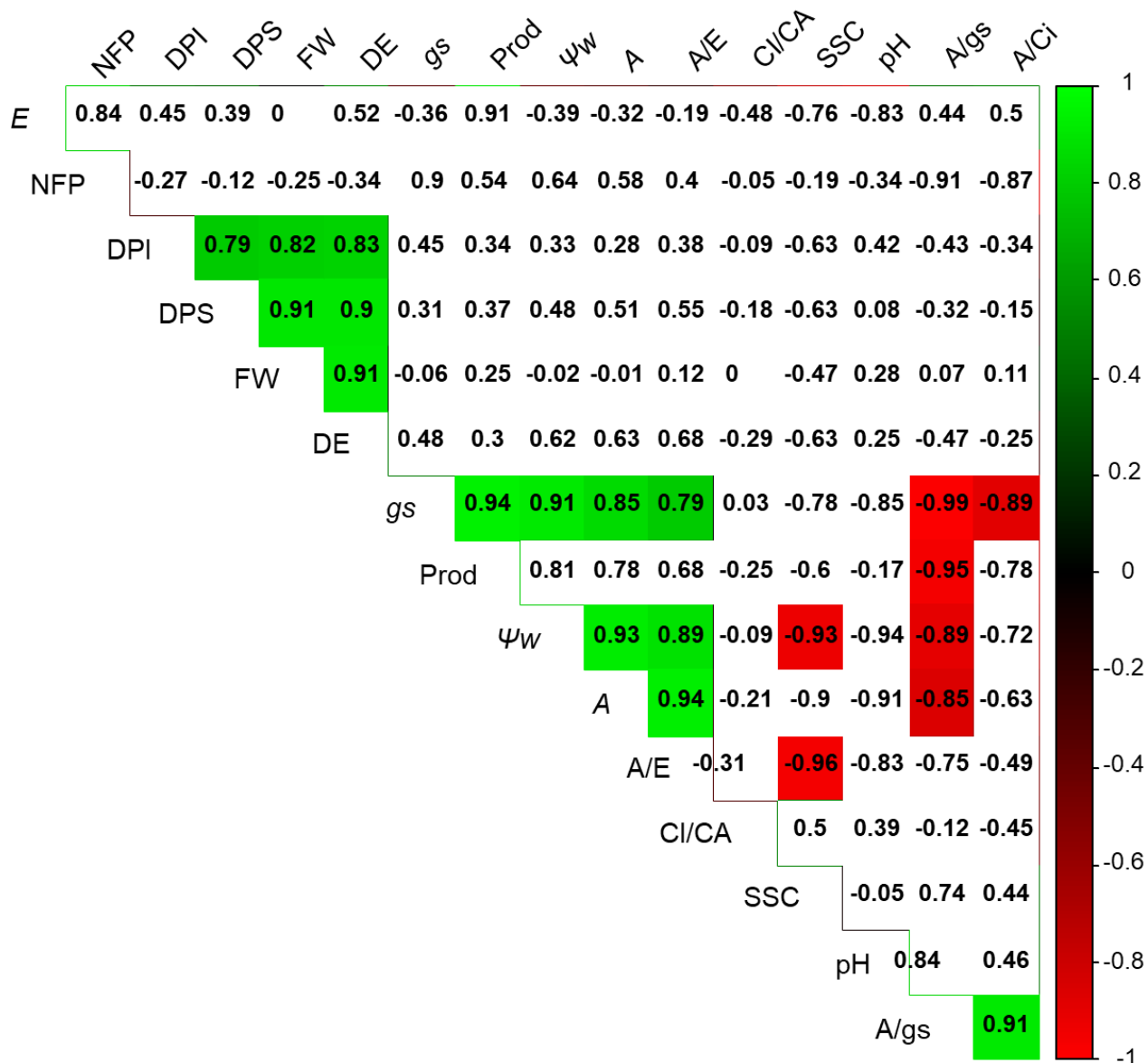


Figura 10. Correlação de *Pearson* entre as características de folhas e frutos com significância de $P \leq 0,01$. *E*: taxa de transpiração; *gs*: condutância estomática; *A*: taxa de fotossintética; ψ_w : potencial hídrico foliar; *A/E*: eficiência instantânea de uso da água; *A/gs*: eficiência intrínseca de uso da água; *A/Ci*: eficiência intrínseca de carboxilação; *NFP*: número de frutos por planta; *DPI*: diâmetro polar inferior; *DPS*: diâmetro polar superior; *DE*: diâmetro equatorial; *Prod*: produtividade.

5.3 Caracterização transcricional das famílias gênicas envolvidas no metabolismo de sacarose em tomateiro

A análise dos dados de expressão por RNA-Seq evidenciou que os genes *SISUSY1*, *SISUSY4*, *SISUSY5*, *SISUSY7*, *SISPS2*, *SISPS3*, *SISPS4*, *SICIN3*, *SICIN4*, *SICIN6*, *SICIN7*, *SIVIN1*, *SICWIN1*, *SICWIN2* e *SICWIN3* foram induzidos no verde-maduro (MG) do fruto de tomate (Figura 11). Os genes *SICIN1*, *SICIN5*, *SISPS1*, *SISUSY2*, *SISUSY3*, *SISUSY4*, *SISUSY6* e *SIVIN2* foram transcricionalmente induzidos no estágio vermelho-maduro (RR). Já os genes *SISUSY2*, *SICIN6*, *SICIN4*, *SICWIN1* e o *SIVIN2* tiveram seu perfil transcricional aumentado no estágio “de vez” (*Breaker*) do amadurecimento. Nos estágios MG e RR, o gene *SISUSY4* foi regulado positivamente, enquanto os genes *SICIN4*, *SICIN6* e *SICWIN1* foram induzidos nos estágios de MG e *Breaker*. Apenas os genes *SICIN8* e o *SICWIN4* foram reprimidos nos três estágios.

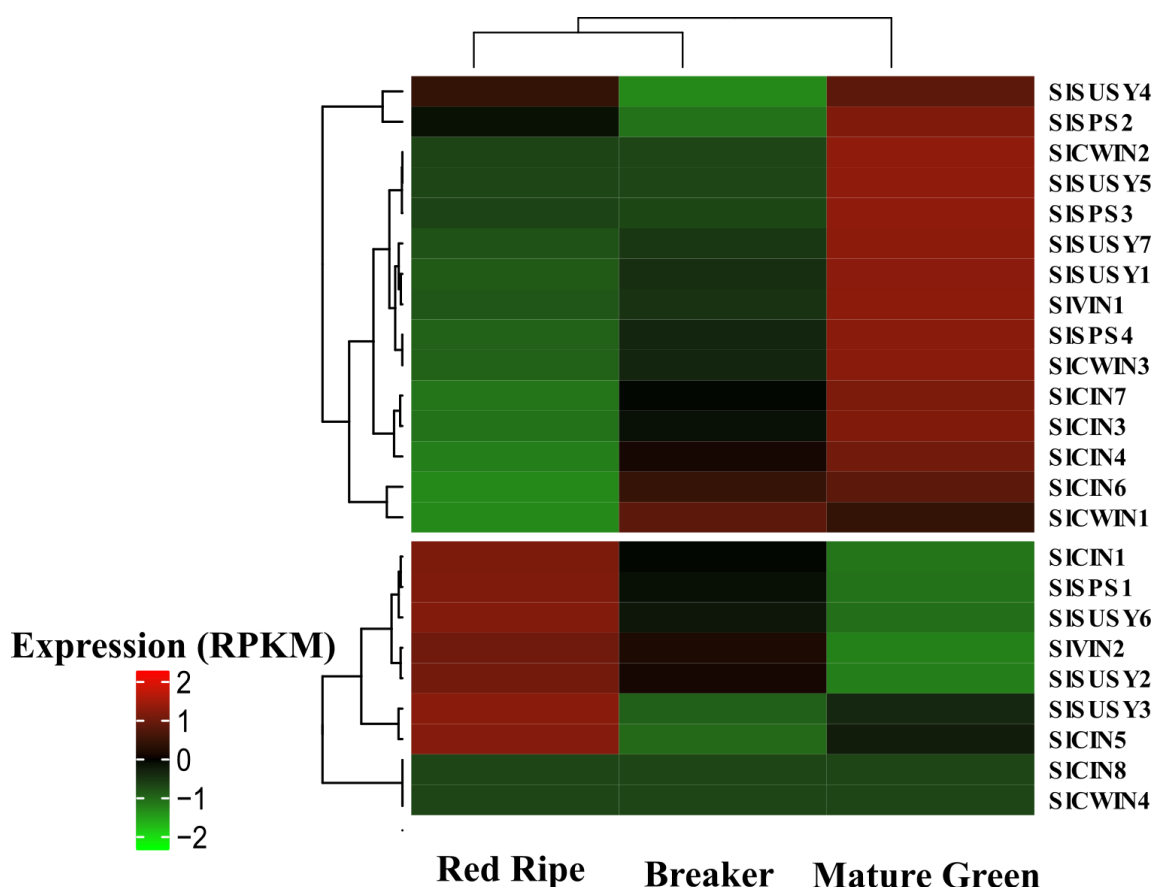


Figure 11. Expressão dos genes *SISUSYs*, *SISPSs*, *SICWINs*, *SIVINs*, *SICINs* em três estágios do desenvolvimento de frutos em *S. lycopersicum*. Os dados representam os valores médios de RPKM de cada gene em cada biblioteca de RNA-Seq (TOMATO)

GENOME CONSORTIUM, 2012). As cores vermelho e verde indicam valores de expressão mais altos e mais baixos, respectivamente.

A análise dos dados de expressão por RNA-Seq evidenciou que os genes *SICWIN2*, *SICIN1*, *SIVIN2*, *SISPS1* e 4 e *SISUSY1*, 3 e 4 foram regulados positivamente por tratamento com ABA e negativamente por tratamento com NDGA, um potente inibidor da biossíntese de ABA (Figura 12). Já os genes *SICIN3*, 4, 5 e 6, *SICWIN1*, *SIVIN1*, *SISUSY7* e *SISPS3* tiveram maior expressão no tratamento com o NDGA, enquanto os genes *SICWIN4*, *SICIN7* e *SISPS2* apresentaram níveis maiores de expressão no tratamento controle (CK) (Figura 12).

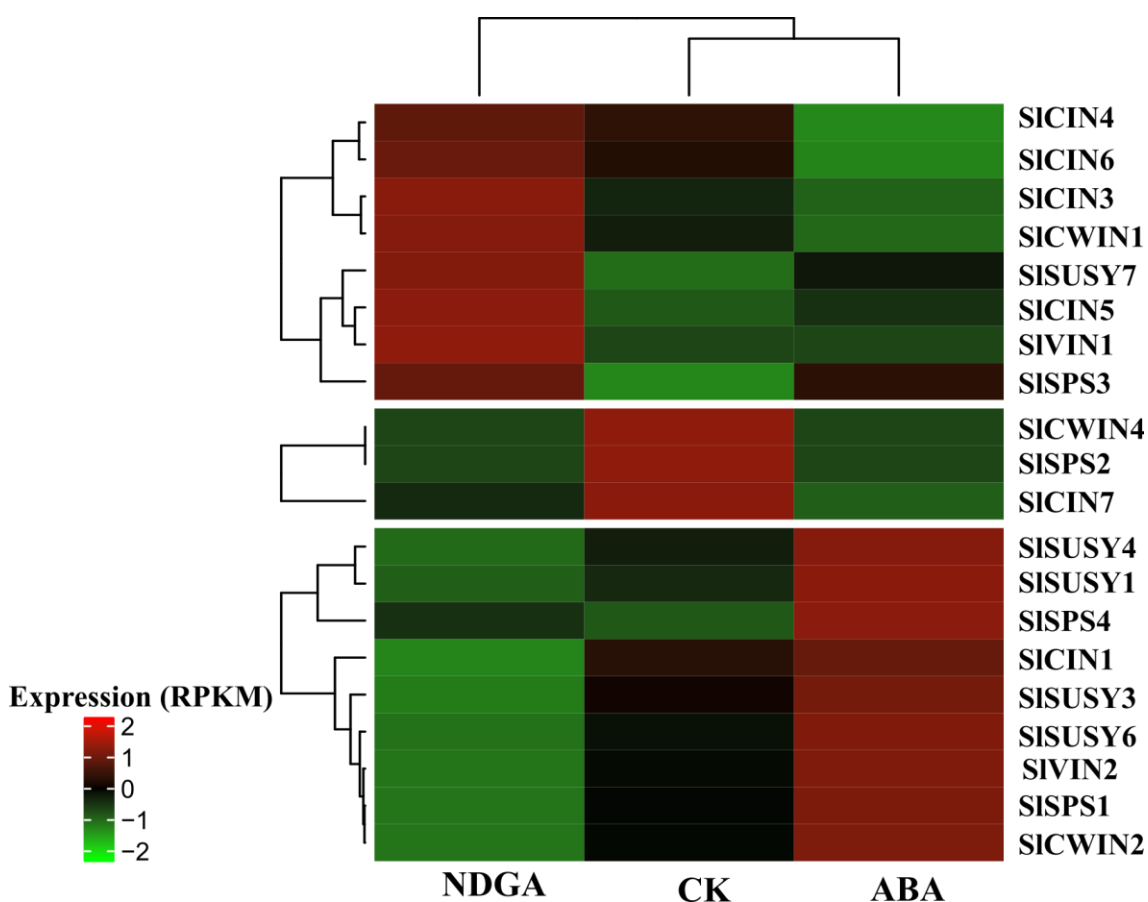


Figura 12. Expressão de genes envolvidos no metabolismo da sacarose (*SICWIN2*, *SISPS1*, *SIVIN1*, *SISUSY1*, *SISUSY4*, *SICIN3*) em frutos de tomate tratados com ABA exógeno ou NDGA (Nordihydroguaiaretic acid ABA biosynthesis inhibitor) e controle (CK). Os dados representam os valores médios de RPKM de cada gene em cada biblioteca de RNA-Seq (Mou et al., 2015). As cores vermelho e verde indicam valores de expressão mais altos e mais baixos, respectivamente.

O envolvimento dos genes do metabolismo da sacarose regulados por ABA na resposta adaptativa dos frutos de tomateiro à deficiência hídrica foi validado por meio de análises de expressão por RT-qPCR. Os genes *SICIN3*, *SICWIN2*, *SISPS1*, *SISUSY4*, *SIVIN2* foram regulados positivamente em frutos de tomate submetidos ao déficit hídrico (Figura 13). Por outro lado, o gene *SISUSY1* foi regulado negativamente nos dois regimes hídricos.

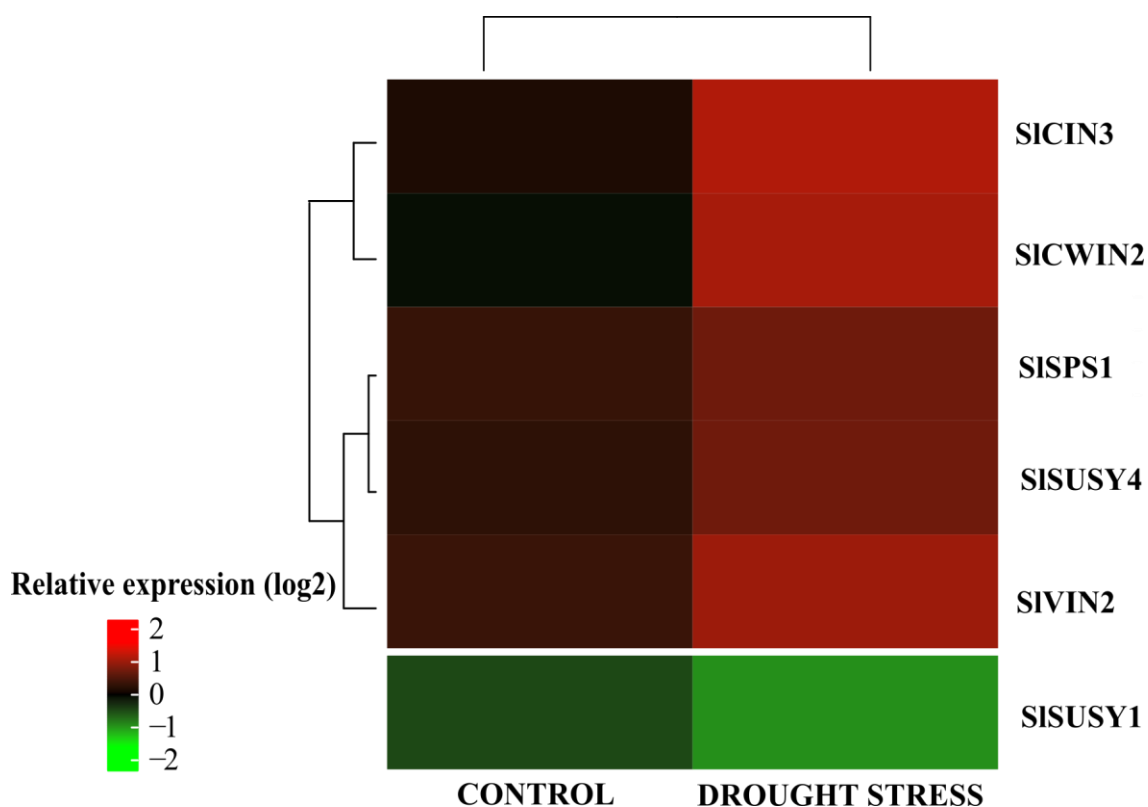


Figura 13. Expressão dos genes *SICWIN2*, *SISPS1*, *SIVIN1*, *SISUSY1*, *SISUSY4*, *SICIN3* em frutos de tomateiro submetidos à déficit hídrico. Os dados são as razões (log2) dos níveis relativos de mRNA entre as plantas tratadas e de controle, conforme análise por RT-qPCR. As cores vermelho e verde indicam valores de expressão mais altos e mais baixos, respectivamente.

5.4 *Cis-elementos regulatórios responsivos ao estresse hídrico presents na região promotora das SISUSYs, SISPSs, SICWINs, SIVINs, SICINs*

A análise de *cis*-elementos na região promotora identificou a presença de vários elementos reguladores de ação *cis* responsivos ao estresse, incluindo ABRE (respostas à ABA e à seca), MBS (envolvido na via de sinalização dependente de ABA em resposta a estresses abióticos, como seca, sal e frio), TC-rich repeats (elementos envolvidos na defesa e na resposta ao estresse), G-box (envolvido em resposta à luz, ácido abscísico, metil-jasmonato e anaerobiose e tem um papel na indução de etileno, bem como na expressão específica de sementes) (KAUR et al, 2017), DRE/CRT (respostas a alta salinidade, desidratação e baixa temperatura) e LTR (resposta a baixas temperaturas) nos genes *SISUSY*, *SISPS*, *SICIN*, *SICWIN* e *SIVIN* (Figura 14). As sequências *cis* reguladoras apresentaram elementos com responsividade à hormônios como o ácido salicílico (TCA-element), a auxina (TGA-element), a giberelina (TATC-box), o metil-jasmonato – MeJA (CGTCA-motif) e o etileno (ERE). *Cis*-elementos envolvidos em processos relacionados ao desenvolvimento das plantas também foram encontrados, incluindo aqueles envolvidos na regulação do metabolismo (O2-site), indução anaeróbica (ARE), expressão do endosperma (GCN4_motif), regulação específica de sementes (RY-element), biossíntese de flavonóides (MBSI), diferenciação das células do mesófilo (HD-Zip 1) e controle circadiano (circadian). Os *cis*-elementos TATA, CAAT e os responsivos à luz foram encontrados em maior quantidade em todos os genes analisados (Figura 14).

5.5 *Potenciais sítios de fosforilação*

Todas as proteínas das cinco famílias gênicas do tomateiro apresentaram potenciais sítios de fosforilação (Figura 15). As proteínas da família *SISUSY* contêm entre 24 (14 Ser/1 Thre/1 Tyr) e 105 (35 Ser/ 40 Thre/ 30 Tyr) sítios de fosforilação. As proteínas da família *SISPS* apresentaram entre 87 (56 Ser/18 Thre/13 Tyr) e 108 (70 Ser/ 30 Thre/ 8 Tyr). Os sítios de fosforilação das proteínas da família *SICWIN* variou de 53 (28 Ser/16 Thre/9 Tyr) a 59 (33 Ser/18 Thre/8 Tyr). As proteínas da família *SIVIN* contêm sítios de fosforilação que variaram de 66 (30 Ser/24 Thre/12 Tyr) a 70 (42 Ser/20 Thre/8 Tyr). As proteínas da família *SICIN* apresentaram sítios de fosforilação entre 22 (14 Ser/1 Thre/1 Tyr) e 66 (43 Ser/8 Tyr/15 Thre) (Figura 15).

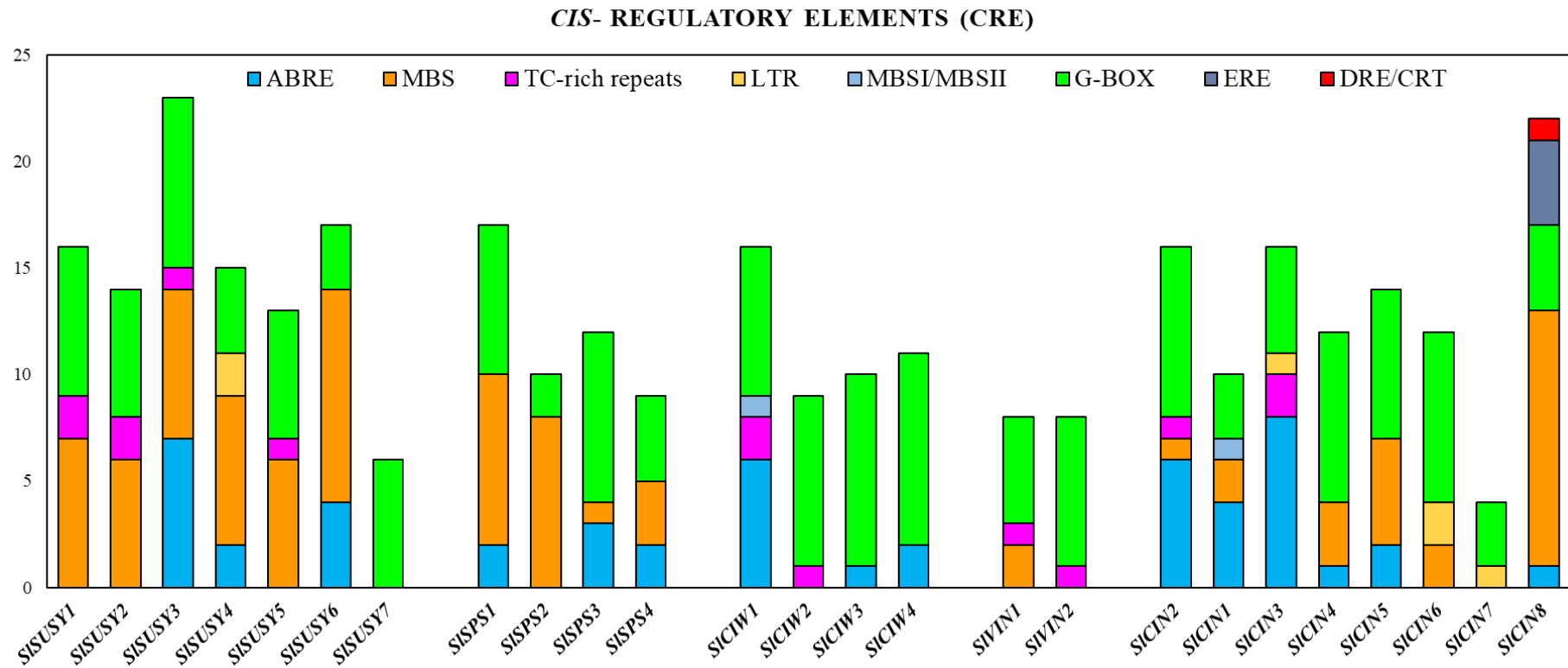


Figure 14. *Cis*-elementos regulatórios responsivos a estresses presente na região promotora de *SISUSYs*, *SISPSs*, *SICWINs*, *SIVINs*, *SICINs* de *S. lycopersicum*. Os *cis*-elementos regulatórios foram analisados 1500 kb *upstream* do local de início da tradução.

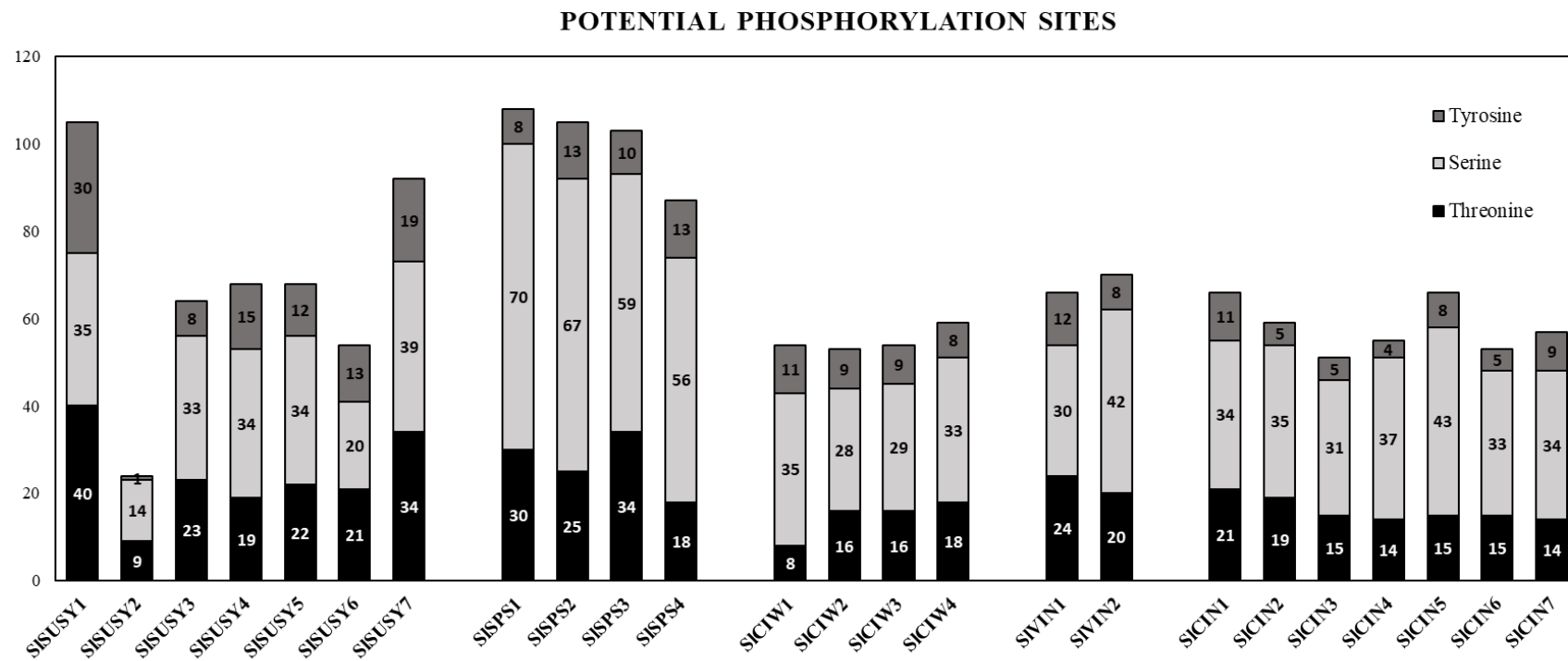


Figura 15. Potenciais sítios de fosforilação presentes nas proteínas SISUSYs, SISPSs, SICWIs, SIVINs, SICINs de *S.lycopersicum*.

6. Discussão

Foram encontrados no genoma de tomate sete genes pertencentes a família *SUSY*, quatro genes da família *SPS*, quatro genes da família *CWIN*, dois genes da família *VIN* e oito genes da família *CIN*s. Em estudo anterior foram descritos sete genes de *CIN* em tomate (RUAN, 2014). No genoma de *A. thaliana* foi encontrado um número de genes relativamente similar aos encontrados em tomate, sendo seis genes de *AtSUSY*, quatro de *AtSPS*, cinco de *AtCWIN*, dois de *AtVIN* e nove de *AtCIN*. As diferenças no número de genes entre *Solanum lycopersicum* e *A. thaliana* podem ser explicadas pela triplicação recente do genoma do tomate (The Tomato Genome Consortium, 2012).

O tamanho e a posição dos íntrons e éxons fornecem informações importantes sobre a evolução gênica. Nossa análise estrutural dos genes de tomate relacionados ao metabolismo de sacarose indicam que *SISUSY* têm de 10 à 14 íntrons (Figura 2B), consistente com as análises de *SUSY* de *Malus domestica* (TONG et al. 2017) e algodão (RUAN et al. 2008), que codificam de 10 à 14 íntrons, e *A. thaliana* (ZHANG et al. 2015) com 11 à 14 íntrons. As inferências indicam que essas características semelhantes nos genes da família *SUSY* entre plantas (dicotiledôneas e monocotiledôneas) podem contribuir para sua similaridade funcional dentro do mesmo grupo (ZHANG et al. 2015; TONG et al. 2017). Embora houvesse diferenças no número e tamanho do éxons-íntrons entre os sete genes *SISUSY* (Figura 2B), pode ser observado um alto nível de conservação dentro dos grupos, semelhante à alta similaridade observada por alinhamento múltiplo entre as sete sequências de aminoácidos (Figura 2C).

Os genes da *SPS* de tomate apresentaram a estrutura gênica altamente conservada e foram separadas em três grupos (Figura 4A-B), corroborando com os dados encontrados no genoma de *A. thaliana* (SUN et al. 2011). O número de íntrons oscilou entre 11 e 13 e o de éxons variou entre 12 e 14., os quais são similares com os relatados em *Oryza sativa* (CASTLEDEN et al. 2004) e *Zea mays* (LUTFIYYA et al. 2007). A filogenia dos genes de *SPS* sugere divergência entre monocotiledôneas e dicotiledôneas, evidenciando sucessivos eventos de duplicação gênica. As diferenças estruturais e evolutivas podem originar enzimas com diferentes funções biológicas (LUTFIYYA et al., 2007).

Para a família das *INVs* neutras, três genes (*SICIN1*, 5 e 7) com cinco íntrons se localizam no grupo α e quatro genes do grupo β apresentaram três íntrons (*SICIN3*, 4 e 6). O gene *SICIN8* do grupo α têm três íntrons, evidenciando a ausência dos íntron 4-5 (região 3') em relação ao *SICIN1* e o gene *SICIN2* do grupo β apresenta cinco íntrons,

devido o acréscimo de dois íntrons na região 5' (Figura 5A-C). As divergências na estrutura dos grupos sugerem que esses genes podem ter surgido de ancestrais distintos, e suas regiões intrônicas sofreram mudanças durante a evolução. Eventos semelhantes foram observados em *Malus domestica* (HYUN et al. 2011), *Brassica rapa* (EOM et al. 2019), *Oryza sativa* e *A. thaliana* (JI et al. 2005).

As INVs ácidas do tomate (Figura 6A-C), independentemente da localização, demonstraram estrutura de éxons-íntrons altamente conservada, que pode corresponder à estrutura do gene ancestral das INVs ácidas (JI et al. 2005). A estrutura de éxons-íntrons das INVs ligadas à parede celular do tomate (Figura 6) indica que ocorreu uma duplicação do íntron 1 na região 5' dos genes *SICWIN2* e 4 em relação ao gene *SICWIN1*. O gene *SICWIN3* teve uma perda do íntron 1 (região 3') e uma duplicação do íntron 2, sendo que todos os genes apresentaram o mesmo número de éxons e íntrons (Figura 6B). Entre as quatro isoformas CWIN no tomate, o *SICWIN1* está intimamente relacionado ao *SICWIN3* e o *SICWIN2* está mais relacionado ao *SICWIN4* (Figura 6A-B). O primeiro par é expresso nos órgãos reprodutivos, enquanto o último par é expresso principalmente nos tecidos vegetativos (GODT e ROITSCH, 1997). Resultados semelhantes foram encontrados em *A. thaliana*, em que *AtCWIN2* e *AtCWIN4* são predominantemente expressos em órgãos reprodutivos, enquanto *AtCWIN1* e *AtCWIN5* foram expressos constitutivamente (WANG et al. 2012). Os dois genes da INVs vacuolar (*SIVIN1* e 2) do tomate estão intimamente relacionados em nível dos aminoácidos e contém mesmo número de éxons e íntrons (Figura 6A-C).

As análises de sequências de aminoácidos para as proteínas das INVs ácidas (*SICWIN* e *SIVIN*) compartilham características em comum, pois ambas têm o motivo β -frutosidase (NDPN) na porção N-terminal e um sítio catalítico de WECPD contendo uma prolina (P) em CWINs e uma valina (V) WECVD em VINs e Glu-203/Glu -201 (EC) (LE ROY et al, 2007; WAN et al, 2018) (Figura 4C). As CWINs apresentam uma região hidrofóbica conservada (**WIN/WGN/WSGS**) que estabiliza a ligação com a sacarose e resíduos de Asp-239/Lys-242 (D e R) (LE ROY et al, 2007). Estudos de mutagênese *in vitro*, com uma única substituição de aminoácido D para A (Asp-239) transformou *A. thaliana* *AtCWIN1* (At3g13790) em uma proteína incapaz de hidrolisar sacarose. Desse modo, a presença ou ausência de Asp-239 (D) foi proposta como um determinante confiável para a identificação de INVs funcionais ou defeituosas (LE ROY et al. 2007; LE ROY et al. 2013).

A análise das sequências de aminoácidos referente à família das INV's neutras (SICINs) do tomate (Figura 4C) resultou na identificação de oito resíduos de aminoácidos nos motivos conservados, os quais também já foram relatados em *Oryza sativa* (JI et al, 2005), *Brassica rapa* (EOM et al. 2019), *A. thaliana* (QI et al. 2005) e *M. domestica* (HYUN et al. 2011).

Na família das SISUSYs de tomate (Figura 2), todas as sequências das sete enzimas apresentaram características típicas da família SUSY observadas em estudos anteriores (TONG et al. 2017; RUAN et al. 2008; ZHANG et al. 2015), como a presença dos domínios sacarose sintase e glycosyl transferase estreitamente ligados.

A SPS apresenta vários mecanismos regulatórios: regulação por F6P; UDPG e estresse osmótico (TOROSER e HUBER, 1997). Em espinafre e arroz, foi encontrado um local de fosforilação de Ser-424, que é reversivelmente fosforilado em resposta ao estresse osmótico (TOROSER e HUBER, 1997). Nas sequências de aminoácidos das SPS de tomate foram identificados vários motivos (F6P; UDPG e estresse osmótico) que podem estar associados com respostas regulatórias nas plantas (LUNN; MACRAE, 2003; WINTER e HUBER, 2000). Todos os genes das famílias caracterizadas apresentaram múltiplos potenciais sítios de fosforilação de Ser, Thr e Tyr (Figura 15) indicando que a atividade dessas proteínas pode ser modulada por meio de modificações pós-traducionais (PTMs), regulando vias de sinalização celular. Nas folhas de espinafre e de milho foram encontrados sítios de fosforilação (Ser₁₅₈, Ser₂₂₉, Ser₄₂₄ e Ser₁₆₂) da SPS envolvidos na regulação de claro/escuro, e na ativação do estresse osmótico (WINTER e HUBER, 2000).

Em plantas de tomate submetidas ao déficit hídrico (Figura 8A-D), foi observado a diminuição da *gs* (Figura 8C) em decorrência do fechamento estomático, que é o primeiro mecanismo fisiológico responsivo à diminuição do Ψ_w (Figura 8A). O fechamento estomático controla a perda de água pelo decréscimo na transpiração das plantas (Figura 8B), gerando maior resistência ao fluxo de CO₂ para as folhas, e consequentemente reduzindo as taxas fotossintéticas (Figura 8D), contribuindo dessa forma para o menor acúmulo de biomassa para a manutenção do desenvolvimento vegetal (CLAYES e INZÉ, 2013).

Nos frutos submetidos à deficiência hídrica, o SSC foi significativamente maior do que no controle, já o pH não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Figura 9). SSCs são os principais compostos osmóticos que se acumulam nos frutos, além de serem componentes determinantes na qualidade dos frutos (BECKLES et al,

2012). Estudos anteriores em tomates demonstraram um aumento no conteúdo de açúcar nos frutos submetidos a deficiência hídrica, no entanto, resultados opostos também foram encontrados (RIPOLL et al, 2016). Portanto, a ideia de que o déficit hídrico tem impacto positivo no sabor da fruta, depende do genótipo, da intensidade do estresse e do estágio de desenvolvimento do fruto (VEIT-KÖHLER et al, 1999; BERTIN et al, 2000; CHEN et al, 2014; KLUNKLIN et al, 2017). No entanto, a produtividade, o peso e o número de frutos (Tabela 2) foram afetados pela deficiência hídrica moderada. Já, os diâmetros do fruto foram pouco afetados pelo tratamento de deficiência hídrica. Diante disso, efeitos cumulativos ou transitórios são integrados pela planta ao longo do ciclo reprodutivo, o que pode levar a respostas marcadamente contrastantes em relação à produtividade e qualidade dos frutos/planta.

As correlações negativas entre SSC e Ψ_w e entre SSC e A/E evidencia que durante o déficit hídrico no tecido foliar ocorre o decréscimo do Ψ_w e da A/E, enquanto, no fruto ocorre acréscimo do SSC e do pH (Figura 10). O incremento do SSC é um mecanismo que permite que a planta sob déficit hídrico possa manter seu metabolismo, mesmo com a redução do Ψ_w dos tecidos. Isso ocorre devido à sua característica de osmoproteção e osmorregulação, que protege os componentes celulares dos danos causados pelo estresse (DAWOOD, 2016). Com isso, o incremento de açúcares solúveis está fortemente correlacionado à tolerância à seca nas plantas (ASHRAF e HARRIS, 2004). As correlações positivas demonstraram um padrão de resposta fisiológica esperado para o tecido foliar em plantas submetidas ao déficit hídrico (GATES e JAMES, 1959; REYNAFARJE et al. 2018; IHUOMA et al. 2019).

O estudo da expressão gênica das enzimas que metabolizam a sacarose fornece uma base inicial para a compreensão de sua resposta no desenvolvimento de frutos de tomate submetidos à deficiência hídrica. Nossos resultados evidenciam que nos estágios iniciais (MG e *Breaker*) do desenvolvimento do fruto ocorre maior atividade dos genes da *SISUSY*, *SISPS*, *SICWIN* e da *SICIN* (Figura 11). No último estágio do desenvolvimento do fruto (RR) observou-se maior expressão dos genes *SICIN1*, *SICIN5*, *SISPS1*, *SISUSY2*, *SISUSY3*, *SISUSY4*, *SISUSY6* e *SIVIN2*, destes os genes *SISUSY4*, *SISPS1* e o *SIVIN2* também foram induzidos no tratamento com ABA e déficit hídrico (Figura 12 e 13). No entanto, os genes *SICIN3*, *SICWIN2* e *SISUSY1* não foram regulados positivamente no RR, apenas no MG, mas foram responsivos ao ABA e ao déficit hídrico. Esses resultados estão de acordo com ZHANG et al (2009) e MOU et al (2015) os quais

elucidaram que o acúmulo de ABA atinge seu nível máximo nos estágios iniciais do desenvolvimento do fruto.

Na presença de ABA ocorreu regulação positiva da expressão dos genes *SISPS1*, *SISPS4*, *SISUSY1*, *SISUSY3*, *SISUSY4*, *SISUSY6*, *SICWIN2*, *SIVIN2* e *SICIN1* em frutos de tomate, principalmente induzindo a expressão dos genes que participam da degradação da sacarose (Figura 13). Nossos resultados sugerem que a expressão de genes atuantes no metabolismo da sacarose é induzida por ABA. Esta ideia é reforçada pelo fato de que alterações no metabolismo de carboidratos já foram observadas em tratamento com ABA (DALOSO et al., 2015; YOSHIDA et al., 2019; SIEBENEICHLER et al., 2020). Coletivamente, os genes da sacarose apresentaram em suas regiões promotoras cis-elementos regulatórios responsivo ao ABA (ABRE), indicando fortemente que eles são ativados transcricionalmente na via de sinalização de ABA (YOSHIDA et al., 2019). Essa regulação da transcrição pode ser importante, pelo menos em parte, para controlar o fluxo metabólico na direção necessária em condições de estresse por seca.

Os genes *SICWIN2*, *SIVIN2*, *SICIN3*, *SISPS1* e *SISUSY4* foram induzidos no tratamento de deficiência hídrica (Figura 12). Dessa forma, esses genes podem estar correlacionados com aumento de sacarose nos frutos de tomate sob deficiência, evidenciado pelo aumento significativo de SSC (°Brix) (Figura 8). Resultados similares foram relatados em *Manihot esculenta*, em que os genes das INVs, incluindo *MeINV1*, *MeINV3*, *MeINV7* e *MeINV8* (LIAO et al, 2017) foram regulados positivamente durante o déficit hídrico e em *Triticum aestivum* com os genes *SPS3*, *SUS1* e das INVs neutras.

Os genes *AtSUS1* (AT5G20830), *AtSUS4* (AT3G43190) de *A. thaliana* e o gene *MeSUS2* (Manes.01G221900) de *Manihot esculenta* tiveram seu perfil transcricional induzidos em situações de deficiência hídrica, sendo que o *MeSUS2* foi considerado um fator determinante no metabolismo da sacarose sob déficit hídrico. Em nossos resultados, o *SISUSY4* é ortólogo do *AtSUS4* e do *MeSUS2* (BAUD et al, 2004; LIAO et al, 2017). Com base nesses resultados sugerimos que os genes de tomate das famílias SUSY, SPS e INVs tem um papel estimulante no metabolismo da sacarose, em situações de deficiência hídrica.

Trabalhos anteriores em *Populus tremula* (PELAH et al, 1997), *Spinacia oleracea* (QUICK et al, 1989), *Hevea brasiliensis* (XIAO et al, 2014), *Nicotiana tabacum* (WANG et al, 2015), *Malus domestica* (TONG et al, 2018), *Brassica rapa* (EOM et al, 2019) e *Solanum tuberosum* (GEIGENBERGER et al, 1999) relataram acúmulo dos transcritos que metabolizam sacarose em condições de deficiência hídrica, mas ainda são

restritas as informações referentes a atividade dessas enzimas em frutos submetidos a déficit hídrico.

Além disso, a presença de elementos *cis*-regulatórios com ABRE, MBS, G-BOX e TC-rich repeats corrobora com essa resposta, visto que, são elementos responsivos ao ABA e ao estresse hídrico (Figura 14). Esses resultados sugerem que esses genes são regulados transcricionalmente, e são responsivos a sinais endógenos (hormônios vegetais), estímulos físicos externos (estresses bióticos e abióticos) (GARCIA et al, 2014).

7. Conclusão

No presente estudo foram caracterizados 25 genes envolvidos no metabolismo da sacarose, distribuídos em cinco famílias gênicas. As enzimas apresentaram domínios conservados similares com as sequências previamente caracterizadas em outras espécies vegetais, indicando que são proteínas funcionais. A expressão desses genes pode ser regulada em nível transcricional por sinais endógenos e ambientais, incluindo ABA e seca, como demonstrado pelos *cis*-elementos regulatórios nas regiões promotoras, bem como em nível pós-traducional, conforme sugerido pelos potenciais sítios de fosforilação.

O nosso conjunto de dados sugere que o aumento no conteúdo de açúcares solúveis do fruto em resposta ao déficit hídrico é causado, pelo menos em parte, pela indução significativa nos níveis de expressão de genes específicos codificando para SPS, SUSY e INVs. Tais genes são preferencialmente expressos durante o estágio de amadurecimento do fruto, em condições ideais de disponibilidade hídrica, e têm seus níveis de expressão aumentados em resposta ao déficit hídrico, o que reforça as suas relações com o conteúdo de açúcares solúveis do fruto.

Um modelo dos efeitos do déficit hídrico sobre as enzimas do metabolismo da sacarose no fruto é proposto na Figura 16. De acordo com o modelo proposto, o déficit hídrico induz o aumento transcricional de *SICWIN2*, cuja atividade enzimática contribui para o aumento do pool de hexoses no apoplasto. A maior parte das hexoses geradas no apoplasto é reconvertida a sacarose no citosol pela ação da *SISPS1*, cuja expressão em nível transcricional é induzida por déficit hídrico. Os pools de sacarose são invertidos em hexoses no citosol e no vacúolo pela respectiva ação de *SISUSY1* e 4, *SICIN3* e *SIVIN2*, que também são transcricionalmente induzidas por déficit hídrico.

Coletivamente, os resultados permitem concluir que o déficit hídrico induz o aumento da expressão de genes do metabolismo da sacarose no fruto, contribuindo para a estimulação do metabolismo de açúcares. Os genes do metabolismo da sacarose identificados no presente estudo como induzíveis pelo déficit hídrico poderão ser utilizados para o desenvolvimento de estratégias de melhoramento visando melhorar a adaptação das plantas de frutos carnosos à baixa disponibilidade hídrica, por meio do aumento da tolerância à seca do fruto e da sua qualidade organoléptica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVINO, A.; D'ANDRIA, R.; ZERBI, G. Fruit ripening of different tomato cultivars as influenced by irrigation regime and time of harvesting. In: **IV International Symposium on Water Supply and Irrigation in the Open and under Protected Cultivation 228**. 1985. p. 137-146.

ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ØRNTTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer research**, v. 64, n. 15, p. 5245-5250, 2004.

ASHRAF, M. P. J. C.; HARRIS, P. J. C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant science**, v. 166, n. 1, p. 3-16, 2004.

BARONE, A.; CHIUSANO, M. L.; ERCOLANO, M. R.; GIULIANO, G.; GRANDILLO, S.; FRUSCIANTE, L. Structural and functional genomics of tomato. **International journal of plant genomics**, v. 2008, 2008.

BARRERO, C.S.; HERNANDO, S.A.; GONZÁLEZ, P.M.; CARBONERO, P. Structure, expression profile and subcellular localisation of four different sucrose synthase genes from barley. **Planta**, v. 234, n. 2, p. 391-403, 2011.

BARKER, L.; KUHN, C.; WEISE, A.; SCHULZ, A.; GEBHARDT, C.; HIRNER, B. SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. **Plant Cell**, v.12, p.1153–1164, 2000.

BAUD, S.; VAULTIER, M.N.; ROCHAT, C. Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 396, p. 397-409, 2004

BEDINGER, P. Interspecific reproductive barriers in the tomato clade: opportunities to decipher mechanisms of reproductive isolation. **Sexual Plant Reproduction**, v.24, n.3, p.171-187, 2010.

BERGOUGNOUX, V. The history of tomato: From domestication to biopharming. **Plant Biotechnology Journal**, v.32, n.1, p.170-189, 2014.

BERTIN, N.; GUICHARD, S.; LEONARDI, C.; LONGUENESSE, J. J.; LANGLOIS, D.; NAVEZ, B. Seasonal evolution of the quality of fresh glasshouse tomatoes under Mediterranean conditions, as affected by air vapour pressure deficit and plant fruit load. **Annals of Botany**, v. 85, n. 6, p. 741-750, 2000.

BERTIN, P.; GALLAIS, A. Genetic variation for nitrogen use efficiency in a set of recombinant inbred lines II-QTL detection and coincidences. **Maydica**, v. 46, n. 1, p. 53-68, 2001.

BLANCA, J. Variation Revealed by SNP Genotyping and Morphology. **Experimental Botany**, v. 63, n. 3, p. 1155-1166, 2011.

BRAUN, D. M.; WANG, L.; RUAN, Y.L. Understanding and manipulating sucrose phloem loading, unloading, metabolism, and signalling to enhance crop yield and food security. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 7, p. 1713-1735, 2014.

BÜTTNER, M. The Arabidopsis sugar transporter (AtSTP) family: an update. **Plant Biology**, v. 12, p. 35-41, 2010.

CANNON, S. B.; MITRA, A.; BAUMGARTEN, A.; YOUNG, N. D.; MAY, G. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. **BMC plant biology**, v. 4, n. 1, p. 10, 2004.

CASTILLEJO, M.; MALDONADO, A. M.; OGUETA, S.; JORRÍN, J. V. Proteomic analysis of responses to drought stress in sunflower (*Helianthus annuus*) leaves by 2DE gel electrophoresis and mass spectrometry. **The Open Proteomics Journal**, v. 1, n. 1, 2008.

CASTLEDEN, C. K.; AOKI, N.; GILLESPIE, V. J.; MACRAE, E. A.; QUICK, W. P.; BUCHNER, P.; LUNN, J. E. Evolution and function of the sucrose-phosphate synthase gene families in wheat and other grasses. **Plant Physiology**, v. 135, n. 3, p. 1753-1764, 2004.

ÇELİK, Ö.; AYAN, A.; ATAĞ, Ç. Enzymatic and non-enzymatic comparison of two different industrial tomato (*Solanum lycopersicum*) varieties against drought stress. **Botanical Studies**, v.58, n. 32, p. 1-16, 2017.

CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J.S. Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. **Functional plant biology**, v. 30, n. 3, p. 239-264, 2003.

CHEN, J.; KANG, S.; DU, T.; GUO, P.; QIU, R.; CHEN, R.; GU, F. Modeling relations of tomato yield and fruit quality with water deficit at different growth stages under greenhouse condition. **Agricultural water management**, v. 146, p. 131-148, 2014.

CHEN, Z.; GAO, K.; SU, X.; RAO, P.; AN, X. Genome-wide identification of the invertase gene family in *Populus*. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0138540, 2015.

CLAEYS, H.; INZÉ, D. The Agony of Choice: How Plants Balance Growth and Survival under Water-Limiting Conditions. **Plant Physiology**. v. 162, n. 4, p. 1768–79, 2013.

COLEMAN, H.D.; ELLIS, D.D.; GILBERT, M.; MANSFIELD, S.D. Up-regulation of sucrose synthase and UDP-glucose pyrophosphorylase impacts plant growth and metabolism. **Plant Biotechnol. J.**, v.4, p.87–101, 2006.

COSTA, J. M.; ORTUÑO, MARIA F.; CHAVES, M. M. Deficit irrigation as a strategy to save water: physiology and potential application to horticulture. **Journal of integrative plant biology**, v. 49, n. 10, p. 1421-1434, 2007.

- DAHIYA, A.; SAINI, R.; SAINI, H. S.; DEVI, A. Sucrose metabolism: Controls the sugar sensing and generation of signalling molecules in plants. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, n. 4, p. 1563-1572, 2017.
- DAHRO, B.; WANG, F.; PENG, T.; LIU, J. H. (2016). PtrA/NINV, an alkaline/neutral invertase gene of *Poncirus trifoliata*, confers enhanced tolerance to multiple abiotic stresses by modulating ROS levels and maintaining photosynthetic efficiency. **BMC plant biology**. V.16, n.1, p.76, 2016.
- DALOSO, D. M.; ANTUNES, W. C.; PINHEIRO, D. P.; WAQUIM, J. P.; ARAÚJO, W. L.; LOUREIRO, M. E.; WILLIAMS, T. C. Tobacco guard cells fix CO₂ by both Rubisco and PEP case while sucrose acts as a substrate during light-induced stomatal opening. **Plant, cell & environment**, v. 38, n. 11, p. 2353-2371, 2015.
- DAWOOD, M.G. Influence of osmoregulators on plants tolerance to water stress. **Scientia Agriculturae**, v.13, p.42-58, 2016.
- EOM, S.H.; RIM, Y.; HYUN, T.K. Genome-wide identification and evolutionary analysis of neutral/alkaline invertases in *Brassica rapa*. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 33, n. 1, p. 1158-1163, 2019.
- FAN, J.; WANG, H.; LI, X.; SUI, X.; ZHANG, Z. Down-regulating cucumber sucrose synthase 4 (CsSUS4) suppresses the growth and development of flowers and fruits. **Plant and Cell Physiology**, v. 60, n. 4, p. 752-764, 2018.
- FAO... Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Acesso realizado dia 23 de outubro de 2019.
- FAO-FAOSTAT. Database Results. 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/statistics/databases/en/>>. Acesso em: 16 out. 2019.
- FENG, C. Y.; HAN, J. X.; HAN, X. X.; JIANG, J. Genome-wide identification, phylogeny, and expression analysis of the SWEET gene family in tomato. **Gene**, v.573, n.2, p.261-272, 2015.
- FILGUEIRA, F. A. R. Novo Manual de Olericultura – Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3ª edição. Viçosa, MG. UFV.
- GARCIA, C.M. H.; FINER, J. J. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. **Plant Science**, v. 217, p. 109-119, 2014.
- GEIGENBERGER, P.; REIMHOLZ, R.; DEITING, U.; SONNEWALD, U.; STITT, M. Decreased expression of sucrose phosphate synthase strongly inhibits the water stress-induced synthesis of sucrose in growing potato tubers. **The Plant Journal**, v. 19, n. 2, p. 119-129, 1999.
- GIOVANNONI, J. J. Genetic regulation of fruit development and ripening. **The plant cell**, v. 16, p. 170-180, 2004.

GATES, C. T.; BONNER, J. The Response of The Young Tomato Plant to a Brief Period of Water Shortage. IV. Effects of Water Stress on the Ribonucleic Acid Metabolism of Tomato Leaves. **Plant physiology**, v. 34, n. 1, p. 49, 1959.

GODT, D.E.; ROITSCH, T. Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism. **Plant physiology**, v.115, n.1, p. 273-282, 1997.

GONG, X.; LIU, M.; ZHANG, L.; RUAN, Y.; DING, R.; JI, Y.; WANG, C. Arabidopsis AtSUC2 and AtSUC4, encoding sucrose transporters, are required for abiotic stress tolerance in an ABA-dependent pathway. **Physiologia plantarum**, v. 153, n. 1, p. 119-136, 2015.

GOREN, S.; HUBER, S. C.; GRANOT, D. Comparison of a novel tomato sucrose synthase, SISUS4, with previously described SISUS isoforms reveals distinct sequence features and differential expression patterns in association with stem maturation. **Planta**, v. 233, n. 5, p. 1011-1023, 2011.

GUO, A. Y.; ZHU, Q. H.; CHEN, X.; LUO, J. C. GSDS: a gene structure display server. **Yi chuan= Hereditas**, v. 29, n. 8, p. 1023-1026, 2007.

HAYES, M.A.; FEECHAN, A.; DRY, I.B. Involvement of abscisic acid in the coordinated regulation of a stress-inducible hexose transporter (VvHT5) and a cell wall invertase in grapevine in response to biotrophic fungal infection. **Plant Physiology**, v. 153, n. 1, p. 211-221, 2010.

HEUVELINK, Ep (Ed.). **Tomatoes**. CABI, 2018.

HIROSE, T.; SCOFIELD, G. N.; TERAOKA, T. An expression analysis profile for the entire sucrose synthase gene family in rice. **Plant Science**, v. 174, n. 5, p. 534-543, 2008.

HOCKEMA, B.R.; ETXEBERRIA, E. Metabolic contributors to drought-enhanced accumulation of sugars and acids in oranges. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 126, p.599–605, 2001.

HYUN, T. K.; EOM, S. H.; KIM, J. S. Genomic analysis and gene structure of the two invertase families in the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). **Plant Omics**, v. 4, n. 7, p. 391-9, 2011.

HYUN, T.K.; EOM, S.H.; KIM, J.S. Genomic analysis and gene structure of the two invertase families in the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). **Plant Omics**, v. 4, n. 7, p. 391-9, 2011.

IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em: <
https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag_2018_maio.pdf>
Acesso em: 12 dez. 2019.

- IHUOMA, S. O.; MADRAMOOTOO, C. A. Sensitivity of spectral vegetation indices for monitoring water stress in tomato plants. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 163, p. 104860, 2019.
- Ji, X.; VAN, D.E.W.; VAN, L. A.; CHENG, S.; BENNETT, J. Structure, evolution, and expression of the two invertase gene families of rice. **Journal of Molecular Evolution**, v. 60, n. 5, p. 615-634, 2005.
- JIA, H.; JIU, S.; ZHANG, C.; WANG, C.; TARIQ, P.; LIU, Z.; FANG, J. Absciscic acid and sucrose regulate tomato and strawberry fruit ripening through the abscisic acid-stress-ripening transcription factor. **Plant biotechnology journal**, v. 14, n. 10, p. 2045-2065, 2016.
- JIA, L.; ZHANG, B.; MAO, C.; LI, J.; WU, Y.; WU, P.; WU, Z. OsCYT-INV1 for alkaline/neutral invertase is involved in root cell development and reproductivity in rice (*Oryza sativa* L.). **Planta**, v. 228, n. 1, p. 51-59, 2008.
- JIANG, S. Y.; CHI, Y. H.; WANG, J. Z.; ZHOU, J. X.; CHENG, Y. S.; ZHANG, B. L. Sucrose metabolism gene families and their biological functions. **Scientific reports**, v. 5, p.17583, 2015.
- JUÁREZ-COLUNGA, S.; LÓPEZ-GONZÁLEZ, C.; MORALES-ELÍAS, N. C.; MASSANGE-SÁNCHEZ, J. A.; TRACHSEL, S.; TIESSEN, A. Genome-wide analysis of the invertase gene family from maize. **Plant molecular biology**, v. 97, n. 4-5, p. 385-406, 2018.
- KAUR, A.; PATI, P. K.; PATI, A. M.; NAGPAL, A. K. In-silico analysis of cis-acting regulatory elements of pathogenesis-related proteins of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. **Plos one**, v. 12, n. 9, p. e0184523, 2017.
- KHAPTE, P. S.; KUMAR, P.; BURMAN, U.; KUMAR, P. Deficit irrigation in tomato: Agronomical and physio-biochemical implications. *Scientia horticulturae*, v. 248, p. 256-264, 2019.
- KLEPEK, Y. S.; VOLKE, M.; KONRAD, K. R.; WIPPEL, K.; HOTH, S.; HEDRICH, R.; SAUER, N. *Arabidopsis thaliana* POLYOL/MONOSACCHARIDE TRANSPORTERS 1 and 2: fructose and xylitol/H⁺ symporters in pollen and young xylem cells. **Journal of experimental botany**, v. 61, n. 2, p. 537-550, 2010.
- KLUNKLIN, W; SAVAGE, G. Effect on quality characteristics of tomatoes grown under well-watered and drought stress conditions. **Foods**, v. 6, n. 8, p. 56, 2017.
- KOCH, K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. **Current opinion in plant biology**, v. 7, n. 3, p. 235-246, 2004.
- KOMATSU, A., TAKANOKURA, Y., AKIHAMA, T., OMURA, M. Cloning and molecular analysis of cDNAs encoding three sucrose phosphate synthase isoforms from a citrus fruit (*Citrus unshiu* Marc.). **Molecular and General Genetics MGG**, v. 252, n. 3, p. 346-351, 1996.

- KRANNICH, C.; MALETZKI, L.; KUROWSKY, C.; HORN, R. Network candidate genes in breeding for drought tolerant crops. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 7, p. 16378-16400, 2015.
- KÜHN, C.; GROF, C. P. L. Sucrose transporters of higher plants. **Current opinion in plant biology**, v. 13, n. 3, p. 287-297, 2010.
- KUMAR, P., ROUPHAEL, Y., CARDARELLI, M., COLLA, G. Vegetable grafting as a tool to improve drought resistance and water use efficiency. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 1130, 2017.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.
- KUSCU, H., TURHAN, A., OZMEN, N., AYDINOL, P., DEMIR, A. O. Optimizing levels of water and nitrogen applied through drip irrigation for yield, quality, and water productivity of processing tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, v. 55, n. 2, p. 103-114, 2014.
- LANGENKÄMPER, G.; MCHALE, R.; GARDNER, R. C.; MACRAE, E. Sucrose-phosphate synthase steady-state mRNA increases in ripening kiwifruit. **Plant molecular biology**, v. 36, n. 6, p. 857-869, 1998.
- LE ROY, K.; LAMMENS, W.; VERHAEST, M.; CONINCK, B.; RABIJNS, A.; VAN, L. A.; VAN, D.E.W. Unraveling the difference between invertases and fructan exohydrolases: a single amino acid (Asp-239) substitution transforms Arabidopsis cell wall invertase1 into a fructan 1-exohydrolase. **Plant Physiology**, v. 145, n. 3, p. 616-625, 2007.
- LE ROY, K.; VERGAUWEN, R.; STRUYF, T.; YUAN, S.; LAMMENS, W.; MÁTRAI, J.; MAEYER, M.; VAN, D.E.W. Understanding the role of defective invertases in plants: tobacco Nin88 fails to degrade sucrose. **Plant Physiology**, v.161, n. 4, p.1670-1681, 2013.
- LEMOINE, R. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1465, n. 1, p. 246-262, 2000.
- LI, Z., PALMER, W. M., MARTIN, A. P., WANG, R., RAINSFORD, F., JIN, Y., E RUAN, Y. L. High invertase activity in tomato reproductive organs correlates with enhanced sucrose import into, and heat tolerance of, young fruit. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 3, p. 1155-1166, 2011.
- LIAO, W. B., LI, Y. Y., LU, C., PENG, M. Expression of sucrose metabolism and transport genes in cassava petiole abscission zones in response to water stress. **Biologia Plantarum**, v. 61, n. 2, p. 219-226, 2017.

- LIN, T.; ZHU, G.; ZHANG, J.; XU, X.; YU, Q.; ZHENG, Z.; HUANG, Z. Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. **Nature genetics**, v. 46, n. 11, p. 1220, 2014.
- LIU, E. K.; MEI, X. R.; YAN, C. R.; GONG, D. Z.; ZHANG, Y. Q. Effects of water stress on photosynthetic characteristics, dry matter translocation and WUE in two winter wheat genotypes. **Agricultural Water Management**, v. 167, p. 75-85, 2016.
- LOZANO, R., GIMÉNEZ, E., CARA, B., CAPEL, J., ANGOSTO, T. Genetic analysis of reproductive development in tomato. **International Journal of Developmental Biology**, v. 53, n. 8-9-10, p. 1635-1648, 2009.
- LUDEWIG, F.; FLÜGGE, U. Role of metabolite transporters in source-sink carbon allocation. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 231, 2013.
- LUNN, J.E.; MACRAE, E. New complexities in the synthesis of sucrose. **Current opinion in plant biology**, v. 6, n. 3, p. 208-214, 2003.
- LUTFIYYA, L. L.; XU, N.; ROBERT, L. D.; MORRELL, J. A.; MILLER, P. W.; DUFF, S. M. Phylogenetic and expression analysis of sucrose phosphate synthase isozymes in plants. **Journal of plant physiology**, v. 164, n. 7, p. 923-933, 2007.
- MARTÍN, M. L.; LECHNER, L.; ZABALETA, E. J.; SALERNO, G. L. A mitochondrial alkaline/neutral invertase isoform (A/N-InvC) functions in developmental energy-demanding processes in Arabidopsis. **Planta**, v. 237, n. 3, p. 813-822, 2013.
- MARTÍNEZ, M.T.; CHÁVEZ, T.B.; LIMONES, V.B.; SIMPSON, J.; HERRERA, L.E. Functional analysis of the promoter of the rice sucrose phosphate synthase gene (sps1). **Plant science**, v. 166, n. 1, p. 131-140, 2004.
- MCLAUGHLIN, J. E.; BOYER, J. S. Sugar-responsive gene expression, invertase activity, and senescence in aborting maize ovaries at low water potentials. **Annals of Botany**, v. 94, n. 5, p. 675-689, 2004.
- MOU, W.; LI, D.; LUO, Z.; MAO, L.; YING, T. Transcriptomic analysis reveals possible influences of ABA on secondary metabolism of pigments, flavonoids and antioxidants in tomato fruit during ripening. **PLoS One**, v. 10, n. 6, 2015.
- MURSHED, R.; LOPEZ-LAURI, F.; SALLANON, H. Effect of water stress on antioxidant systems and oxidative parameters in fruits of tomato (*Solanum lycopersicon* L, cv. Micro-tom). **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 19, n. 3, p. 363-378, 2013.
- NASCIMENTO, J.R.O.; CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F. M. E.; ALCOCER, M. J. C. Banana sucrose-phosphate synthase gene expression during fruit ripening. **Planta**, v. 203, n. 3, p. 283-288, 1997.
- NGUYEN-QUOC, B.; FOYER, C.H. A role for 'futile cycles' involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 358, p. 881-889, 2001.

- NONIS, A.; RUPERTI, B.; PIERASCO, A.; CANAGUIER, A.; ADAM-BLONDON, A. F.; DI GASPERO, G.; VIZZOTTO, G. Neutral invertases in grapevine and comparative analysis with Arabidopsis, poplar and rice. **Planta**, v. 229, n. 1, p. 129, 2008.
- NORA, L.; DALMAZO, G.O.; NORA, F.R.; ROMBALDI, C.V. Controlled water stress to improve fruit and vegetable postharvest quality. **Water Stress**, p. 59-72, 2012.
- OHYAMA, A.; ITO, H.; SATO, T.; NISHIMURA, S.; IMAI, T.; HIRAI, M. Suppression of acid invertase activity by antisense RNA modifies the sugar composition of tomato fruit. **Plant and cell physiology**, v. 36, n. 2, p. 369-376, 1995.
- PELAH, D.; WANG, W.; ALTMAN, A.; SHOSEYOV, O.; BARTELS, D. Differential accumulation of water stress-related proteins, sucrose synthase and soluble sugars in Populus species that differ in their water stress response. **Physiologia Plantarum**, v. 99, n. 1, p. 153-159, 1997.
- PESARESI, P.; MIZZOTTI, C.; COLOMBO, M.; MASIERO, S. Genetic regulation and structural changes during tomato fruit development and ripening. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 1-14, 2014.
- PRIOUL, J. L.; PELLESCI, S.; SÉNE, M.; THÉVENOT, C.; CAUSSE, M.; VIENNE, D.; LEONARDI, A. From QTLs for enzyme activity to candidate genes in maize. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, n. 337, p. 1281-1288, 1999.
- Provides Insight into the Origin of the Tomato. **PLoS ONE**, v.7, n.10, p. 1-17, 2012.
- QI, X.; WU, Z.; LI, J.; MO, X.; WU, S.; CHU, J.; WU, P. AtCYT-INV1, a neutral invertase, is involved in osmotic stress-induced inhibition on lateral root growth in Arabidopsis. **Plant molecular biology**, v. 64, n. 5, p. 575-587, 2007.
- QIAN, W.; YUE, C.; WANG, Y.; CAO, H.; LI, N.; WANG, L.; YANG, Y. Identification of the invertase gene family (INVs) in tea plant and their expression analysis under abiotic stress. **Plant cell reports**, v. 35, n. 11, p. 2269-2283, 2016.
- QUICK, P.; SIEGL, G.; NEUHAUS, E.; FEIL, R.; STITT, M. Short-term water stress leads to a stimulation of sucrose synthesis by activating sucrose-phosphate synthase. **Planta**, v. 177, n. 4, p. 535-546, 1989.
- R Core Team. “**R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria”. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>, Acesso em: 28/10/2019.
- REUSCHER, S.; AKIYAMA, M.; YASUDA, T.; MAKINO, H.; AOKI, K.; SHIBATA, D.; SHIRATAKE, K. The sugar transporter inventory of tomato: genome-wide identification and expression analysis. **Plant and Cell Physiology**, v. 55, n. 6, p. 1123-1141, 2014.
- REYNAFARJE, X; CASAS, A; SCHREVEENS, E. Effect of water stress during reproductive stage on tomato crop yield and soil water content. In: **International**

Symposium on Water and Nutrient Relations and Management of Horticultural Crops, 2018.

RICK, C. M. Tomato-Like Nightshades: Affinities, Autoecology, and Breeders Opportunities. **Economic Botany**, v.42, n.2, p. 145-54, 1988.

ROITSCH, T.; GONZÁLEZ, M.C. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. **Trends in plant science**, v. 9, n. 12, p. 606-613, 2004.

ROCHA, D. K.; MACIEL, G. M.; JUNIOR, E. F. F.; JÚNIOR, C. S. M.; NOGUEIRA, G. G. S.; ALMEIDA, R. S. Seleção de genótipos de tomateiro submetidos ao estresse hídrico em função da expressão de características fisiológicas. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 11, n. 2, p. 80-84, 2016.

RUAN, Y. L.; JIN, Y.; YANG, Y. J.; LI, G. J.; BOYER, J. S. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat. **Molecular Plant**, v. 3, n. 6, p. 942-955, 2010.

RUAN, Y. L.; LLEWELLYN, D. J.; LIU, Q.; XU, S. M.; WU, L. M.; WANG, L.; FURBANK, R. T. Expression of sucrose synthase in the developing endosperm is essential for early seed development in cotton. **Functional plant biology**, v. 35, n. 5, p. 382-393, 2008.

RUAN, Y.L. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. **Annual review of plant biology**, v. 65, p. 33-67, 2014.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstruction of phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**, v. 4, p. 406–425, 1987.

SANT’ANA, D. V. P.; LEFSRUD, M. Tomato proteomics: Tomato as a model for crop proteomics. **Scientia Horticulturae**, v. 239, p. 224-233, 2018.

SCHOLZ-STARKE, J.; BÜTTNER, M.; SAUER, N. AtSTP6, a new pollen-specific H⁺-monosaccharide symporter from Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 131, n. 1, p. 70-77, 2003.

SENEWEERA, S.P.; BASRA, A.S.; BARLOW, E.W.; CONROY, J.P. et al. Diurnal regulation of leaf blade elongation in rice by CO₂ (is it related to sucrose-phosphate synthase activity?). **Plant Physiology**, v. 108, n. 4, p. 1471-1477, 1995.

SHAO, H.B.; CHU, L.Y.; WU, G.; ZHANG, J.H.; LU, Z.H.; HU, Y.C.; (2007) Changes of some anti-oxidative physiological indices under soil water deficits among 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at tillering stage. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v.54, p.143–149, 2007.

SHARMA, S.; VILLAMOR, J.G.; VERSLUES, P.E. Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. **Plant Physiol.** v.157, p.292–304, 2011.

SHEN, L. B., YAO, Y., HE, H., QIN, Y. L., LIU, Z. J., LIU, W. X., YANG, Y. Genome-Wide Identification, Expression, and Functional Analysis of the Alkaline/Neutral Invertase Gene Family in Pepper. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, p. 224, 2018.

STRAND, Å.; FOYER, C. H.; GUSTAFSSON, P.; GARDESTRÖM, P.; e HURRY, V. Altering flux through the sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic acclimation at low temperatures and the development of freezing tolerance. **Plant, Cell & Environment**, v. 26, n. 4, p. 523-535, 2003.

STURM, A. Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. **Plant physiology**, v. 121, n. 1, p. 1-8, 1999.

SIEBENEICHLER, T. J.; CRIZEL, R. L.; CAMOZATTO, G. H.; PAIM, B. T.; SILVA, R.M.; ROMBALDI, C. V.; GALLI, V. The postharvest ripening of strawberry fruits induced by abscisic acid and sucrose differs from their in vivo ripening. **Food Chemistry**, v. 317, p. 126407, 2020.

SUN, J.; LOBODA, T.; SUNG, S. J. S.; BLACK, C. C. Sucrose synthase in wild tomato, *Lycopersicon chmielewskii*, and tomato fruit sink strength. **Plant Physiology**, v. 98, n. 3, p. 1163-1169, 1992.

SUN, J.; ZHANG, J.; LARUE, C. T.; HUBER, S. C. Decrease in leaf sucrose synthesis leads to increased leaf starch turnover and decreased RuBP regeneration-limited photosynthesis but not Rubisco-limited photosynthesis in *Arabidopsis* null mutants of *SPSA1*. **Plant, cell & environment**, v. 34, n. 4, p. 592-604, 2011.

THOMPSON, A.J.; ANDREW, S J.; MULHOLLAND, B.J.; MCKEE, J.M.T.; HILTON, H.W.; HORRIDGE, J.S.; FARQUHAR, G.D.; SMEETON, R.C.; SMILLIE, I.R.A.; BLACK C.R. Overproduction of abscisic acid in tomato increases transpiration efficiency and root hydraulic conductivity and influences leaf expansion. **Plant Physiol.** v.143, p.1905–1917, 2007.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [Nucleic Acids Res. 1994] - PubMed result. **Nucleic Acids Research**, p. 4673 – 4680, 1994.

TONG, X. L.; WANG, Z. Y.; MA, B. Q.; ZHANG, C. X.; ZHU, L. C.; MA, F.; LI, M. Structure and expression analysis of the sucrose synthase gene family in apple. **J. Integrat. Agric**, v. 17, p. 847-856, 2018.

TOROSER, D.; HUBER, S. C. Protein phosphorylation as a mechanism for osmotic-stress activation of sucrose-phosphate synthase in spinach leaves. **Plant Physiology**, v.114, n.3, p.947-955, 1997.

VARGAS, W A.; PONTIS, H.G.; SALERNO, G.L. Differential expression of alkaline and neutral invertases in response to environmental stresses: characterization of an alkaline isoform as a stress-response enzyme in wheat leaves. **Planta**, v. 226, n. 6, p. 1535-1545, 2007.

- VAUGHN, M. W.; HARRINGTON, G. N.; BUSH, D. R. Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v.99, p.10876–10880, 2002.
- VEIT-KÖHLER, U.; KRUMBEIN, A.; KOSEGARTEN, H. Effect of different water supply on plant growth and fruit quality of *Lycopersicon esculentum*. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 162, n. 6, p. 583-588, 1999.
- VIGNAULT, C.; VACHAUD, M.; CAKIR, B.; GLISSANT, D.; DÉDALDÉCHAMP, F.; BÜTTNER, M.; DELROT, S. VvHT1 encodes a monosaccharide transporter expressed in the conducting complex of the grape berry phloem. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 415, p. 1409-1418, 2005.
- VILELA, N. J.; MELO, P. C. T.; BOITEUX, L. S.; CLEMENTE, F. M. V. T. Perfil socioeconômico da cadeia agroindustrial no Brasil. In: CLEMENTE, F. M. V. T.; BOITEUX, L. S. (Ed.). Produção de tomate para processamento industrial. Brasília: Embrapa, 2012. Cap. 1, p. 17-27.
- WAN, H.; WU, L.; YANG, Y.; ZHOU, G.; RUAN, Y. L. Evolution of sucrose metabolism: the dichotomy of invertases and beyond. **Trends in plant science**, v. 23, n. 2, p. 163-177, 2018.
- WANG, L.; RUAN, Y. L. New insights into roles of cell wall invertase in early seed development revealed by comprehensive spatial and temporal expression patterns of GhCWIN1 in cotton. **Plant Physiology**, v.160, n.2, p.777-787, 2012.
- WANG, Z.; WEI, P.; WU, M.; XU, Y.; LI, F.; LUO, Z.; LIN, F. Analysis of the sucrose synthase gene family in tobacco: structure, phylogeny, and expression patterns. **Planta**, v. 242, n. 1, p. 153-166, 2015.
- WELHAM, T.; PIKE, J.; HORST, I.; FLEMETAKIS, E.; KATINAKIS, P.; KANEKO, T.; WANG, T. L. A cytosolic invertase is required for normal growth and cell development in the model legume, *Lotus japonicus*. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 12, p. 3353-3365, 2009.
- WILSON, R.L.; KIM, H.; BAKSHI, A.; BINDER, B.M. The ethylene receptors ETHYLENE RESPONSE1 and ETHYLENE RESPONSE2 have contrasting roles in seed germination of *Arabidopsis* during salt stress. **Plant Physiol.** v.165, p.1353–1366, 2014.
- WINGLER, A.; LEA, P. J.; QUICK, W. P.; LEEGOOD, R. C. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 355, n. 1402, p. 1517-1529, 2000.
- WINTER, H.; HUBER, S. C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. **Critical Reviews in plant sciences**, v. 19, n. 1, p. 31-67, 2000.

XIANG, L.; LE ROY, K.; BOLOUR, M. R.; VANHAECKE, M.; LAMMENS, W.; ROLLAND, F.; VAN DEN ENDE, W. Exploring the neutral invertase–oxidative stress defence connection in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 11, p. 3849-3862, 2011.

XIAO, X., TANG, C., FANG, Y., YANG, M., ZHOU, B., QI, J., ZHANG, Y. Structure and expression profile of the sucrose synthase gene family in the rubber tree: indicative of roles in stress response and sucrose utilization in the laticifers. **The FEBS journal**, v. 281, n. 1, p. 291-305, 2014.

XIAO, X.; TANG, C.; FANG, Y.; YANG, M.; ZHOU, B.; QI, J., ZHANG, Y. Structure and expression profile of the sucrose synthase gene family in the rubber tree: indicative of roles in stress response and sucrose utilization in the laticifers. **The FEBS journal**, v. 281, n. 1, p. 291-305, 2014.

YAO, Y.; GENG, M. T.; WU, X. H.; LIU, J.; LI, R. M.; HU, X. W.; GUO, J. C. Genome-wide identification, expression, and activity analysis of alkaline/neutral invertase gene family from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 33, n. 2, p. 304-315, 2015.

YOSHIDA, T.; ANJOS, L.; MEDEIROS, D. B.; ARAÚJO, W. L.; FERNIE, A. R.; DALOSO, D. M. Insights into ABA-mediated regulation of guard cell primary metabolism revealed by systems biology approaches. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 146, p. 37-49, 2019.

ZHANG, C.; YU, M.; MA, R.; SHEN, Z.; ZHANG, B.; KORIR, N. K. Structure, expression profile, and evolution of the sucrose synthase gene family in peach (*Prunus persica*). **Acta physiologiae plantarum**, v. 37, n. 4, p. 81, 2015.

ZHANG, M; YUAN, B; LENG, P. The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. **Journal of experimental botany**, v. 60, n. 6, p. 1579-1588, 2009.

ZHU, X.; WANG, M.; LI, X.; JIU, S.; WANG, C.; FANG, J. Genome-wide analysis of the sucrose synthase gene family in grape (*Vitis vinifera*): structure, evolution, and expression profiles. **Genes**, v. 8, n. 4, p. 111, 2017.

ZHU, Y. J.; KOMOR, E; MOORE, P.H. Sucrose accumulation in the sugarcane stem is regulated by the difference between the activities of soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase. **Plant physiology**, v. 115, n. 2, p. 609-616, 1997.

ZRENNER, R.; SCHÜLER, K.; SONNEWALD, U. Soluble acid invertase determines the hexose-to-sucrose ratio in cold-stored potato tubers. **Planta**, v. 198, n. 2, p. 246-252, 1996.

SUPPORTING INFORMATION

Tabela S1: Lista de primers para RT-qPCR

Primers para RT-qPCR		
SISUSY2	RT-F 5'-CCTCCATCCATTACTTCCCTCT-3'	RT-R 5'-GCACCTGCAAATCCTCAGAT-3'
SISUSY4	RT-F 5'-CTGCTTTCACTCTCCCAGGC-3'	RT-R 5'-TGTCAGCTCCAGGAGACACT-3'
SISUSY1	RT-F 5'-AAGCTGAGGTGGGCTCTTCT-3'	RT-R 5'-TCAGCAGATGGGAAATCCTC-3'
SISPS1	RT-F 5'-CCCCGAAGTTCGAAAGAGCA-3'	RT-R 5'-GCCTTGTCTGATGACCACGA-3'
SICWIN2	RT-F 5'-CAAAAGGAGCAACATGGGGC-3'	RT-R 5'-GGTAGATAGCGGGTTCGAGC-3'
SIVIN2	RT-F 5'-TTTCGAGATGTAGCCGGTGC-3'	RT-R 5'-TGGTAAGCCGTTCTTTGCCA-3'
SICIN3	RT-F 5'-CACCGCCACGTCAGGTATAC-3'	RT-R 5'-GTGTATGCCGGACCACCTTC-3'

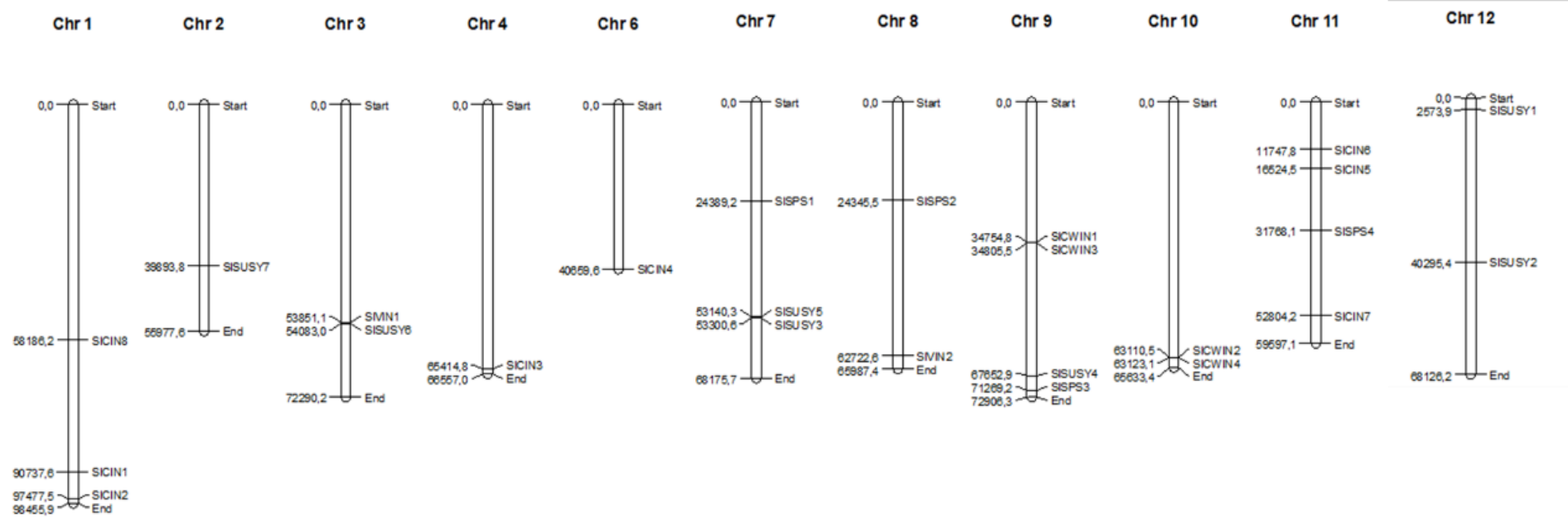


Figure S1: Localização cromossômica dos genes pertencentes a família da SISUY, SISPS, SICIN, SICWIN e SIVIN no genoma de *S. lycopersicum*. A escala está representada em Mb.

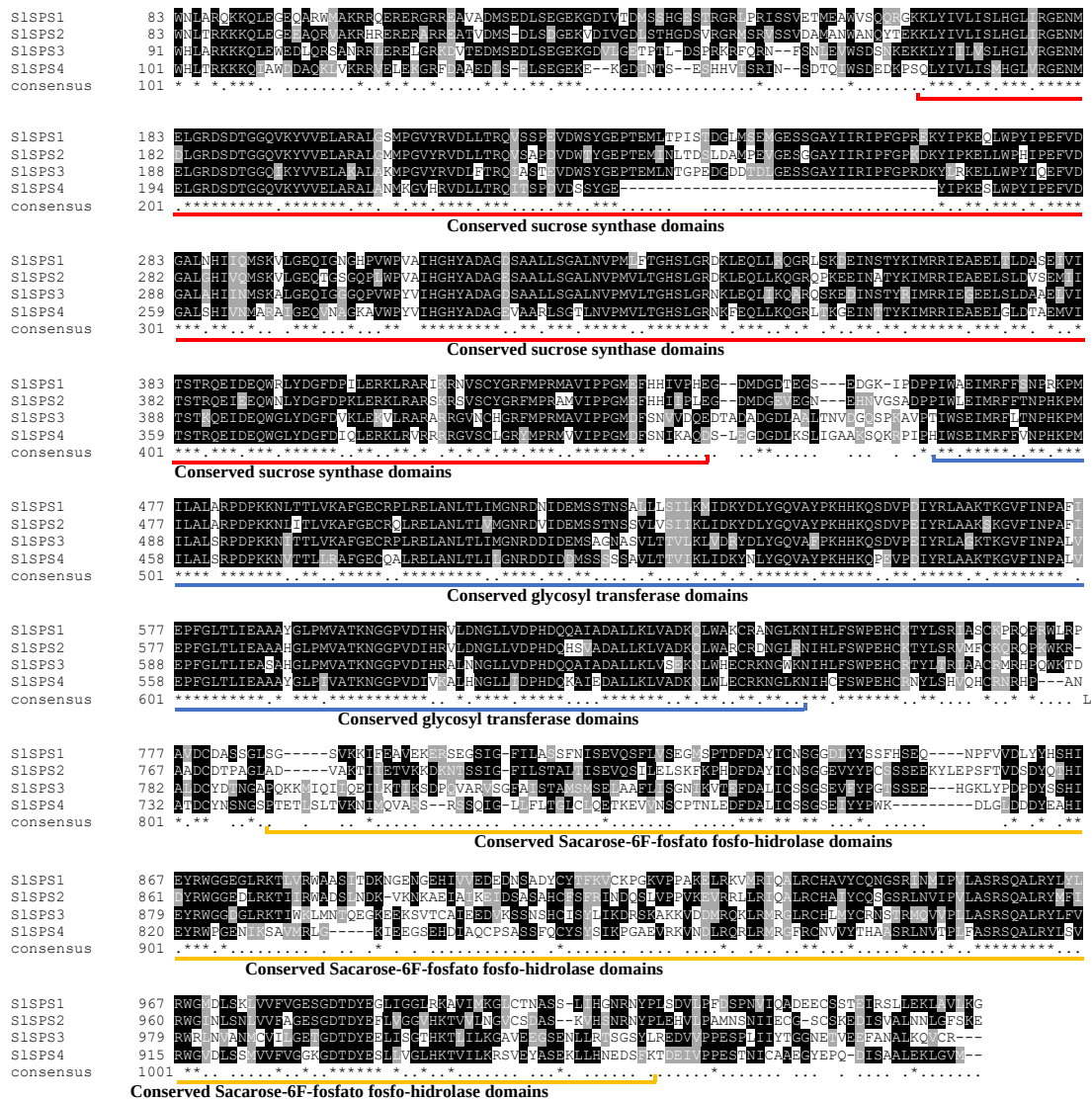


Figura S2: Alinhamento das seqüências de aminoácidos da Sacarose fosfato sintase em *S. lycopersicum* (SISPS). As linhas vermelha, azul e amarelo indicam domínio de sacarose sintase, domínio de glicosil transferase e domínio sacarose-6-fosfato, respectivamente. Em preto e cinza indicam aminoácidos conservados.

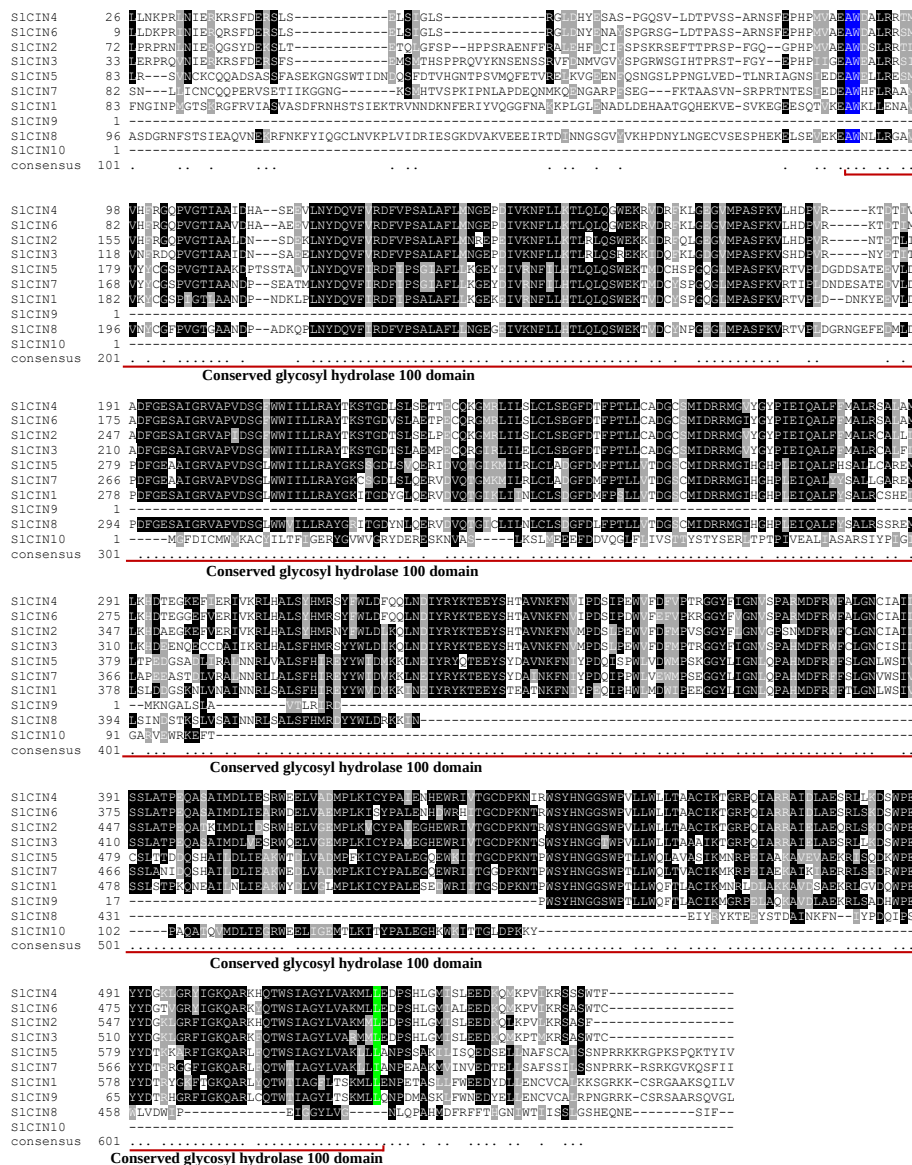


Figura S3: Alinhamento das seqüências de aminoácidos das Invertases citoplasmática (SICINs) em *S.lycospersicum*. Os aminoácidos conservados estão destacados em preto e cinza. As linhas vermelhas indicam o domínio conservado glicosil hydrolase 100.

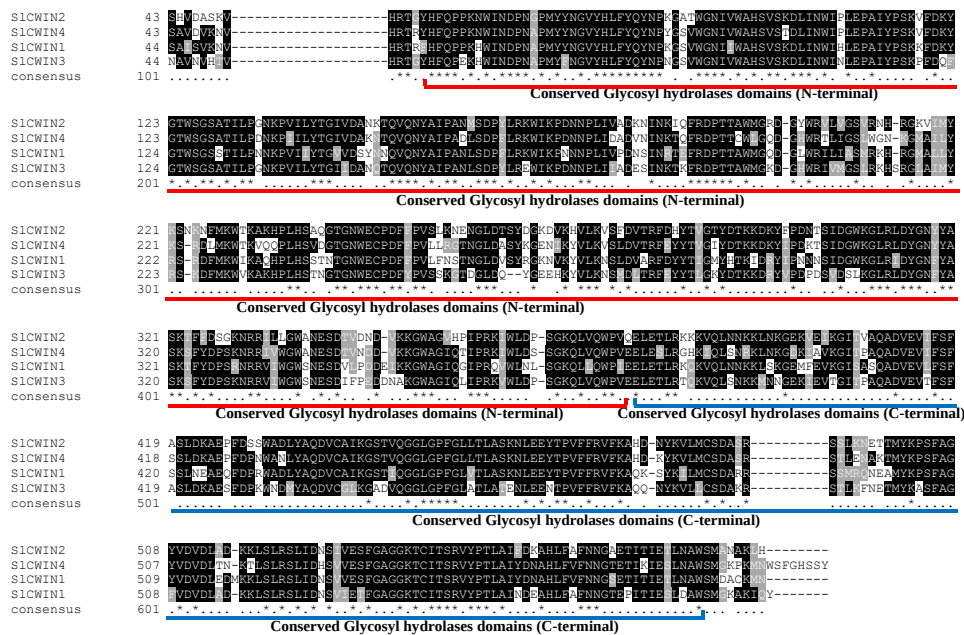


Figura S4: Alinhamento das sequências de aminoácidos das Invertases da parede celular (SICWINs) em *S.lycospersicum*. Os aminoácidos conservados estão destacados em preto e cinza. As linhas vermelha e azul indicam domínio de glycosyl hidrolase na porção N-terminal e glicosil hidrolase na porção C-terminal, respectivamente.