

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CALISTENE APARECIDA PINTO

EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À VIA DE TRANSDUÇÃO DE SINAL DE
AUXINA ASSOCIADA À MATURAÇÃO DO MELÃO AMARELO

PONTA GROSSA
2022

CALISTENE APARECIDA PINTO

EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À VIA DE TRANSDUÇÃO DE SINAL DE
AUXINA ASSOCIADA À MATURAÇÃO DO MELÃO AMARELO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa. Área de concentração: Agronomia. Linha de pesquisa: Fisiologia, Melhoramento e Manejo de Culturas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub.
Co – orientadora: Michelle Orane Schemberger.

PONTA GROSSA
2022

P659 Pinto, Calistene Aparecida
Expressão de genes relacionados à via de transdução de sinal de auxina associada à maturação do melão amarelo / Calistene Aparecida Pinto. Ponta Grossa, 2022.
66 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia - Área de Concentração: Fitotecnia e Fitossanidade), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub.

Coorientadora: Profa. Dra. Michelle Orane Schemberger.

1. Cucumis melo. 2. Ácido indolacético. 3. Amadurecimento. 4. RT-qPCR. 5. Açúcares. I. Ayub, Ricardo Antonio. II. Schemberger, Michelle Orane. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fitotecnia e Fitossanidade. IV.T.

CDD: 634



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação: “**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À VIA DE TRANSDUÇÃO DE SINAL DE AUXINA ASSOCIADA À MATURAÇÃO DO MELÃO AMARELO**”.

Nome: **Calistene Aparecida Pinto**

Orientador: Ricardo Antonio Ayub

Aprovado pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub

Profa. Dra. Silvanda de Melo Silva

Profa. Dra. Vanessa Galli

Ponta Grossa 18 de julho de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Antonio Ayub, Professor(a)**, em 27/07/2022, às 11:36, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **SILVANDA DE MELO SILVA, Usuário Externo**, em 02/08/2022, às 20:07, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **VANESSA GALLI, Usuário Externo**, em 03/08/2022, às 20:42, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador **1043982** e o código CRC **44A02244**.

Dedico esse trabalho de Dissertação à minha mãe, pelo amor, apoio e incentivo prestados a mim durante toda a minha trajetória profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por poder encerrar com resiliência essa etapa desafiadora, e por me permitir desfrutar com saúde e felicidade de todo aprendizado técnico e pessoal que a Pós – Graduação proporciona.

A minha mãe Josiane Pereira Pinto, por todo o suporte, amor e companheirismo incondicionais que eu recebi em todos esses anos de vida. Agradeço à minha melhor e maior professora, por sempre estar presente nos meus estudos, oferecendo as melhores condições para que eu pudesse ascender a minha carreira.

Aos meus familiares pelo imenso afeto e entusiasmo com os quais eu sempre fui acolhida. Singularmente agradeço à minha tia Gicele A. Ingenchki, ao meu avô Eurides P. Pinto, à minha avó Silvia S. Pinto e, ao meu tio Júlio C. Ingenchki.

Ao meu orientador Dr. Ricardo Antonio Ayub, por todo o estímulo e dedicação concedidos a mim e a esse projeto. Certamente sem a sua persistência e confiança no meu trabalho, eu não teria a vasta oportunidade de crescimento científico que tive nesses anos.

A todos os meus colegas e amigos pessoais, essencialmente ao Willian Y. Takahashi, Tatiane C. Moreira, Isabela M. B. Correa, Daniele S. Domingues, Mariana Celano, e Murilo Ribeiro, pela troca de experiências profissionais que me proporcionaram inumeráveis ganhos.

Agradeço especialmente à minha querida amiga Marilia Aparecida Stroka Kremer, por ensinar toda a prática e a teoria pertinente a temática da minha dissertação, e por toda ajuda, compreensão e carinho no meu processo de aprendizado. Prolongo esse agradecimento à Flávia Maria Gustani pela irmandade, amparo, cooperação e força que juntas enfrentamos nessa jornada de experimentos, de Pós – Graduação, e de vida.

A todos os membros que fazem parte dos Laboratórios de Biotecnologia Aplicada à Fruticultura e Biologia Molecular Microbiana, pela convivência diária, empenho, zelo, e assistência prestados a mim, e às minhas atividades ali desempenhadas.

A Universidade Estadual de Ponta Grossa, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, e aos professores e coordenadores do Programa de Pós - Graduação de Agronomia UEPG, principalmente à prof. Dra. Carolina W. Galvão, Dr. Rafael M. Etto, Dr. Rodrigo R. Matiello, Dra. Natali Maidl de Souza, e também ao prof. Dr. Aducto Bellarmino (da UFPR), pela cumplicidade, disposição, e amor à pesquisa. Obrigada por serem essenciais na minha formação como aprendiz cientista.

E por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente com seus ensinamentos no desenvolvimento desse projeto.

“Como sou pouco e sei pouco, faço o pouco que me cabe me dando por inteiro”. (Ariano Suassuna).

RESUMO

O melão amarelo é uma das variações fenotípicas de *Cucumis melo* mais relevantes do mercado brasileiro e, portanto, a compreensão do processo de maturação é bastante pertinente à produção frutícola. Nesse contexto, hormônios vegetais vêm sendo indicados como reguladores do amadurecimento, a exemplo da auxina que é atuante na divisão e expansão celular nos estádios iniciais de desenvolvimento dos frutos. Diante disso, este trabalho teve como objetivo elucidar a expressão gênica de transdução de sinal de auxina no amadurecimento de frutos de melão, submetidos à tratamentos exógenos com ácido indolacético (AIA), ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA), sacarose e sorbitol. O experimento foi realizado em casa de vegetação e nos Laboratórios de Biotecnologia Aplicada à Fruticultura e Biologia Molecular Microbiana da Universidade Estadual de Ponta Grossa – PR, no período de 2021-2022. O delineamento adotado foi o em blocos ao acaso (DBC), integrando seis tratamentos e quatro repetições, aplicando as análises de pós – colheita (físico-químicas) e de expressão gênica através de RT-qPCR. Os resultados aqui apresentados evidenciam que a concentração de 600 µM de ácido indolacético não foram suficientes para alterar algumas propriedades físicas de frutos de meloeiro amarelo, mas tem relevância quanto a fisiologia molecular, suprimindo a expressão de *CmARF3* e *CmGH3.5*, e induzindo de *CmSAUR36*. A sacarose exógena por sua vez, provocou um aumento significativo na relação entre sólidos solúveis e acidez titulável, e na expressão de *CmARF3*. As concentrações de 200 µM de TIBA e sorbitol parecem não serem suficientes incrementar em nenhum atributo físico – químico na maturação de fruto. Tais dados são relevantes para elucidar futuramente os atributos que permeiam o amadurecimento de melão amarelo não – climatérico cv. Eldorado, sobre o *crossstalk* de hormônios vegetais e açúcares a nível molecular.

Palavras – chave: *Cucumis melo*; ácido indolacético; amadurecimento; RT-qPCR; açúcares.

ABSTRACT

Yellow melon fruit is one of the most relevant phenotypic variations of *Cucumis melo* in the Brazilian market and, therefore, understanding the maturation process is quite relevant to fruit production. In this context, plant hormones have been indicated as ripening regulators, such as auxin, which is active in cell division and expansion in the early stages of fruit development. Therefore, this work aimed to elucidate the gene expression of auxin signal transduction in the ripening of melon fruits, submitted to exogenous treatments with indoleacetic acid (IAA), 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA), sucrose and sorbitol. The experiment was carried out in a greenhouse and at the Laboratories of Biotechnology Applied to Fruticulture and Molecular Microbial Biology of the State University of Ponta Grossa - PR, in the period 2021-2022. The design adopted was randomized blocks (DBC), integrating six treatments and four replications, applying post-harvest (physical-chemical) and gene expression analysis through RT-qPCR. The results presented here show that the concentration of 600 μM of indoleacetic acid was not enough to change some physical properties of yellow melon fruits, but it has relevance in terms of molecular physiology, suppressing the expression of *CMARF3* and *CmGH3.5*, and inducing *CmSAUR36*. Exogenous sucrose, in turn, caused a significant increase in the ratio between soluble solids and titratable acidity, and in the expression of *CmARF3*. The concentrations of 200 μM of TIBA and sorbitol do not seem to be sufficient to increase any physical-chemical attribute in fruit maturation. Such data are relevant to further elucidate the attributes that permeate the ripening of non-climacteric yellow melon cv. Eldorado, on the crosstalk of plant hormones and sugars at the molecular level.

Key words: *Cucumis melo*; indoleacetic acid; ripening; RT-qPCR; sugars.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *Crosstalk* hormonal entre etileno (ET), ácido indolilacético (AIA) e ácido abscísico (ABA) no desenvolvimento e amadurecimento de melões climatéricos (a) e não - climatéricos (b).....21
- Figura 2.** Via biossintética e mecanismo de transdução de sinal de ácido indolacético parciais, sugerida na maturação de frutos de melão amarelo, baseadas nos resultados de Schemberger *et al.* (2020).....26
- Figura 3.** Semeadura de melão amarelo do grupo Inodorus (a): disposição dos vasos na área experimental, logo após a semeadura; (b): sementes de melão da cv. Eldorado, submetidas ao tratamento com hipoclorito de sódio. Ponta Grossa – PR, 2020.....32
- Figura 4.** Área experimental de plantas de melão cultivadas em casa de vegetação, no estádio reprodutivo, no município de Ponta Grossa – PR, 2021-2022.....33
- Figura 5.** Croqui da área experimental de plantas cultivadas de melão, na safra 2021-2022, em Ponta Grossa - PR. T1: controle – frutos verdes; T2: controle – frutos maduros; T3: frutos tratados com AIA; T4: frutos tratados com TIBA; T5: frutos tratados com sacarose; T6: frutos tratados com sorbitol.....33
- Figura 6.** Frutos de melão amarelo cv. Eldorado após a colheita aos 30 dias após a polinização (fruto verde), e no amadurecimento pleno - aproximadamente 45 dias após a polinização (para frutos maduros sem tratamento e frutos com tratamentos exógeno de ácido indolacético (AIA), ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA), sacarose e sorbitol. Safra 2021/2022, Ponta Grossa – PR.....35
- Figura 7.** Colorimetria da casca para frutos verdes, maduros e submetidos a tratamentos com AIA, TIBA, sacarose e sorbitol, de melão amarelo cv. Eldorado. Resultados expressos através da média obtida \pm erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....42
- Figura 8.** Colorimetria da polpa para frutos verdes, maduros e submetidos a tratamentos com AIA, TIBA, sacarose e sorbitol, de melão amarelo cv. Eldorado. Resultados expressos at da média obtida \pm erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 probabilidade.....43
- Figura 9.** Sólidos solúveis totais mensurados em °Brix, para frutos verdes, maduros e submetidos a tratamentos com AIA, TIBA, sacarose e sorbitol, de melão amarelo cv. Eldorado. Resultados expressos através da média obtida \pm erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....44

Figura 10. Resultados médios de pH do suco de frutos verdes, maduros e submetidos a tratamentos com AIA, TIBA, sacarose e sorbitol, de melão amarelo cv. Eldorado. Resultados expressos através da média obtida \pm erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....46

Figura 11. Resultados médios de acidez titulável por porcentagem de ácido cítrico (%) em frutos verdes, maduros e submetidos a tratamentos com AIA, TIBA, sacarose e sorbitol, de melão amarelo cv. Eldorado. Resultados expressos através da média obtida \pm erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....47

Figura 12. Resultados médios de *ratio* (SS/AT) em frutos verdes, maduros e submetidos a tratamentos com AIA, TIBA, sacarose e sorbitol, de melão amarelo cv. Eldorado. Resultados expressos através da média obtida \pm erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....47

Figura 13. Expressão relativa do gene *CmARF1*, determinada através de $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$. Resultados expressos através da média obtida para os tratamentos \pm erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.....49

Figura 14. Expressão relativa do gene *CmARF3-X3*, determinada através de $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$. Resultados expressos através da média obtida para os tratamentos \pm erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.....50

Figura 15. Expressão relativa do gene *CmIAA11*, determinada através de $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$. Resultados expressos através da média obtida para os tratamentos \pm erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.....52

Figura 16. Expressão relativa do gene *CmGH3.5*, determinada através de $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$. Resultados expressos através da média obtida para os tratamentos \pm erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.....53

Figura 17. Expressão relativa do gene *CmSAUR36*, determinada através de $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$. Resultados expressos através da média obtida para os tratamentos \pm erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.....55

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Tratamentos e suas respectivas concentrações aplicadas em frutos de melão amarelo cv. ‘Eldorado’, em diferentes métodos de aplicação. Município de Ponta Grossa – PR, 2021/2022.....34
- Tabela 2.** Genes estudados em relação à transdução de sinal do hormônio auxina no melão, e seus respectivos ID’s das plataformas Melonomics e NCBI.....37
- Tabela 3.** Sequências *forward* (5’-3’) e *reverse* (5’-3’) de *primers*, utilizados como iniciadores da transcrição dos genes de transdução de sinal de auxina para o melão. Com base nas sequências de RNAm, obtidas através da base de dados Cucurbit Genomics, os primers foram confeccionados através da plataforma Primer-BLAST do Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI), e a qualidade dos mesmos foi mensurada a partir da ferramenta Beacon Designer.....38
- Tabela 4.** Resultados médios \pm erro padrão das variáveis de peso, comprimento, diâmetro, e firmeza da polpa de frutos de melão da cultivar Eldorado.....40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	Ácido Abscísico
ABCB	Transportadores de classe B do cassete de ligação de ATP
ABI5	Proteína insensível a ácido absísico 5
ACO	Ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) oxidase
ACS	Ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) sintase
AGPase	ADP-glicose pirofosforilase
AIA	Ácido indolilacético
ANT	Antranilato
ARF	Fator de resposta a auxina
ARR	Reguladores de resposta de localização nuclear de citocinina
AT	Acidez titulável
Aux/IAA	Proteína responsiva a auxina
AUXIN1/LIKE-AUX1	Carreadores de auxina do influxo
AuxRE	Elemento promotor responsivo à auxina
BTOA	Ácido benzotiazol-2-oxiacético
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico (DNA) complementar
CHA	Ácido corísmico
CHS	Chalcona sintase
CK	Citocinina
Cq	Ciclo de quantificação
D.A.P.	Dias após a polinização
ET	Etileno
GA	Giberelina
GH3	Ácido indolacético acético amido sintetase
GRIP	Proteína de parede celular rica em prolina
IAAld	Indol-3-acetaldeído
IAM	Indol-3-acetamida
IAN	Indol-3-acetonitrilo
IAOx	Indol-3-acetaldoxima
IGP	Fosfato de indol-3-glicerol
INS	Indol
IPA	Ácido indol-3-pirúvico
NaOH	Hidróxido de sódio
NCED	9-cis-epoxicarotenoide dioxigenase
NADSDH	Sorbitol desidrogenase dependente de NAD ⁺
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
PIN	Carreadores do efluxo PINFORMED
RIN	Inibidor de amadurecimento
RNAi	Ácido ribonucleico (RNA) interferente
RPL	Proteína ribossomal L
RPS15	Proteína ribossômica citosólica S15
RT-qPCR	Transcrição reversa – Reação em Cadeia Polimerase quantitativa
SAC	Sacarose
SAUR	Proteína induzida por ácido indolacético
SnRK	Quinase de serina/treonina
SORB	Sorbitol
SST	Sólidos solúveis totais

TAA/YUC	Aminotransferase de triptofano do tipo Flavina Monooxigena:
TAM	Triptamina
TIBA	Ácido 2,3,5-triidobenzóico
TIR1	Inibidor de transporte de resposta
TPL	Co-repressor TOPLESS
UFGT	UDP-glicose-flavonóide 3-O-glucosil transferase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 CULTURA DO MELÃO	18
3.2 DESENVOLVIMENTO E MATURAÇÃO DE FRUTOS DO MELOEIRO	19
3.2.1 <i>Crosstalk</i> entre açúcares e auxinas no amadurecimento de frutos	22
3.3 ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA AUXINA	23
3.3.1 Via metabólica da auxina	24
3.4 AUXINA NA MATURAÇÃO DE FRUTOS	27
3.4.1 Transdução de sinal de auxina na maturação de frutos	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 ÁREA EXPERIMENTAL E MATERIAL VEGETAL	32
4.2 TRATAMENTOS EXÓGENOS	34
4.3 COLHEITA DOS FRUTOS E ANÁLISES PÓS - COLHEITA	34
4.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA)....	36
4.5 DESENHO DE INICIADORES - <i>PRIMERS</i>	36
4.6 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR qPCR	38
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 QUALIDADE PÓS – COLHEITA	40
5.2 EXPRESSÃO GÊNICA DA TRANSDUÇÃO DE SINAL DE AUXINA.....	48
5.2.1 Fator de resposta a auxina (ARF).....	48
5.2.2 Proteína responsiva a auxina (Aux/IAA).....	51
5.2.3 <i>Gretchen Hagen 3</i> - ácido indolacético amido sintetase (GH3).....	52
5.2.4 Proteína induzida/responsiva a ácido indolacético (SAUR).....	54
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57

REFERÊNCIAS	58
--------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

O melão (*Cucumis melo* L.) é uma espécie relevante na horticultura brasileira e internacional, pois apresenta vasto interesse comercial. A razão da magnitude produtiva, é que essa Cucurbitacea engloba frutos de variados formatos, cores, aromas e propriedades nutracêuticas, características as quais tornam - se relevantes para a escolha do consumidor (PITRAT, 2017). Dados do primeiro trimestre de 2022 indicam que o volume de exportação do melão brasileiro já ultrapassou 70 mil Kg, um aumento de 4% em relação a 2021, indicando que esta é a cultura frutícola mais escoada do país (ABRAFRUTAS, 2022).

Além dos atributos de qualidade, algumas lacunas sobre a compreensão do metabolismo de *Cucumis melo* passaram a ser notáveis pela pesquisa científica nos últimos anos. Hormônios vegetais como etileno, ácido abscísico e brassinosteroides vem sendo indicados como os principais reguladores da maturação dos frutos, enquanto que a auxina, giberelina, citocinina e ácido jasmônico promovem o alongamento celular e desenvolvimento (KUMAR *et al.*, 2014; FUENTES; FIGUEROA; VALDENEGRO, 2019).

Diante da extensa variabilidade genotípica, fenotípica e fisiológica do meloeiro, um dos principais objetivos de estudos é o entendimento de modelos de maturação dentro dessa espécie (PARIS *et al.*, 2017; PITRAT, 2017). Os frutos podem ser divididos em climatéricos (frutos com alta síntese de etileno e respiração celular no amadurecimento), e em não-climatéricos, que referem - se àqueles que apresentam taxas constantes de etileno e respiração celular durante o amadurecimento (AYUB *et al.*, 1996; SALADIÉ *et al.*, 2015; PITRAT, 2017). O melão amarelo (não - climatérico), por exemplo, é uma das variedades mais expressivas em termos de produção e consumo no Brasil. Ao contrário de outros grupos de meloeiro cultivados no mundo, ainda não se tem informações tão abrangentes em termos fisiológicos e moleculares do melão amarelo, podendo ser um material interessante para elucidar algumas hipóteses quanto à maturação de outros frutos não - climatéricos.

As auxinas possivelmente atuam no desenvolvimento inicial dos frutos, podendo ser regulada através de uma série de atividades enzimáticas em consequência dos seus níveis endógenos e exógenos (KEFELI; KALEVITCH, 2003). A via da transdução de sinal desse fitormônio é contemplada por enzimas que atuam na homeostase de auxina, fatores de respostas transcricionais, inibidoras ou indutoras de auxina, as quais têm um papel fundamental na resposta celular, proporcionando ou dificultando o crescimento dos frutos (JIA *et al.*, 2020; CASANOVA-SÁEZ *et al.*, 2021). Diante disso, o ácido indolacético é uma das principais auxinas presentes nos vegetais, e este pode regular negativamente o amadurecimento dos frutos,

pois apresenta uma ação negativa sobre o acúmulo de açúcares, por exemplo (JIA *et al.*, 2017; GU *et al.*, 2019).

Nesse sentido, é importante explorar o metabolismo da auxina, e sua interação com os demais hormônios e açúcares, a fim de aumentar a qualidade e a vida pós – colheita dos frutos. Com o uso de tecnologias, atualmente é possível esclarecer a função de AIA no desenvolvimento de melão através de RT-qPCR (Transcrição reversa - Reação em Cadeia Polimerase quantitativa) (KUANG *et al.*, 2018). Essa técnica permite alcançar a validação da confirmação ou refutação dos resultados obtidos através de técnicas de sequenciamento (bibliotecas de cDNA, micro ou macroarranjos de DNA, ou RNA-Seq), e assim demonstrar como a expressão diferencial de genes codificantes de proteínas ligadas à transdução de sinal de auxina está ligada ao amadurecimento e desenvolvimento dos frutos (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; KUANG *et al.*, 2018).

Por meio da aplicação dessa técnica e de análises complementares de pós – colheita, é possível obter dados relevantes a nível molecular, a fim de mediar alternativas que contemplem os programas de fisiologia e melhoramento vegetal para aprimorar o manejo de produção, e consequentemente refinar as características organolépticas de interesse de melões não – climatéricos brasileiros.

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi investigar a função da auxina e de açúcares no metabolismo do amadurecimento do melão não - climatérico (*Cucumis melo* L. Inodorus) cv. Eldorado, através da expressão de genes da via de transdução de sinal de AIA.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar os genes diferencialmente expressos da via de transdução de sinal de auxina em frutos de melão, averiguados pelo RNA-Seq de Schemberger (2020).
- Desenhar iniciadores específicos para os genes de interesse de AIA, atuantes no metabolismo da maturação de frutos de melão amarelo não - climatérico (*Cucumis melo* L. Inodorus) cv. Eldorado.
- Analisar expressão dos genes de transdução de sinal em relação aos níveis de auxina endógena, e ao tratamento dos frutos com auxina exógena, utilizando a técnica de RT-qPCR.
- Avaliar se há efeitos dos tratamentos com açúcares (sacarose e sorbitol), e com o inibidor de transporte polar de auxina (ácido 2,3,5-triidobenzóico - TIBA), na expressão dos genes de interesse de AIA no desenvolvimento e amadurecimento de melão.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CULTURA DO MELÃO

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma hortaliça pertencente à família Curcubitaceae, juntamente com outras plantas de importância significativa, como o pepino (*Cucumis sativus* L.), a melancia (*Citrullus lanatus*) e a abóbora (*Cucurbita moschata*) (GARCIA-MAS *et al.*, 2012). Possui grande importância comercial na fruticultura, devido às características organolépticas únicas de seus frutos (PARIS *et al.*, 2017; PITRAT, 2017). Além disso, há grande interesse em explorar a biologia sistêmica do amadurecimento, pois o seu genoma relativamente pequeno e ciclo de vida curto, fazem dessa espécie um interessante objeto de estudo (AYUB *et al.*, 1996; PARIS *et al.*, 2017).

Há suposições de que o melão é nativo da Ásia, porém com a grande diversidade de espécies, ainda existe divergência sobre o local de origem e domesticação do ancestral comum (SEBASTIAN *et al.*, 2010). De acordo com Endl *et al.* (2018), o registro arqueológico sugerido por esses autores demonstra que a domesticação africana do melão começou há pelo menos 5000-6000 anos atrás, o que poderia ter ocorrido antes que na Ásia.

Com base nessa pluralidade, a espécie *Cucumis melo* pode ser dividida em 19 grupos botânicos entre silvestres e domesticados. Essa classificação é feita através de características fenotípicas independentes, as quais determinam a distribuição em alguns subgrupos (PITRAT, 2017; PARIS *et al.*, 2017). Dentre os grupos mais cultivados no Brasil estão o Cantalupensis e o Inodorus, nos quais estão inseridos vários tipos de melões como, por exemplo, Gaúcho (Cantalupensis), e o Amarelo (Inodorus) (PINHO *et al.*, 2010; ANDRADE *et al.*, 2019).

Embora exista uma ampla variedade de frutos de melão, Paris; Tadmor; Schaffer (2017) mencionam que as cucurbitáceas em geral são plantas herbáceas anuais com gavinhas, de raízes fibrosas e folhas palmadas. A maioria das plantas são monóicas, podendo ter estruturas femininas e masculinas separadas ou em uma única flor (hermafroditas). As flores são grandes, de coloração que varia do amarelo-alaranjado ao amarelado-branco, com cálice e corola simetricamente fundidos, em forma de copo e sino, predominantemente com cinco lóbulos (HODGES; LESTER, 2011). As plantas de melão, quando cultivadas em ambiente protegido produzem de um a três frutos devido ao abortamento natural (DALASTRA *et al.*, 2016).

Em relação à produção, o meloeiro é uma cultura que requer altas temperaturas, alta luminosidade e baixa umidade para garantir o desenvolvimento e aumento no número de frutos de qualidade comercial (SILVA *et al.*, 2000; SOUZA, 2017). Os frutos variam na forma e no

tamanho, podendo ser achatados ou alongados, geralmente pesam de 1 a 1,5 kg, e podem ter colorações de casca desde verde até alaranjadas, assim como a polpa que pode ser esbranquiçada ou alaranjada a depender do conteúdo de β -caroteno (ESTERAS *et al.*, 2018; PARIS *et al.*, 2017). A principal substância de reserva de frutos de *Cucumis melo* é a sacarose, ao invés de amido, frutose e glicose, sendo que a mesma tem sido estudada como reguladora positiva da maturação (BURGER; SCHAFFER, 2007; SALADIÉ *et al.*, 2015). Nos últimos anos, a fenologia reprodutiva vem sendo relatada no meloeiro, e os estádios de desenvolvimento dos frutos são: frutos jovens com 10 dias após a polinização (D.A.P), frutos em expansão celular (~20 D.A.P.), frutos em estágio de pré - maturação (~30 D.A.P.), e frutos completamente maduros (~40 D.A.P.) (ZHANG *et al.*, 2016; STROKA *et al.*, 2021).

De acordo com a FAO (2020), a produção mundial se concentrou em 28.467.920 toneladas, numa área de 1.068.238 ha. No Brasil, os dados de 2020 constam que em 24.137 ha, foram colhidas 613.933 toneladas de frutos, sendo que no primeiro trimestre de 2022, o volume de exportação do melão brasileiro já ultrapassou 70 mil Kg (FAO, 2020; IBGE, 2020; ABRAFRUTAS, 2022). Portanto, esses altos índices de comercialização têm sido atrativos para produtores brasileiros de melões, e a compreensão dos mecanismos que levam ao amadurecimento dos frutos torna – se um viés interessante para a aplicabilidade de novas tecnologias e métodos de cultivo, além da otimização da vida de prateleira requerida pelo consumidor.

3.2 DESENVOLVIMENTO E MATURAÇÃO DE FRUTOS DO MELOEIRO

Devido à numerosa diversidade fenotípica do meloeiro, dentro dos 19 grupos botânicos relatados na literatura existe também a divisão entre dois perfis de amadurecimento: os melões climatéricos e melões não – climatéricos (PITRAT, 2017; PARIS *et al.*, 2017).

Os frutos climatéricos são característicos por apresentarem elevada síntese catalítica de etileno (ET) (Figura 1) e alta taxa de respiração celular, polpas de colorações alaranjadas em razão da produção de β -caroteno, acúmulo de ésteres, álcoois e aldeídos, e curta vida útil pós – colheita (AYUB *et al.* 1996; KOU *et al.*, 2021). Alguns exemplos desse modelo de maturação são os melões do grupo *Cantalupensis*, com cultivares como Gália (subgrupo *Ogen*) e Gaúcho (subgrupo *Saccharinus*) (PINHO *et al.*, 2010; PITRAT, 2017). Já os frutos não – climatéricos são tipificados por exibirem uma taxa de respiração constante e produção de etileno pouco detectável (Figura 1), fazendo com que a colheita ocorra com a sua completa maturação (FUENTES; FIGUEROA; VALDENEGRO, 2019; CHEN; QIN; TIAN, 2020; KOU *et al.*,

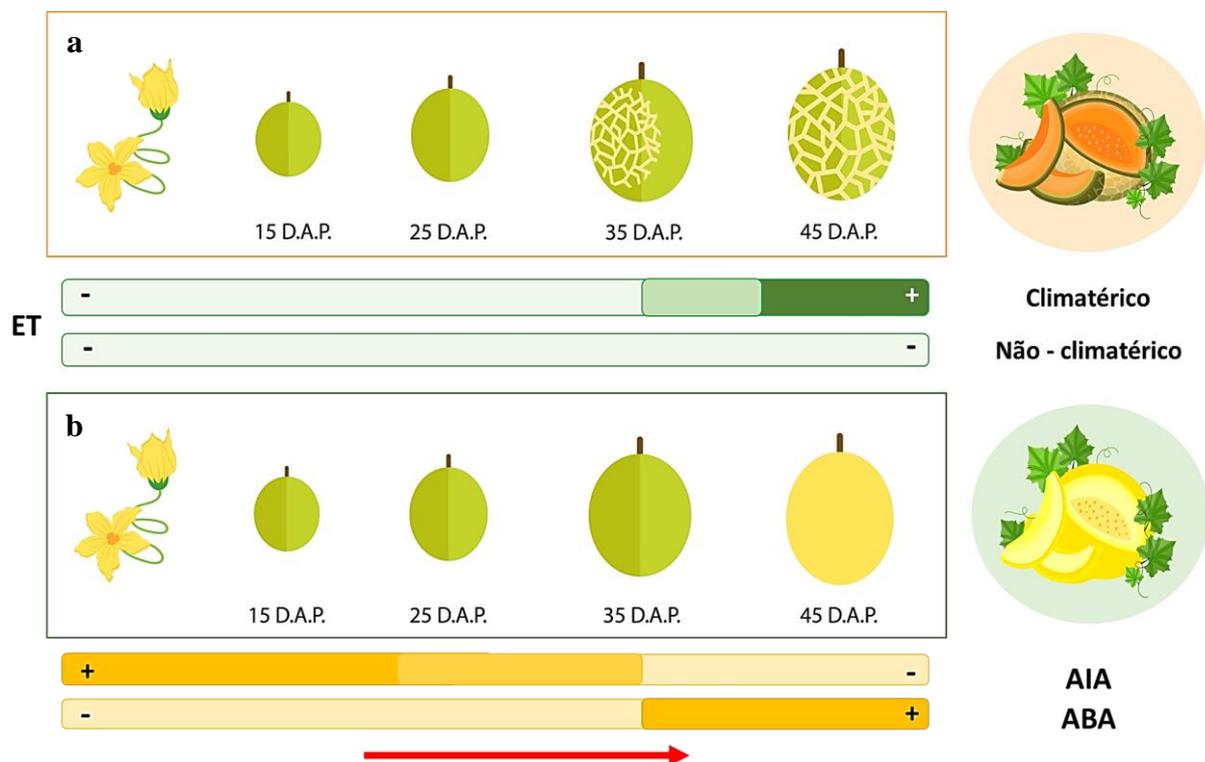
2021). Os frutos desse tipo de amadurecimento possuem polpa esbranquiçada, com pouco aroma devido à ausência de ésteres voláteis, além de apresentarem longa vida útil pós - colheita. Podem – se citar como não – climatéricos, os melões do grupo Inodorus com a cultivar Eldorado (subgrupo Amarelo), ou do grupo Ibericus, de cultivares do subgrupo Pele de Sapo, estas bem conhecidas no mercado frutícola (PARIS *et al.*, 2017; PITRAT, 2017). O melão amarelo cv. Eldorado é um dos tipos de *Cucumis melo* mais relevantes da produção brasileira. Suas plantas são caracterizadas por serem andromonóicas, com pelos longos no ovário e frutos de peso médio e formato redondo (PITRAT, 2017). Os frutos desse grupo possuem a casca amarela, polpa esbranquiçada, teor de açúcar entre 8 e 12° Brix e ciclo de produção entre 65 a 75 dias (SILVA; COSTA, 2003; FIGUEIRÊDO *et al.*, 2013).

Partindo desse pressuposto, é conhecido que o etileno é essencial ao processo da maturação climática, entretanto, há relatos que o ácido abscísico (ABA) pode ser o principal hormônio vegetal responsável pelo amadurecimento de frutos não – climatéricos. Isso porquê, além desse processo de maturação ser independente de ET, o ABA é sintetizado momentos antes do etileno ao decorrer do desenvolvimento dos frutos, e assim pode contribuir para regular positivamente alguns genes de biossíntese de etileno, acelerando o processo amadurecimento (GAN *et al.*, 2019; KOU *et al.*, 2021). Diante disso, foi constatado que genes de síntese de etileno *CmACS1* e *CmACO1* interagem com 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenase (NCED) em melão. A enzima *CmNCED2* tem a função catalisadora de violaxantina ou neoxantina em xantoxina, o precursor de ABA, e essa interação com as enzimas sintetizadoras de ET podem promover o amadurecimento dos frutos de meloeiro, contribuindo também com o acúmulo de glicose, frutose e sacarose em um mecanismo ainda pouco conhecido (SUN *et al.* 2012; FUENTES; FIGUEROA; VALDENEGRO, 2019; BAI *et al.*, 2020).

Nesse sentido, é também sabido que o acúmulo de sacarose em receptáculos de morango promove a superexpressão de isoformas de *FaNCED* nos estádios finais de desenvolvimento do fruto (JIA *et al.*, 2014; GU *et al.*, 2019). Além disso, há fortes evidências que as quinases de serina/treonina (SnRKs) interagem com fatores de transcrição *ABI5*, fosforilando – os, e que por sua vez interagem com a enzima ACC sintase (ACS), podendo esta ser uma rede regulatória importante na maturação de frutos não - climatéricos (SADKA *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2022). Em termos fisiológicos visíveis, a literatura reportou que frutos submetidos ao tratamento exógeno com ABA, aumentam os níveis de ABA endógeno e ET endógeno em kiwis, figo e tomate, por exemplo, sugerindo essa interação entre os dois hormônios (GAN *et al.*, 2019; QIAO *et al.*, 2021; CHEN; QIN; TIAN, 2020).

Por outro lado, hormônios como auxina (AIA) (Figura 1), citocinina (CK) e giberilina (GA) têm sido investigados no desenvolvimento inicial do fruto, assim como algumas enzimas participantes da síntese de parede celular promovendo a expansão celular do fruto (KUMAR; KHURANA; SHARMA, 2014; FUENTES; FIGUEROA; VALDENEGRO, 2019). Portanto, as concentrações desses fitormônios são bastante elevadas nos órgãos reprodutivos e nos primeiros estádios de desenvolvimento dos frutos (KUMAR; KHURANA; SHARMA, 2014; TERIBIA; TIJERO; MUNNÉ-BOSCH, 2016; FUENTES; FIGUEROA; VALDENEGRO, 2019). Em melão antisenso de *CmACCO* (1-aminociclopropane-1-carboxilato oxidase – ligado a biossíntese de ET), o conteúdo de CK é elevado na polpa e na casca, proporcionando maior vida útil pós – colheita devido ao acúmulo de transcritos de *ARR1* (reguladores de resposta de localização nuclear de citocinina) (GONÇALVES *et al.*, 2013).

Figura 1. *Crosstalk* hormonal entre etileno (ET), ácido indolilacético (AIA) e ácido abscísico (ABA) no desenvolvimento e amadurecimento de melões climatéricos (a) e não - climatéricos (b).



Fonte: adaptado pela autora de: Kumar *et al.* (2014); Fuentes; Figueroa; Valdenegro (2019).

3.2.1 *Crosstalk* entre açúcares e auxinas no amadurecimento de frutos

Os açúcares apresentam funções relevantes sobre a maturação e a qualidade pós – colheita dos frutos, especialmente por ser o atributo fundamental na escolha do consumidor (BURGER *et al.*, 2000; NUÑEZ-PALENIUS *et al.*, 2008). Os monossacarídeos contidos nos frutos de meloeiro domesticado são frutose e glicose, mas a principal substância de reserva é a sacarose, a qual é o fotoassimilado responsável pelo sabor doce do mesocarpo maduro (BURGER *et al.*, 2000; NUÑEZ-PALENIUS *et al.*, 2008; STROKA *et al.*, 2021). Embora em menores concentrações, outros oligossacarídeos solúveis como a rafinose e estaquiase também são translocados pelo floema, e podem servir de substrato suprimindo carbono para a síntese de sacarose (SCHEMBERGER *et al.*, 2020; STROKA *et al.*, 2021)

O conteúdo de açúcares em melão varia de acordo com os fatores ambientais como salinidade, disponibilidade de nutrientes, sombreamento, e a área foliar disponível, mas especialmente com o genótipo. Saladié *et al.* (2015), relataram que as concentrações de sacarose aumentam a partir de 30 D.A.P em melões não - climatéricos como Pele de Sapo e o genótipo PI 161375, e em melão Védraçais (climatérico), ao contrário de melão Dulce, também climatérico, o qual acumula esse açúcar rapidamente aos 40 D.A.P até aos 50 D.A.P na completa maturidade. Em melões não – climatéricos Hami e Amarelo, o teor de sacarose aumenta consideravelmente somente a partir 30 D.A.P até aproximadamente 40 D.A.P e, portanto, esse é apontado como o momento de maturidade – a máxima síntese desse carboidrato (ZHANG *et al.*, 2016; SCHEMBERGER *et al.*, 2020).

Além de fatores ambientais, os hormônios podem ter um papel fundamental sobre a disponibilidade e a biossíntese de açúcares (SUTSAWAT *et al.*, 2008). As auxinas são reportadas como indutoras do crescimento inicial dos frutos, e pode ocorrer um mecanismo de “*crosstalk*” entre esse fitormônio e a sacarose na maturação (KEFELI; KALEVITCH, 2003; (KUMAR; KHURANA; SHARMA, 2014; FUENTES; FIGUEROA; VALDENEGRO, 2019). Em uvas, Jia *et al.* (2017) constataram que a aplicação de AIA provocou o decréscimo no conteúdo de açúcares totais nos frutos, e em contrapartida, que a sacarose exógena reduziu o conteúdo do hormônio auxina, e provocou aumento no teor de antocianinas, no peso seco, no acúmulo de açúcar, diminuição na dureza e aumento nos compostos voláteis. Além disso, também em bagas de uvas, foi constatado que a aplicação de auxina sintética promove o atraso do amolecimento do fruto, resultado pela expansão celular promovida por esse hormônio (SANTO *et al.*, 2020). Esse retardo é causado pela inibição da síntese de enzimas de degradação (modificação e degradação de pectinas) da parede celular, causada pela auxina, e que

consequentemente reduziu o transporte e a deposição de sacarídeos, atrasando o amadurecimento (HUANG; HUANG, 2001; SANTO *et al.*, 2020).

Atualmente, é relatado na literatura que alguns genes de fatores de resposta a auxina podem regular positivamente o amadurecimento e a indução de açúcar, entretanto outros ARF têm um balanço negativo na maturidade do fruto (MISHRA; SHARMA; LAXMI, 2021). Em tomate, *SlARF6A* por exemplo, em regulou positivamente a expressão de genes envolvidos no metabolismo do açúcar frutos, e proporcionou aumento níveis de frutose, sacarose e glicose durante o desenvolvimento do fruto (YUAN *et al.*, 2019). Schemberger *et al.* (2020) demonstra através da interação proteína-proteína *in silico*, que também há uma correlação entre a sacarose sintase e ARF em estádios finais do amadurecimento de frutos de melão amarelo. Apesar disso, esse mecanismo deve ser melhor investigado, visto que esses fatores de transcrição podem agir sobre outros genes da via de AIA e de sacarose, regulando – os positivamente ou negativamente (MISHRA; SHARMA; LAXMI, 2021).

Além das hexoses e dos oligossacarídeos, o sorbitol é um poliálcool que quando catabolizado pela sorbitol desidrogenase dependente de NAD⁺ (*NADSDH*), é convertido em amido ou frutose (SUTSAWAT *et al.*, 2008); KIM *et al.*, 2015). Esse açúcar é o principal translocado em frutíferas da família *Rosaceae*, entretanto, em morango assim como o melão, a sacarose é o principal carboidrato. Em estudos em *Fragaria vesca*, foi apontado que *NADSDH* foi induzida por AIA, visto que essa enzima é bastante expressa nos estádios iniciais do desenvolvimento do fruto (SUTSAWAT *et al.*, 2008; LEE, 2015;). Portanto, necessita – se de outros estudos para reportar o papel dos açúcares e a suas relações com a auxina no amadurecimento.

Em meloeiro, a frutose e a glicose são sintetizadas a partir da sacarose oriunda da fotossíntese, e esses monossacarídeos parecem estar em maiores concentrações em frutos jovens para a síntese de sacarose de reserva na maturidade (SALADIÉ *et al.*, 2015; SCHEMBERGER *et al.*, 2020; STROKA *et al.*, 2021). O sorbitol serve de substrato para o acúmulo de frutose (em amoras e framboesas), ou amido em frutíferas como maçã e manga (SUTSAWAT *et al.*, 2008); LEE, 2015; KIM *et al.*, 2015), entretanto, esse açúcar pode ser melhor investigado quanto a maturação do melão e ao tratamento com auxinas exógenas.

3.3 ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA AUXINA

A auxina endógena mais abundante é o ácido indolilacético (AIA), o qual é um ácido orgânico fraco semelhante ao aminoácido triptofano. sendo que este possui um anel indol e uma

função de ácido carboxílico (PAQUE; WEIJERS, 2016). Este fitormônio foi estudado e descrito pela primeira vez no livro “*The power of movement in plants*” por Charles Darwin e seu filho Francis Darwin, em 1881 (TAIZ *et al.*, 2017). Esses autores relataram que as plantas desempenham movimentos, onde em sua experiência utilizaram plântulas de alpiste (*Phalaris canariensis*) e aveia (*Avena sativa* L.) cultivadas no escuro, disponibilizando luz em apenas um dos lados (KUTSCHERA; BRIGGS, 2009). Concluíram então que os coleóptilos se desenvolveram na direção em que foi disposta a luz, formando uma curvatura, e estimaram que o fenômeno ocorresse devido ao estímulo produzido no ápice de orientação descendente (KÜPERS; OSKAM; PIERIK, 2020).

O ácido indolilacético é predominantemente sintetizado em tecidos jovens em desenvolvimento, como os meristemas apicais das raízes e do caule (LJUNG; BHALERAO; SANDBERG, 2002; PETERSSON *et al.*, 2009). A auxina é um hormônio vegetal que participa na regulação de vários processos de crescimento e formação, como: alongamento e curvatura do coleóptilo, promoção da rizogênese, inibição da axilaridade, crescimento de gemas, prevenção de abscisão de frutos e indução de partenocarpia em frutos (KEFELI; KALEVITCH, 2003).

Essas respostas fisiológicas foram evidenciadas ao longo dos anos através da compreensão da via metabólica do ácido indolacético (AHARONI *et al.*, 2002; JIA *et al.*, 2020). Estudos relataram que alguns genes regulados para o amadurecimento, por exemplo, podem ser reprimidos ou induzidos pela auxina, a exemplo de genes que fazem parte do metabolismo de auxina (JIA *et al.*, 2020; CASANOVA-SÁEZ *et al.*, 2021), e também genes responsivos à pigmentação e a compostos aromáticos, estresse e defesa, do metabolismo da parede celular e ao metabolismo de ácidos graxos (AHARONI *et al.*, 2002; JIA *et al.*, 2020; CASANOVA-SÁEZ *et al.*, 2021).

3.3.1 Via metabólica da auxina

A biossíntese de auxina é amplamente estudada há anos, e embora haja algumas incógnitas em relação aos precursores do ácido indolilacético, são propostas duas vias metabólicas (Figura 2), sendo elas: a dependente de triptofano e a independente de triptofano, (YUE; HU; HUANG, 2014). O triptofano é descendente de um grupo indol (INS) localizado no interior do cloroplasto da célula (CASANOVA-SÁEZ *et al.*, 2021). Entretanto, há alguns anos pesquisadores verificaram que mutantes de milho eram incapazes de sintetizar triptofano, mas sintetizaram AIA, apontando que esse hormônio poderia ser derivado diretamente do grupo

indol que por sua vez estaria no citoplasma, ao contrário da via dependente de triptofano (WRIGHT *et al.*, 1991; CASANOVA-SÁEZ *et al.*, 2021).

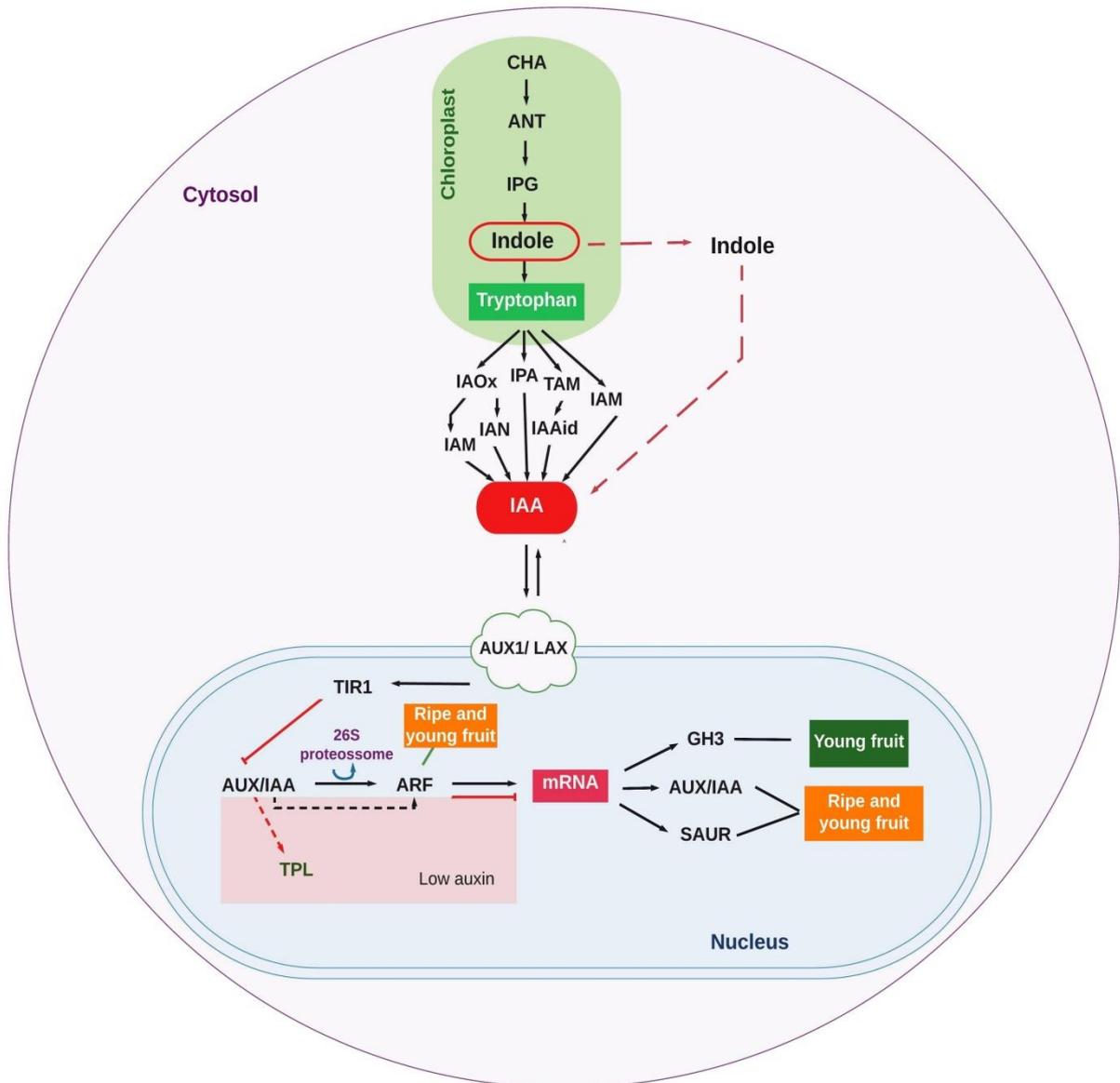
Nos estudos de Mashiguchi *et al.* (2011), foram propostas alterações na via dependente de triptofano já estabelecida em outros trabalhos. O triptofano pode ser convertido em quatro principais compostos até a formação do ácido indolilacético (CASANOVA-SÁEZ *et al.*, 2021). O composto mais relevante na reação de conversão é o ácido indol-3-pirúvico (IPA), que tem a participação direta das enzimas TAA/YUC (Tryptophan Aminotransferase of Arabidopsis/YUCCA do tipo Flavina Monooxigenase), a qual promove a biossíntese de AIA, mas o triptofano pode também ser transformado em indol-3-acetamida (IAM), indol-3-acetaldoxima (IAOx) e triptamina (TAM) (QUINT; GRAY, 2006; FENG *et al.*, 2019).

Apesar de poucos resultados encontrados sobre a via independente de triptofano, Wang *et al.* (2015) indicam com base em outros estudos, que um componente metabólico indol (INS) localizado no citosol e descendente do mesmo precursor de triptofano (o fosfato indol-3-glicerol), é um elemento chave na rota independente de triptofano, que origina o ácido indolilacético.

Após ocorrer a síntese de AIA no citosol, este composto pode ser carregado por transportadores no influxo e no efluxo. O influxo não polar é mediado pela família de proteínas *auxin influx carriers* (AUXIN1/LIKE-AUX1) (BENNETT *et al.*, 1996; SWARUP; PÉRET, 2012; SINGH *et al.*, 2018). Há carreadores do efluxo PINFORMED (PIN), e também há os que desempenham as duas funções de efluxo e influxo, sendo eles os transportadores de classe B do cassete de ligação de ATP (ABCB). Estes podem manter o fluxo de transporte de auxina acropetal, regulando os níveis de auxina no periciclo (WI'SNIEWSKA *et al.*, 2006; ADAMOWSKI; FRIML, 2015; JENNESS *et al.*, 2019).

Com os níveis elevados de auxina no núcleo da célula, ocorrerá a interação entre o inibidor de transporte (TIR1) e a proteína responsiva (Aux/IAA), as quais são reguladoras negativas de auxina. Os TIR1 que formam a ubiquitina ligase agem na degradação de Aux/IAA, através do proteossoma 26S (GRAY *et al.*, 2001; WINKLER *et al.*, 2017). Entretanto, quando o nível de auxina é baixo, as proteínas Aux/IAA se ligam ao co-repressor TPL, inibindo alguns fatores de resposta à auxina (ARFs), e os quais consequentemente inibem transcrição ao mRNA (CALDERÓN-VILLALOBOS *et al.*, 2010; HAYASHI, 2012; LJUNG, 2013).

Figura 2. Via biossintética e mecanismo de transdução de sinal de ácido indolacético parciais, sugerida na maturação de frutos de melão amarelo, baseadas nos resultados de Schemberger *et al.* (2020).



Fonte: adaptado pela autora de: Mashiguchi *et al.* (2011); Wang *et al.* (2015); Schemberger *et al.* (2020). A via da transdução de sinal foi respaldada pela base de dados KEEG PATHWAY (https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map04075). IAA – ácido indolilacético; ANT – antranilato; ARF - fator de resposta a auxina; AUXIN1/LIKE-AUX1 - carreadores de auxina do influxo; CHA - ácido corísmico; GH3 - ácido indolacético acético amido sintetase; IAA - proteína responsiva a auxina; IAAld - indol-3-acetaldeído. IAM - indol-3-acetamida; IAN - indol-3-acetonitrilo; IAOx - indol-3-acetaldoxima; IGP - fosfato de indol-3-glicerol; INS – indol; IPA - ácido indol-3-pirúvico; SAUR - proteína induzida por ácido indolacético; TAM – triptamina; TIR1 - inibidor de transporte de resposta; TPL - Co-repressor TOPLESS.

Os ARF's são caracterizados por reprimirem ou induzirem a transcrição através de sua integração a elementos promotores de ação *cis* responsivos a auxina (AuxREs), utilizando um domínio de ligação de DNA N-terminal, fazendo com que as proteínas Aux/IAA ativem a

transcrição e modifiquem a atividade de ARF através dos domínios de interação proteína-proteína C-terminal encontrados nas mesmas. Os fatores de resposta e as proteínas responsivas a auxina estão intimamente ligadas, porque há a formação de heterodímeros entre as mesmas, pois Aux/IAA não tem a ligação terminal, e assim seja codependente de ARF para poder alterar sua capacidade de modular a expressão precoce de genes de resposta à auxina.

A transdução de sinal de auxina é sucedida pelas famílias de genes de proteínas responsivas a auxina (*Small Auxin-Up RNAs* - SAUR) e ácido indol-3-acético-amido sintetase (GH3) (QUINT; GRAY, 2006). Essas proteínas são responsáveis por regular o equilíbrio da auxina em processos como, a divisão celular e o alongamento celular, na morfogênese de raízes e caules, dominância apical e desenvolvimento de folhas, flores e frutos (DAVIES, 2004).

A enzima GH3 é responsável por catalisar a síntese de conjugados de ácido indolacético com aspartato e glutamato (para degradação), ou com leucina e alanina (armazenamento temporário), proporcionando um mecanismo de homeostase de auxina endógena (STASWICK *et al.* 2005; JAIN *et al.*, 2005). Já a ampla família de proteínas induzidas por auxina (ARG) integram os chamados SAUR, fazendo com esses genes interajam com proteínas fosfatases 2C desfosforilando H⁺ATPases da membrana plasmática e juntamente com a auxina, proporcionam a acidificação da parede celular promovendo a indução da expansão celular (GIL *et al.*, 1994; SPARTZ *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2021).

3.4 AUXINA NA MATURAÇÃO DE FRUTOS

Há anos muitas pesquisas apontam que a auxina e suas interações com outros compostos, ou até mesmo com os hormônios vegetais, pode ser um importante fator no que se diz respeito à maturação de frutos, tanto de climatéricos como não climatéricos (KUMAR; KHURANA; SHARMA, 2014; TERIBIA; TIJERO; MUNNÉ-BOSCH, 2016; FUENTES; FIGUEROA; VALDENEGRO, 2019).

Um estudo com bagas de uva tratadas com ácido benzotiazol-2-oxiacético (BTOA), uma auxina sintética, resultou em atraso de duas semanas para o início da maturação. Isso ocorreu devido ao retardo da síntese de ácido abscísico, reduzindo também o acúmulo de açúcar, a atividade da invertase e a expressão do gene da invertase (DAVIES; BOSS; ROBINSON, 1997). Além disso, o nível de expressão de chalcona sintase (*CHS*) e UDP-glicose-flavonóide 3-O-glucosil transferase (*UFGT*) foi reduzido, assim como de uma quinase (*VvChi4*) e um gene *GRIP4* (clone participante da maturação), tais quais estão presentes na síntese de antocianina e açúcares que regulam o amadurecimento (DAVIES; BOSS; ROBINSON, 1997).

Com base nisto, é conhecido que a auxina pode regular a expressão gênica de codificadores de enzimas correspondentes a atividades de pigmentação, estresse ou defesa, ao metabolismo da parede celular e de ácidos graxos, à síntese de sabor e aroma (aldeído, éster, e a biossíntese de terpeno) (AHARONI *et al.*, 2002). Essas enzimas participam do processo de amadurecimento de frutos, e genes correlatos às mesmas podem ser regulados por repressores de auxina e de amadurecimento, bem como pode ocorrer a indução de alguns genes por auxina e a regulação pelo desenvolvimento inicial médio (AHARONI *et al.*, 2002).

A auxina pode ainda interagir com outros hormônios modulando o amadurecimento, como por exemplo, o etileno e o ácido abscísico. (KUMAR; KHURANA; SHARMA, 2014; FUENTES; FIGUEROA; VALDENEGRO, 2019). Um modelo disso é o fato de a aplicação exógena de auxina em frutos poder atenuar a atividade do etileno e de alguns transcritos de carotenoides (SU *et al.*, 2015). Em contrapartida, esse tratamento pode propiciar o acúmulo de transcritos β -Lcyl e Crtr- β 1, levando a níveis mais elevados de clorofila a, neoxantina, violaxantina e, conseqüentemente ao sucessor ABA (SU *et al.*, 2015). Porém, os níveis de ABA endógenos tendem a aumentar durante o amadurecimento dos frutos, e proporcionalmente os níveis de AIA tendem diminuir conforme o avanço dos estádios de maturação, em condições normais de crescimento (XIAO *et al.*, 2020). Isso pode ser explicado pelo estresse que o acúmulo de auxina exógena causa nos frutos e na planta como um todo, modulando a expressão positiva ou negativa de algumas enzimas na maturação dos frutos, as quais participam da sua rota metabólica (XIAO *et al.*, 2020).

Em relação às enzimas pertinentes a via metabólica da auxina na maturação de frutos, as pesquisas ainda estão começando a se difundir devido à complexidade das interações (FUENTES; FIGUEROA; VALDENEGRO, 2019). Além disso, não é conhecido ao certo qual é o papel de algumas enzimas participantes da transdução de sinal de auxina, pois a atividade das mesmas é muito variável tanto em relação aos frutos climatéricos e não - climatéricos, quanto às características intrínsecas de cada espécie (KUMAR; KHURANA; SHARMA, 2014; FUENTES; FIGUEROA; VALDENEGRO, 2019).

3.4.1 Transdução de sinal de auxina na maturação de frutos

As proteínas e enzimas ligadas à transdução de sinal da auxina são amplamente estudadas no desenvolvimento da planta. Algumas delas desempenham um papel interessante no crescimento dos frutos e apresentam associação com açúcares (KUMAR; KHURANA; SHARMA, 2014; TERIBIA; FUENTES; FIGUEROA; VALDENEGRO, 2019).

Parte da expressão gênica da auxina é mediada através da família de fatores de resposta de auxina (ARF). Os ARF estão atrelados aos elementos de respostas de auxina (AuxRE) e a proteína responsiva (AUX/IAA), determinando assim, a transcrição ou inibição de determinados genes (LI *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2016). Em um estudo realizado com tomate, o gene *SlARF6A* regula positivamente o acúmulo de clorofila, o número de cloroplastos e a fotossíntese, e em consequência há o aumento do conteúdo de amido e açúcares solúveis nos frutos como a sacarose, glicose e frutose (YUAN *et al.*, 2019). O *SlARF6A* pode atuar diretamente no promotor de etileno *SAMS1* (S-adenosil-L-metionina), e regula negativamente sua expressão, diminuindo a síntese de etileno e retardando o amadurecimento dos frutos (YUAN *et al.*, 2019).

Segundo Estrada-Johnson *et al.* (2017), na maturação não - climatérica é possível observar que em frutos de morango os ARFs são expressos no desenvolvimento do aquênio e nos receptáculos, acompanhando a evolução dos estádios de verde para o vermelho. Em bagas uvas pode – se verificar que alguns genes são altamente expressos principalmente em estádios finais de maturação como *VvARF1*, *VvARF16*, *VvARF18* e *VvARF3*. As demais cinco isoformas ARF elucidadas nesses frutos apresentam um comportamento contrário, ou seja, são mais expressas na fase inicial de maturação (WAN *et al.*, 2014).

Em um trabalho realizado com durião, o qual é um fruto climatérico, foram identificados 12 genes altamente expressos na polpa, entre eles os mais expressos foram *DzARF2A*, *DzARF19*, *DzARF3* e *DzARF6*. Com isso, os níveis de expressão de *DzARF2A* e *DzARF19* foram induzidos sob ethephon (indutor de etileno) e suprimidos sob 1-MCP (inibidor de etileno), apontando que há uma tendência crescente durante o amadurecimento pós-colheita relacionado ao hormônio etileno (KHAKSAR; SIRIKANTARAMAS, 2020). Em contraste, os níveis de expressão de *DzARF3* e *DzARF6* foram significativamente suprimidos sob etileno, mas induzidos sob 1-MCP e mostraram uma tendência decrescente durante o amadurecimento (KHAKSAR; SIRIKANTARAMAS, 2020). Esses autores ainda fomentam a importância de estudar um conjunto de fatores de transcrição e hormônios, assim também como pode-se notar, a participação do metabolismo de açúcares.

Em melão climatérico foram identificados os genes *CmARF9*, *CmARF16-like*, *CmARF19-like*, *CmARF19*, *CmARF1*, *CmARF2*, *CmARF3* e *CmARF5* que estão associados ao crescimento inicial do fruto. Os genes *CmARF16-like* e *CmARF3* foram correlacionados com o crescimento celular horizontal do fruto do melão, enquanto o *CmARF9* foi correlacionado com o crescimento celular vertical do fruto do melão (WU *et al.* 2020).

Apesar dessas informações, deve-se investigar qual é a participação desses genes em cada estágio de maturação (KUMAR; KHURANA; SHARMA, 2014; FIGUEROA; VALDENEGRO, 2019).

A enzima GH3 foi descrita pela primeira vez por Hagen; Guilfoyle (1985) em soja. Entretanto, há indicativos de que a mesma pode atuar na degradação da auxina (BERNALES *et al.*, 2019). A atividade de uma proteína GH3 foi associada ao amadurecimento do fruto na pimenta pungente (não - climatérica), onde é altamente expressa no pericarpo e na placenta. Contudo, este gene *GH3* é indutível por etileno no início da maturação e a superexpressão do gene *GH3* da pimenta levou ao amadurecimento mais rápido após um estímulo de etileno (LIU *et al.*, 2005; BÖTTCHER *et al.*, 2010).

Em frutos de uva também pode – se observar que o aumento na expressão de *GH3-1* se dá em resposta a tratamentos com ABA e sacarose, acarretando no amadurecimento do fruto. Isso indica que o açúcar e o ABA podem atuar juntos para aumentar os níveis de transcrição de *GH3-1* na fase de teste (BÖTTCHER *et al.*, 2010). Foram identificados também seis membros da família GH3 em morango, sendo que a expressão dos mesmos é mais elevada no aquênio. A maior expressão de *FaGH3.1* está no receptáculo, e diminuiu drasticamente do estágio verde para vermelho (ESTRADA-JOHNSON *et al.*, 2017).

Em frutos de kiwi foram identificados algumas isoformas de GH3 na pós-colheita, onde a maioria é pouco expressa nesse estágio, e apenas o *GH3.1* tem altos níveis de expressão. Esse gene em kiwi é induzido por etileno e auxina, e o mesmo contém elementos *cis* relacionados a elementos de resposta de ABA, etileno, ácido salicílico e também à auxina (GAN *et al.*, 2019).

Avaliando o genoma de frutos de mamão, foram observados sete isoformas de GH3, onde apenas três destas (*CpGH3.1a*, *CpGH3.6* e *CpGH3.1*) atuam no amadurecimento (LIU *et al.*, 2016). Isso pode ser explicado pelo fato de que o GH3 atua na homeostase nos níveis de AIA endógena, fazendo com que superexpressão dessas isoformas estudadas possam inferir no amadurecimento (LIU *et al.*, 2016). Em geral, sustenta – se a hipótese de que a maioria das isoformas de GH3 pode ser regulada negativamente para a maturação dos frutos, embora hajam algumas delas reguladas positivamente para o evento em frutos climatéricos.

Em relação à família de proteínas responsivas à auxina (Aux/IAA), também há fortes evidências de que genes pertinentes às mesmas podem atuar como relevante participante na maturação de frutos (KUMAR; KHURANA; SHARMA, 2014; TERIBIA; TIJERO; MUNNÉ-BOSCH, 2016; FUENTES; FIGUEROA; VALDENEGRO, 2019). Estudando genes da família Aux/IAA relacionados ao amadurecimento do mamão, Liu *et al.* (2017) constataram que algumas isoformas identificadas no genoma desse fruto têm alto potencial de atuação no

amadurecimento, sendo que a expressão do gene *CpIAA27* aumentou significativamente durante o processo de amadurecimento da fruta, em especial no estágio 5 de uma escala de 1 a 6.

Esse mesmo evento foi observado em frutos de morango, onde os níveis de transcrições de *FaAux/IAA1* e *FaAux/IAA2* se mostraram elevadas no estágio inicial de desenvolvimento do fruto, diminuindo na fase de maturação (LIU; CHEN; LU, 2010).

Em um experimento realizado com frutos de pêsego da variedade ‘Jing Yu’ que possuem maior rigidez, foi analisado que a expressão de genes *PpIAA* de Aux/IAAs se mostrou baixa em frutos maduros, assim como foram observadas as menores concentrações de etileno nesse estágio de desenvolvimento, sugerindo que esses fatores atuam também na diminuição do amolecimento da fruta (GUAN *et al.*, 2019). As proteínas responsivas à auxina (Aux/IAAs) também têm papel fundamental sobre o amadurecimento de frutos não – climatéricos FUENTES; FIGUEROA; VALDENEGRO, 2019). Desse modo, as Aux/IAAs foram investigadas em frutas não - climatéricas como a uva, e observou-se que os níveis de expressão do clone *VvAux/IAA4* foram elevados durante o desenvolvimento da baga, e por consequência diminuiu na progressão dos estádios de amadurecimento (ÇAKIR; KILIÇKAYA; OLCAY, 2012). Esses autores mencionam que a supressão de *VvAux/IAA4* na maturação pode estar relacionada com fatores de resposta ao estresse salino e à seca.

Por fim, em relação aos membros da família de proteínas responsivas a auxina (SAUR) ainda têm-se poucos estudos que os associam à maturação dos frutos. Contudo, foi aplicado um mutante através de um RNA interferente *Sl-SAUR69* regulado pelo gene alvo RIN, a qual induz a síntese inicial de etileno (SHIN *et al.*, 2019). Concluíram então que a atividade da auxina no mutante *Sl-SAUR69* RIN em tomate permanece em níveis elevados conforme a progressão do amadurecimento dos frutos (SHIN *et al.*, 2019). Sugere-se o mutante *Sl-SAUR69* provoca uma expressão reduzida em RIN e a regulação crescente resulta no início prematuro do amadurecimento, porém quando há regulação negativa, o período de maturação é estendido (SHIN *et al.*, 2019). É sabido que a família é expressa em frutos de lichia, assim como existem relatos que estão presentes em frutos de morango nos estádios iniciais de desenvolvimento (PILATI *et al.*, 2007; FIGUEROA *et al.*, 2012; KUANG *et al.*, 2012). No entanto, é limitante a compreensão desse gene nos tecidos das plantas em geral, mas em especial na maturação dos frutos, pois é uma família bastante complexa, abrangente e pode ter perfis bem divergentes entre as espécies (ZHANG *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2021; TIAN *et al.*, 2022).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREA EXPERIMENTAL E MATERIAL VEGETAL

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, e nos laboratórios de Biotecnologia Aplicada à Fruticultura e Biologia Molecular Microbiana, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), do município de Ponta Grossa. As sementes de melão do tipo “Amarelo” *cv.* Eldorado do grupo Inodorus, foram selecionadas e tratadas com uma solução a 0,5% de hipoclorito de sódio, durante cinco minutos. Posteriormente, foram semeadas três sementes em cada vaso, na segunda quinzena de outubro de 2021, dispostas em vasos plásticos de 15 litros com 50% de substrato composto de casca de pinus e cinza, e 50% de solo (Figura 3).

Figura 3. Semeadura de melão amarelo do grupo Inodorus (a): disposição dos vasos na área experimental, logo após a semeadura; (b): sementes de melão da *cv.* Eldorado, submetidas ao tratamento com hipoclorito de sódio. Ponta Grossa – PR, 2021.



Fonte: a autora (2021).

As plantas foram conduzidas em varais verticais por um fitilho plástico, e foram efetuados os tratos culturais, como a irrigação manual em um intervalo de 1 a 2 dias (Figura 4).

O desbrote de ramos, necessário à indução do crescimento vertical e desenvolvimento de gemas florais, foi realizado até o sétimo nó e novamente a partir do décimo nó. Além disso, foram realizadas polinizações manuais, obtendo - se como produto final um ou dois frutos viáveis por planta.

Figura 4. Área experimental de plantas de melão cultivadas em casa de vegetação, no estádio reprodutivo, no município de Ponta Grossa – PR, 2021-2022.



Fonte: a autora (2021).

O delineamento experimental aplicado foi em blocos casualizados (DBC), composto por 6 tratamentos, os quais foram denominados de: frutos controle aos 30 dias após a polinização (D.A.P), frutos controle na completa maturação, frutos tratados com ácido indolacético (AIA), frutos tratados com o inibidor de auxina ácido 2,3,5-triodobenzóico (TIBA), e frutos tratados com os açúcares, sacarose e sorbitol (Figura 5). Portanto, cada tratamento foi composto por 4 repetições, totalizando em 24 frutos.

Figura 5. Croqui da área experimental de plantas cultivadas de melão, na safra 2021-2022, em Ponta Grossa - PR. T1: controle – frutos verdes; T2: controle – frutos maduros; T3: frutos tratados com AIA; T4: frutos tratados com TIBA; T5: frutos tratados com sacarose; T6: frutos tratados com sorbitol.

Bloco 1	T3R2	T1R1	T2R2	T6R4	T5R1	T4R3
Bloco 2	T6R3	T3R4	T5R4	T2R1	T4R2	T1R3
Bloco 3	T1R2	T4R1	T6R2	T5R2	T2R4	T3R3
Bloco 4	T4R4	T5R3	T2R3	T1R4	T3R1	T6R1

Fonte: a autora (2021).

4.2 TRATAMENTOS EXÓGENOS

Para avaliar os parâmetros físico – químicos pós – colheita e a expressão gênica de transdução de sinal de auxina no desenvolvimento do fruto, foram realizadas aplicações de AIA, TIBA, sacarose e sorbitol aos 30 D.A.P de cada fruto, conforme exposto na Tabela 1. Os tratamentos de AIA e TIBA foram incorporados em 1g de pasta de lanolina (devido a insolubilidade de AIA e TIBA em água), e aplicada na região próxima ao pedúnculo do fruto. A sacarose e o sorbitol foram dissolvidos em água destilada, e as aplicações foram realizadas via injeção através de uma seringa plástica, também próximas ao pedúnculo.

Tabela 1. Tratamentos e suas respectivas concentrações aplicadas em frutos de melão amarelo cv. ‘Eldorado’, em diferentes métodos de aplicação. Município de Ponta Grossa – PR, 2021/2022.

Tratamentos	Concentração (μM)	Método de aplicação
AIA	600	Pasta de lanolina
TIBA	200	Pasta de lanolina
Sacarose	200	Injeção
Sorbitol	200	Injeção

Fonte: a autora (2021).

4.3 COLHEITA DOS FRUTOS E ANÁLISES PÓS - COLHEITA

A colheita dos frutos foi realizada em dois períodos (Figura 6), ou seja, aos 30 dias após a polinização e na completa maturação (aproximadamente 45 D.A.P.). As análises pós – colheita realizadas foram: peso do fruto, comprimento, diâmetro, firmeza, colorimetria, conteúdo de sólidos solúveis, pH e acidez titulável e *ratio*.

A firmeza da polpa foi mensurada em duas regiões horizontais de cada fruto, através de um penetrômetro de ponteira cilíndrica de 8 mm de diâmetro, sendo que os dados foram expressos em Newton (N).

Em seguida, foi realizada a análise de colorimétrica da casca e da polpa de cada fruto através de um colorímetro digital Minolta, sendo levados em consideração os parâmetros L^* (luminosidade), a^* (coordenada verde/vermelho: -a indica tons de verde e +a tons de vermelho), b^* (coordenada azul/amarelo: -b referente a tons de azul e +b tons de amarelo) e ângulo Hue,

apontado como o verdadeiro valor da coloração do fruto. O ângulo Hue foi calculado através da equação $h^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*)$ quando $a^* > 0$ e $b^* > 0$ e pela equação $h^\circ = 180 + \tan^{-1}(b^*/a^*)$ quando $a^* < 0$ ou $b^* > 0$ (COMMISSION INTERNATIONALE DE L'ECLAIRAGE, 1986).

Figura 6. Frutos de melão amarelo cv. Eldorado após a colheita aos 30 dias após a polinização (fruto verde), e no amadurecimento pleno - aproximadamente 45 dias após a polinização (para frutos maduros sem tratamento e frutos com tratamentos exógeno de ácido indolacético (AIA), ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA), sacarose e sorbitol. Safra 2021/2022, Ponta Grossa – PR.



Fonte: a autora (2022).

Para a obtenção do conteúdo de sólidos solúveis, cada fruto foi macerado e assim foi aferida uma gota do suco pelo refratômetro manual modelo DIGIT, sendo que os resultados expressos em °Brix.

A determinação do pH foi feita através de 5g de amostra do suco, a qual foi diluída em 45mL de água destilada. Para isso, utilizou - se um pHmetro da marca Hanna pH 21 pH/mV meter (Sigma-Aldrich®), com calibração das soluções tampão pH 7,0 e pH 4,0. Os resultados obtidos foram dados em valores reais de pH.

A análise de acidez titulável foi procedida por meio da titulação de 5g de suco do fruto diluído em 45 mL de água destilada, adicionando-se uma solução de NaOH 0,1 N. Os dados foram apresentados em porcentagem (%) de ácido cítrico (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). O sabor verdadeiro do fruto foi estudado através da razão entre sólidos solúveis/acidez titulável.

Posteriormente à essas análises, os mesocarpos dos frutos foram selecionados em triplicata biológica, os quais foram congelados em nitrogênio líquido imediatamente após a colheita, e armazenados a -80°C até a extração do RNA total.

4.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

O RNA total foi extraído de 4g de mesocarpo de 3 frutos provenientes de cada tratamento, através do método de perclorato de sódio (CAMPOS *et al.*, 2017). A purificação do ácido nucleico foi efetuada através das soluções de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), e clorofórmio: álcool isoamílico (24:1).

Em sequência, o RNA total foi submetido ao tratamento com DNase (kit TURBO™ DNase - Invitrogen), a fim remover contaminações por DNA genômico, eventualmente manifestadas durante a extração. A integridade do RNA foi determinada através da metodologia de eletroforese em gel de agarose, a 1% com tampão TAE (Tris-Acetato EDTA), sendo consideradas amostras de qualidade as que apresentaram nitidez nas bandas 18S e 28S. Por meio do espectrofotômetro Nanovue™ foi aferida a quantificação, e através desse parâmetro, foram utilizadas as relações $A_{260}/A_{280} \sim 2,0$ e $A_{260}/A_{230} \sim 1,70$ para efetuar a análise de RT-qPCR (SCHEMBERGER *et al.*, 2020).

A transcrição reversa é necessária para termoestabilizar o RNA durante a ciclagem da análise de qPCR, e por isso procedeu - se a síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA) através de 2 μg de RNA, utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™).

4.5 DESENHO DE INICIADORES - PRIMERS

Os genes relacionados à transdução de sinal de auxina foram explorados em frutos verdes e maduros de melão, de acordo com o banco de dados obtidos por Schemberger *et al.* (2020). No RNAseq desses autores, alguns genes foram diferencialmente expressos entre os estádios de maturação estudados (Tabela 2). As isoformas que apresentam log2fold change maiores que 0 são mais expressas no estádio de maturação de 10 DAP, entretanto as isoformas que têm log2fold change menores que 0 são mais expressas em 40 DAP.

Tabela 2. Genes estudados em relação à transdução de sinal do hormônio auxina no melão, e seus respectivos ID's das plataformas Melonomics e NCBI.

Gene	Melonomics ID	NCBI ID	Log2Fold Change
Indol-3-ácido acético amido sintetase (<i>GH3.5-like</i>)	MELO3C008672.2	XP_008441807	3,942719309
Fator de resposta de auxina 3 isoforma X3 (<i>ARF3</i>)	MELO3C007251.2	XP_016899372.1	-0,738121763
Fator de resposta de auxina 1 (<i>ARF1</i>)	MELO3C022932.2	XP_008460595.1	-0,739735987
Proteína responsiva a auxina (<i>IAA11</i> isoforma X2)	MELO3C007691.2	XP_00844737.1	-0,740934833
Proteína induzida por ácido indol-3-acético (<i>SAUR36</i>)	MELO3C022337.2	XP_016900724.1	-1,138636164

Fonte: Os genes foram obtidos a partir da base de dados Cucurbit Genomics para o melão, e através do Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI). *log2fold > 0 – indica que os genes são mais expressos no fruto jovem; log2fold < 0 – indica que os genes são mais expressos no fruto maduro. Adaptado: Schemberger *et al.* (2020).

Os genes de referência utilizados para normalização foram *CmRPL-60S* (proteína ribossomal L) e *CmRPS15* (proteína ribossômica citosólica S15), conforme descritos nos trabalhos de Kong *et al.* (2014) e Kong *et al.* (2016), respectivamente, para mesocarpo de melão.

Dessa forma, as sequências de RNAm foram obtidas a partir da base de dados Cucurbit Genomics, e os primers específicos foram desenhados através da plataforma Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), sendo que a qualidade dos mesmos foi mensurada a partir do software Beacon Designer.

Em seguida, os *primers* foram testados em gradiente de temperatura por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase - *Polymerase Chain Reaction*) para determinação da melhor temperatura de anelamento, conforme exposto na Tabela 3.

Tabela 3. Sequências *forward* (5'-3') e *reverse* (5'-3') de primers, utilizados como iniciadores da transcrição dos genes de transdução de sinal de auxina para o melão. Com base nas sequências de RNAm, obtidas através da base de dados Cucurbit Genomics, os primers foram confeccionados através da plataforma Primer-BLAST do Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI), e a qualidade dos mesmos foi mensurada a partir da ferramenta Beacon Designer.

Gene	Short form	Forward		Amp. (pb)	Tm (°C)
		Forward	Reverse		
Ácido indolacético acético amido sintetase 3.5	<i>CmGH3.5</i>	F 5' GCACGGACACATACCAAAGC 3'	R 5' TGAAGCAACCCAGAAGCGAA 3'	103	64
Fator de resposta a auxina 3	<i>CmARF-X3</i>	F 5' ACTTATTTGTGGGGGCAGCA 3'	R 5' CGGGTGTTCCTTTTCGTTTGATG 3'	191	64
Fator de resposta a auxina 1	<i>CmARF1</i>	F 5' ATGGTCGGTGAGGATAGGCT 3'	R 5' GCTGCGGATTTGTCTGCTTT 3'	162	64
Proteína responsiva a auxina	<i>CmIAA11-X2</i>	F 5' AATGACCACAACAATGCTCCG 3'	R 5' CACTTGAACCTGGCTTTCCG 3'	133	64
Proteína induzida por ácido indolacético	<i>CmSAUR36</i>	F 5' AAAATCCTTGCCCTCGCTTGG 3'	R 5' AATCTCTGCCTCTCTGCTCC 3'	135	64
Proteína ribossômica citosólica S15	<i>CmRPS15</i>	F 5' GAAGCTGCGTAAAGCGAAAC 3'	R 5' GGTCTTCCATTGTAAACTCCAA 3'	132	63
Proteína ribossomal L	<i>CmRPL-60S</i>	F 5' CGACAATACTGGAGCCAAGAA 3'	R 5' CATCACCATATCTCCCACACAA 3'	100	63

Fonte: a autora (2020).

4.6 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR qPCR

A qPCR foi realizada para avaliar a expressão dos genes de referência e dos de interesse, pelo termociclador AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies®). A reação ocorreu através de cDNA para uma reação contendo iniciador direto e reverso, o kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR qPCR Master Mix (Agilent Technologies®), e água.

A termociclagem iniciou a 95°C em 10 minutos para a ativação da enzima, e posteriormente foram sucedidos 40 ciclos de três condições de temperatura: 15 segundos a 95°C (desnaturação da dupla fita), 20 segundos em temperaturas específicas para o anelamento dos *primers*, conforme a Tabela 3, e 30 segundos a 72°C para a extensão do fragmento cópia pela

Taq Polimerase. Uma análise da curva de Melting foi aplicada após o perfil térmico, a fim de garantir especificidade na amplificação.

A análise de expressão gênica foi realizada por meio da quantificação relativa através dos valores normalizados dos genes alvo comparados aos de genes de referência, pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde $\Delta C_q = C_q$ (gene alvo) – C_q (gene de referência); e $\Delta\Delta C_q = \Delta C_q$ (amostra de tratamento) – ΔC_q (amostra calibradora) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A amostra de controle em frutos verdes foi utilizada como calibradora, sendo que o valor para a mesma no nível de expressão foi de 0 e 1 para ΔC_q e $\Delta\Delta C_q$, respectivamente. As demais amostras comparadas à calibradora tiveram valores acima ou abaixo de 1 para a determinação da expressão gênica.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos do método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ por RT-qPCR, e os dados das análises físico-químicas foram submetidos à estatística. Para isso, foi adotado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade dos dados (SHAPIRO; WILK, 1965) e, posteriormente foi empregada a análise de variância ($p \leq 0,05$) para os dados paramétricos. A comparação das médias significativas para dados normais foi realizada através do teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Dados não - paramétricos foram submetidos à transformação, ou quando necessário, foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis (teste de significância para dados não – paramétricos) e SNK para determinar as diferenças significativas entre tratamentos. Essas análises foram procedidas pelos softwares Sisvar® e Past3®.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 QUALIDADE PÓS – COLHEITA

As variáveis contínuas como peso, comprimento e diâmetro (tamanho) são requeridas como quesito essencial para agregar valor ao fruto, e conseqüentemente, satisfazer o consumidor. Isso porquê, o peso e o tamanho podem estar associados ao conteúdo de açúcares ou compostos fenólicos, por exemplo, que determinam a qualidade da fruta (KULTUR; HARRISON; STAUB, 2001; PAN *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2020). Nesse trabalho, verificou-se que não houveram diferenças significativas em peso médio, comprimento e diâmetro do fruto em relação aos tratamentos com auxina, TIBA, sacarose e sorbitol exógenos, e também quanto aos estádios de maturação de frutos verdes e maduros (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados médios \pm erro padrão das variáveis de peso, comprimento, diâmetro, e firmeza da polpa de frutos de melão da cultivar Eldorado.

Tratamentos	Peso médio (kg)	Comprimento (cm)	Diâmetro (cm)	Firmeza (N)
Verde	0,88 \pm 0,11	15,19 \pm 1,36	9,63 \pm 0,62	97,94 \pm 8,27
Maduro	1,03 \pm 0,08	15,31 \pm 0,66	10,1 \pm 0,19	59,14 \pm 18,41
Auxina	1,13 \pm 0,07	15,66 \pm 0,44	9,84 \pm 0,36	115,80 \pm 15,68
TIBA	0,83 \pm 0,04	14,24 \pm 1,33	9,21 \pm 0,63	74,61 \pm 18,96
Sacarose	1,04 \pm 0,04	16,21 \pm 0,67	9,61 \pm 0,38	57,11 \pm 10,51
Sorbitol	0,90 \pm 0,07	16,12 \pm 0,70	8,87 \pm 0,37	56,72 \pm 12,65
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CV (%)	13,73	10,55	7,72	38,33

*n.s. = Médias não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: a autora (2022).

Esses resultados podem estar correlacionados com as concentrações exógenas e ao estágio em que as mesmas foram aplicadas, de modo a não alterar essas variáveis. Tal fato pode ser explicado pelo momento de aplicação de auxina, por exemplo, que foi próximo ao amadurecimento pleno (SANTO *et al.*, 2020). É conhecido que esse fitormônio está associado ao crescimento inicial do fruto promovendo a expansão celular, especialmente entre 10 a 20 dias após a polinização, período qual ocorre um rápido aumento das células do mesocarpo, endocarpo e da placenta, resultando no aumento total do fruto (KEFELI; KALEVITCH, 2003;

LJUNG, 2013; ZHANG *et al.*, 2016). Entretanto, tratamentos com auxina exógena muito próximos ao tempo de maturação são menos eficazes, pois esse processo pode já ter sido iniciado à nível molecular, apesar de não haver nenhuma mudança óbvia no fenótipo (SANTO *et al.*, 2020). Sugere – se então, que os frutos de melão amarelo se desenvolvem em tamanho até aproximadamente 20-25 D.A.P., pois no presente trabalho não houveram alterações em diâmetro e comprimento. Esses resultados corroboram com a literatura, visto que está relatado que a partir dos 30 D.A.P, o fruto do melão entra em estágio prematuro e a expansão celular cessa com o volume máximo do fruto e a firmeza da polpa (ZHANG *et al.*, 2016; BAI *et al.*, 2020; LIANG *et al.*, 2022).

Aqui, não houve efeito das aplicações de sacarose e sorbitol, comparados aos frutos de 30 e 45 D.A.P, nem aos frutos submetidos à AIA e TIBA para peso, comprimento e diâmetro. Portanto, propõe – se que as concentrações utilizadas foram insuficientes para causar efeitos fisiológicos visíveis na forma, tamanho e peso médio de melão Eldorado. Alguns trabalhos sugerem que o cálculo para determinar a melhor dose de hormônios e açúcares, é baseado no peso e tamanho médios do genótipo em questão, a fim de atender os objetivos em que se procura uma resposta metabólica (FEI *et al.*, 2020). Estudos em uva indicam que concentrações entre 100 e 200 μM são suficientes para retardar o amadurecimento, assim como 1000 μM tem o mesmo efeito em morango (JIA *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2015).

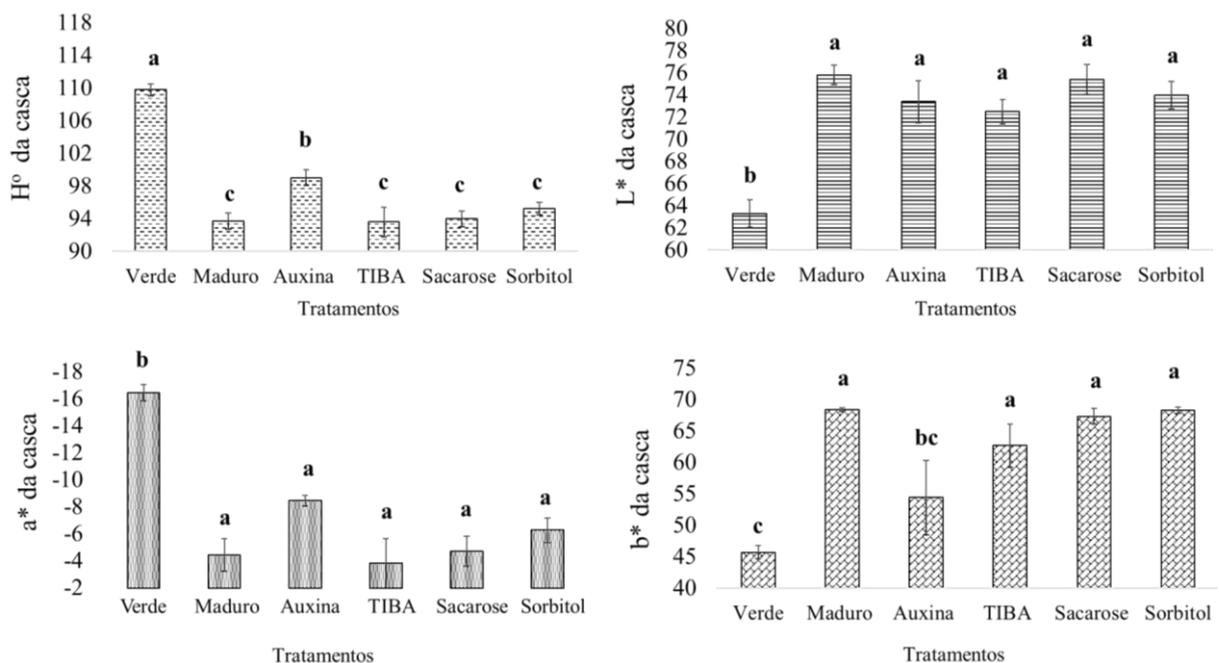
Em relação a firmeza da polpa (Tabela 4), os tratamentos também não diferiram entre si pelo teste de Tukey. O amadurecimento do fruto se dá pelo processo de amolecimento da casca e do mesocarpo, onde algumas enzimas agem sobre a degradação da parede celular e o acúmulo de açúcar (SALADIÉ *et al.*, 2015; SANTO *et al.*, 2020; CASTRO *et al.*, 2021). A auxina por sua vez, contribui para a síntese da parede celular nos frutos mais jovens, sendo uma possível reguladora negativa da maturação (SANTO *et al.*, 2020; CASTRO *et al.*, 2021). De modo geral, as concentrações não causaram efeitos significativos nas propriedades físicas do fruto, tampouco divergiram do comportamento de frutos controle de 30 e 45 D.A.P. Além disso, frutos de melão amarelo não – climatérico detém de uma firmeza mais acentuada comparado à melões climatéricos, os quais apresentam um significativo afrouxamento da polpa e casca em estádios finais de desenvolvimento/amadurecimento (PITRAT, 2017; SCHEMBERGER *et al.*, 2020).

Em relação a colorimetria, os frutos apresentaram diferenças fenotípicas nos tratamentos testados. Para casca, o brilho dado pela coordenada L^* permanece semelhantes nos tratamentos de frutos maduros, e tratados com auxina, TIBA, sacarose e sorbitol, e em frutos de 30 D.A.P.

a casca dos frutos é mais opaca (Figura 7). Esses achados são contrários aos de Schemberger *et al.* (2020), onde o brilho aumenta até os 20 D.A.P. e estabiliza até o amadurecimento dos frutos.

A coordenada a^* representa as cores que vão do verde ($-a^*$) para o vermelho ($+a^*$), e portanto, todos os tratamentos, exceto frutos jovens, aumentaram seus valores de a^* conforme amadureceram, indicando visivelmente a mudança de coloração da casca. No que se diz respeito a b^* , esta coordenada indica a mudança de cor que vai da escala azul ($-b^*$) para o amarelo ($+b^*$), sendo que os resultados apresentam diferenças entre os tratamentos de frutos maduros, com TIBA, sacarose e sorbitol (que obtiveram o maior valor para b^*), e frutos verdes e tratados com auxina, em que b^* se aproxima de tonalidades verdes mais acentuadas na casca.

Figura 7. Colorimetria da casca para frutos verdes, maduros e submetidos a tratamentos com AIA, TIBA, sacarose e sorbitol, de melão amarelo *cv.* Eldorado. Resultados expressos através da média obtida \pm erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ou SNK a 5% de probabilidade.



Fonte: a autora (2022).

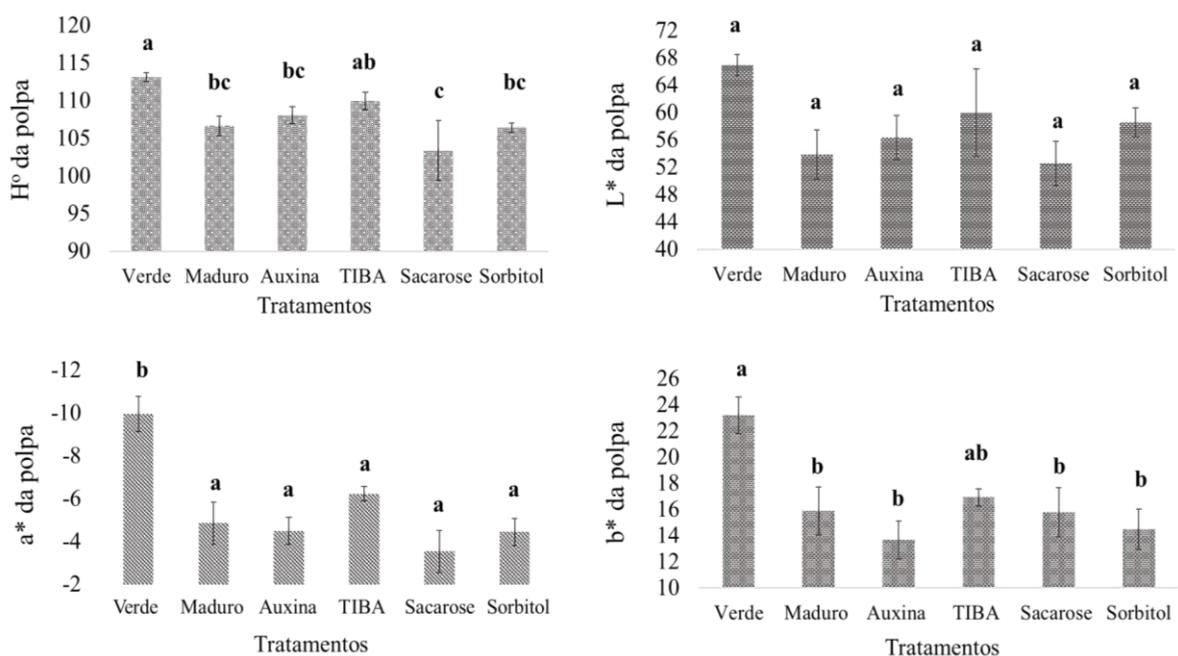
O ângulo de tonalidade ou conhecido como ângulo Hue (H°), determina a verdadeira cor do fruto, combinando as coordenadas b^* e a^* . Com base nisso, frutos verdes apresentaram o maior valor para H° , indicando que valores a partir de 90° representam tons de verde mais escuros. De 90° a 70° a tendência é a mudança de cor do verde para o amarelo, sendo que os tratamentos de frutos com sacarose, sorbitol, TIBA e sem aplicação exógena apresentaram valores em torno de 93 e 95° , não diferindo estatisticamente entre si. Frutos tratados com auxina

têm uma tonalidade entre verde mais intenso, mas se aproxima do amarelo mais evidentemente (Figura 5).

Essas mudanças de colorimetria são intrínsecas dos diferentes genótipos, principalmente no que se refere à melões. Além disso, a auxina exógena influenciou na coloração da casca singularmente, evidenciando que esse hormônio pode realmente alterar características fenotípicas no desenvolvimento e amadurecimento dos frutos (CLAYTON-CUCH *et al.*, 2021; DAVIES, 2004).

Para a colorimetria da polpa dos frutos (Figura 8), o brilho (L^*) se mostrou constante no amadurecimento dos frutos (entre 30 e ~45 D.A.P), e os tratamentos exógenos não alteraram essa variável. A coordenada a^* foi menor apenas em frutos jovens, mas a coordenada b^* evidencia que os frutos jovens apresentam coloração de verde mais acentuada em relação aos demais tratamentos. Frutos com TIBA não se diferenciam de frutos verdes e frutos maduros em relação a b^* . O ângulo Hue da polpa foi maior em frutos jovens, demonstrando tonalidade de verde mais intenso nesse estágio, sendo que H° para TIBA não difere nem desses frutos e tampouco de frutos maduros ou tratados com auxina. Aplicações de AIA e sorbitol não divergem de sacarose e também de frutos maduros.

Figura 8. Colorimetria da polpa para frutos verdes, maduros e submetidos a tratamentos com AIA, TIBA, sacarose e sorbitol, de melão amarelo *cv.* Eldorado. Resultados expressos através da média obtida \pm erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ou SNK a 5% de probabilidade.

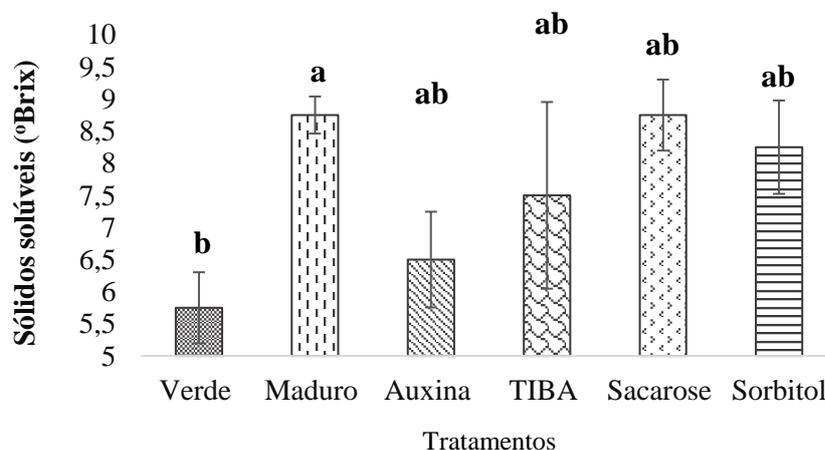


Fonte: a autora (2022).

A coloração da casca e dos frutos são importante atributos de qualidade para o consumidor. Melões não – climatéricos são caracterizados por apresentarem polpas esbranquiçadas com tonalidades esverdeadas (PITRAT, 2017). Aqui nesse trabalho, foi constatado que o tratamento com TIBA apresentou polpa semelhante ao fruto de 30 D.A.P, mas com tons de mosqueados verdes, mas em sua totalidade esbranquiçadas/amareladas (Figura 6). Isso ocorreu provavelmente de forma atípica, não implicando especificamente ao tratamento exógeno, visto que os frutos foram colhidos já em estágio de senescência avançado e o tempo não tenha sido suficiente para a mudança de cor da polpa. Os demais frutos colhidos com aproximadamente 45 D.A.P. demonstraram colorações que tendem para o amarelo/branco, destacando as mudanças fenotípicas do amadurecimento do melão amarelo (SCHEMBERGER *et al.*, 2020).

Os sólidos solúveis totais (SST) contemplam um grupo de substâncias solúveis em água, incluindo carboidratos como sacarose, frutose e glicose. Para mensurar esse teor, utiliza – se a escala de °Brix, onde a porcentagem de sacarose (ou de sólidos solúveis) é determinada em relação ao peso do suco da fruta (KIMBALL, 1999; LI; SUN; CHENG, 2016). Embora os parâmetros físicos do fruto não tenham apresentado diferenças, o teor de SS foi alterada com relação a frutos jovens e frutos maduros, de acordo com a Figura 9. Os frutos tratados exógenamente não diferiram estatisticamente dos frutos de 30 e 45 D.A.P. Foi constatado que frutos de controle jovens a concentração de SS se aproximou de 6° Brix, enquanto que a média em frutos maduros foi de aproximadamente 8,75° Brix.

Figura 9. Sólidos solúveis totais mensurados em °Brix, para frutos verdes, maduros e submetidos a tratamentos com AIA, TIBA, sacarose e sorbitol, de melão amarelo cv. Eldorado. Resultados expressos através da média obtida \pm erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Fonte: a autora (2022).

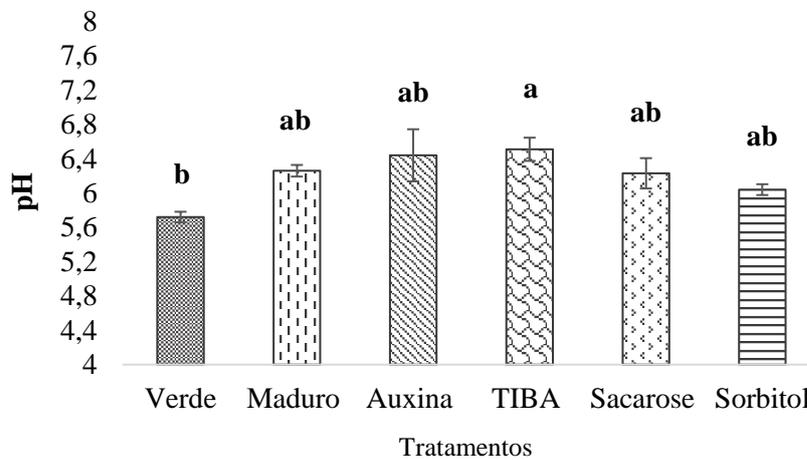
Paralelo ao desenvolvimento do fruto, trabalhos demonstram que o teor de sólidos solúveis aumenta a partir dos estádios de pré – amadurecimento (mudança de cor) em uvas e em morangos, conforme o transporte polar de auxina diminui (JIA *et al.*, 2013; JIA *et al.*, 2017; SERRANO *et al.*, 2022). O conteúdo de SS em frutos de morango (~20 dias após a antese) tratados com 1 mM de auxina, foi menor que em frutos tratados com 1 mM de TIBA e do controle após 48 de aplicação, evidenciando o papel inibitório desse hormônio no acúmulo de açúcares (CASTRO *et al.*, 2021).

Luo *et al.* (2019) não constataram efeitos da sacarose exógena sobre o conteúdo de sólidos solúveis em frutos verdes, tampouco no início da maturação. No presente trabalho, os tratamentos exógenos não proporcionaram aumento, nem diminuição dos teores de SS comparados ao fruto maduro, entretanto, frutos plenamente maduros diferiram de frutos em estádios iniciais da maturação. Isso pode ser explicado pelo fato de que a sacarose aumenta consideravelmente somente a partir 30-40 D.A.P em melões não – climatéricos Hami e Amarelo, e supostamente as concentrações de TIBA, AIA, sacarose e sorbitol foram insuficientes para provocar mudanças fisiológicas acerca dessa variável (ZHANG *et al.*, 2016; SCHEMBERGER *et al.*, 2020).

Para pH do suco, os frutos jovens e frutos tratados com TIBA, diferiram estatisticamente (Figura 10). Os demais tratamentos não apresentaram alterações significativas para esse parâmetro. Pode – se observar que o valor para frutos verdes se concentrou em torno de 5,72, ou seja, de pH ácido. Substancialmente ocorreu um incremento em valores de pH quando os frutos foram colhidos em 45 D.A.P sem tratamento (em média 6,26). As maiores proporções foram constatadas em frutos com TIBA, por volta de teores a 6,51.

Apesar dos frutos verdes apresentarem 30 D.A.P. nesse trabalho, provavelmente os níveis de auxina endógena ainda permaneceram elevados nesse estágio em relação ao amadurecimento pleno. Nesse sentido, a auxina é responsável por ativar bombas de prótons na plasmalema, provocando o decréscimo do pH na parede celular. Esse evento proporcionaria o alongamento celular, entretanto, a partir dos 30 D.A.P os frutos maduros com ou sem tratamento realmente cessaram o crescimento. Além disso, o TIBA é um inibidor de transporte polar de auxina e pode ter atenuado os efeitos desse hormônio no estímulo de H⁺ livres, aumentando o pH comparado à frutos verdes.

Figura 10. Resultados médios de pH do suco de frutos verdes, maduros e submetidos a tratamentos com AIA, TIBA, sacarose e sorbitol, de melão amarelo cv. Eldorado. Resultados expressos através da média obtida \pm erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



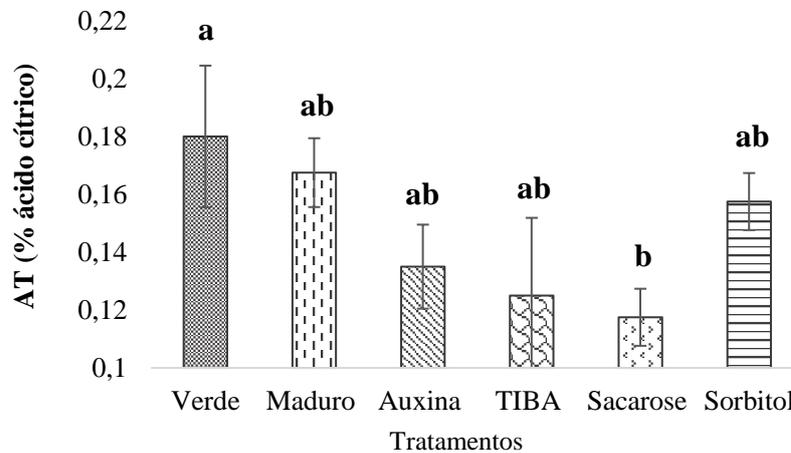
Fonte: a autora (2022).

Concomitantemente, uma série de outros processos podem estar envolvidos na alteração do pH. Tais resultados estão parcialmente de acordo com os teores de sólidos solúveis, e também com a análise de acidez titulável por porcentagem de ácido cítrico, onde os frutos verdes apresentaram 0,18% de AT, e os frutos tratados com sacarose tiveram um percentual de 0,12% (Figura 11). Estatisticamente os demais tratamentos não demonstraram diferenças significativas.

O conteúdo de ácido cítrico foi mensurada em duas cultivares de melão, sendo que uma delas ('Flavor No. 3) apresentou um rápido aumento entre 5 e 25 D.A.P., mas a partir daí manteve-se constante até a maturação em 40 D.A.P, acompanhando a síntese de SS (TANG *et al.*, 2010). A acidez é importante para o sabor do fruto, pois a concentração equilibrada entre de ácido e açúcar pode tornar a fruta mais saborosa (TANG *et al.*, 2010).

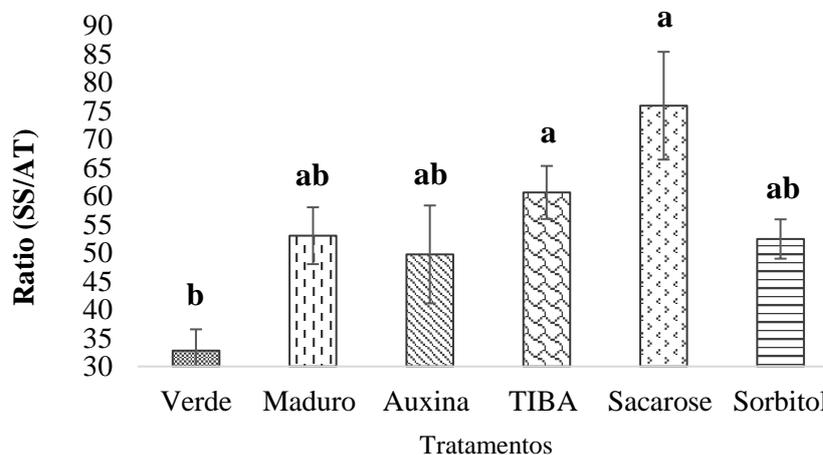
No presente trabalho, frutos jovens apresentaram maiores percentuais de acidez titulável por ácido cítrico, corroborando com Tang *et al.* (2010). Frutos maduros sem tratamento e com tratamentos exógenos não diferiram estatisticamente de frutos jovens e nem de frutos com sacarose, evidenciando que o conteúdo de ácido cítrico pode ser estabilizado no amadurecimento pleno. A sacarose por sua vez, parece influenciar diretamente na acidez, e conseqüentemente no sabor.

Figura 11. Resultados médios de acidez titulável por porcentagem de ácido cítrico (%) em frutos verdes, maduros e submetidos a tratamentos com AIA, TIBA, sacarose e sorbitol, de melão amarelo *cv.* Eldorado. Resultados expressos através da média obtida \pm erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Fonte: a autora (2022).

Figura 12. Resultados médios de *ratio* (SS/AT) em frutos verdes, maduros e submetidos a tratamentos com AIA, TIBA, sacarose e sorbitol, de melão amarelo *cv.* Eldorado. Resultados expressos através da média obtida \pm erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Fonte: a autora (2022).

A relação de sólidos solúveis/acidez titulável é a medida que é um indicador de sabor do fruto. Na figura 12 é possível observar que os tratamentos com sacarose e TIBA obtiveram os maiores valores de *ratio*, com aproximadamente 75 e 60, respectivamente. Esses frutos apresentaram diferenças estatísticas entre o fruto jovem, que obteve apenas 32 para sabor. Tais resultados retratam que a sacarose exógena diminui a acidez por ácido cítrico, enquanto que o

inibidor de auxina mantém o pH equilibrado na maturação de melão, sendo que ambos proporcionam o melhor sabor do fruto.

5.2 EXPRESSÃO GÊNICA DA TRANSDUÇÃO DE SINAL DE AUXINA

Os estímulos hormonais e ambientais transmitem sinais para os receptores, e a partir daí a transdução de sinal inicia através de cascatas que envolvem enzimas/proteínas a fim de desencadear em uma resposta. A expressão gênica pode ser alterada conforme há uma resposta celular/nuclear e, portanto, nesse trabalho foram estudadas duas isoformas de fatores de resposta (*CmARF1* e *CmARF3*), um gene de proteína responsiva a auxina (*CmIAA11*), proteína induzida por ácido indolacético (*CmSAUR36*), e ácido indolacético-amido sintetase (*CmGH3.5*) em frutos de melão amarelo, sendo que esses também foram submetidos à tratamentos exógenos capazes de reconfigurar a expressão desses genes no amadurecimento.

5.2.1 Fator de resposta a auxina (ARF)

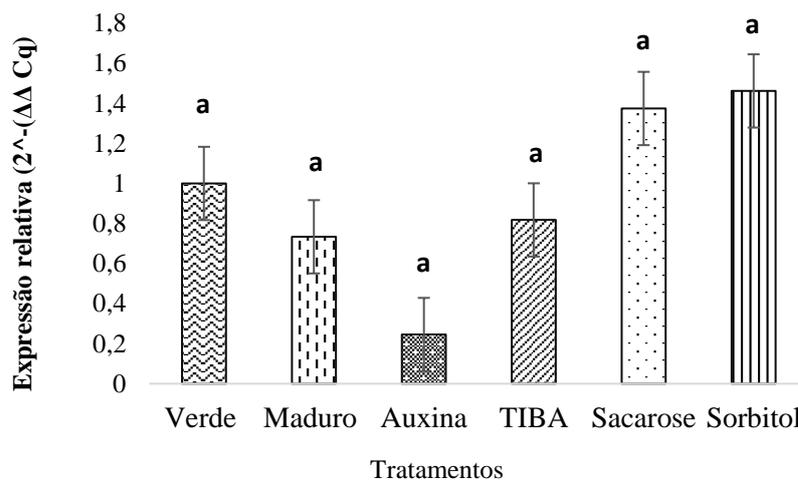
Os fatores de resposta a auxina (ARF) são fatores de transcrição que podem se ligar à sequência de DNA 5'TGTCTC3', encontradas nos elementos promotores responsivos a auxina (AuxREs), inibindo ou reprimindo a transcrição. Aqui, a expressão relativa de *CmARF1* não apresentou mudanças significativas entre os tratamentos estudados, sendo que numericamente os mesmos apresentaram entre 0,24 e 1,46 vezes de expressão em frutos tratados com auxina e frutos tratados com sorbitol, respectivamente (Figura 13).

ARF's são bastante relatados em várias espécies, e pode desempenhar funções como promoção da floração, senescência das folhas e deiscência dos frutos (LIU *et al.*, 2020). Em mamão (*Carica papaya*), *CpARF1* é mais expresso em flores nos estádios iniciais, e em frutos maduros. Além disso, a expressão de *CpARF1* é regulada negativamente pelo tratamento com AIA, mas é regulada positivamente por tratamento com TIBA (LIU *et al.*, 2015). Já em duas cultivares de banana o gene *MaARF1* foi pouco expresso em frutos, evidenciando não ser um fator de transcrição tão relevante nesse estágio fenológico da planta (HU *et al.*, 2015).

Embora os resultados de Schemberger *et al.* (2020) tenham demonstrado que o gene *CmARF1* é mais expresso em frutos de 40 D.A.P de melão não – climatérico do que em frutos de 10 D.A.P., os dados desse trabalho exibem outro perfil. Nenhum tratamento provocou mudanças significativas na expressão desse gene, tampouco os estádios de maturação foram capazes de alterar a sua configuração. Tal fato pode ser um indicativo de que *CmARF1* tem

baixa expressão relativa em frutos desse genótipo a partir dos 30 D.A.P., além de que essa isoforma pode não ser regulada por auxina a nível transcricional, como relatado em genes ARF em frutos de morango e uva (WAN *et al.*, 2014; ESTRADA-JOHNSON *et al.*, 2017).

Figura 13. Expressão relativa do gene *CmARF1*, determinada através de $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$. Resultados expressos através da média obtida para os tratamentos \pm erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.



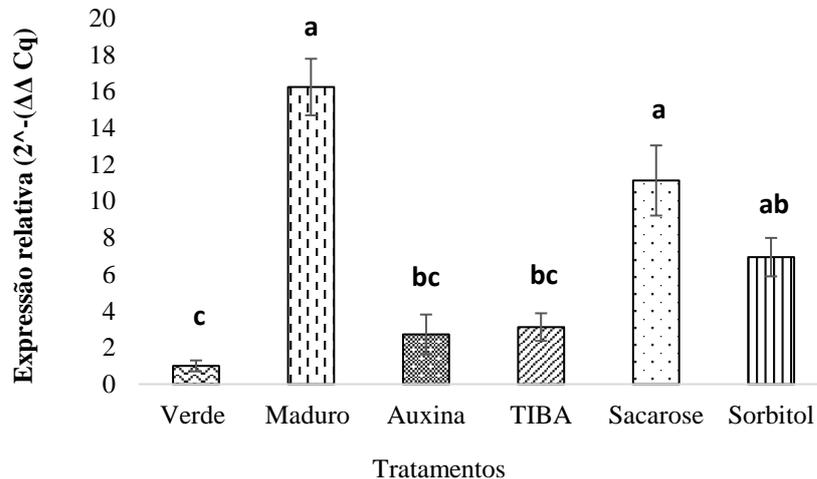
Fonte: a autora (2022).

Os ARF's que contêm uma região intermediária rica em resíduos de prolina, serina e treonina, atuam como repressores transcricionais, enquanto que os possuem regiões médias ricas em resíduos de glutamina, são ativadores transcricionais (ULMASOV *et al.*, 1999; TIWARI *et al.*, 2003 *apud* WAN *et al.*, 2014). A nível proteico, *VvARF1* em uva, apresenta regiões ricas em serina, o que provavelmente seja uma evidência de que o mesmo atue como repressor transcricional de auxina, por exemplo (WAN *et al.*, 2014).

Além disso, na rede de interação proteína – proteína *in silico* de Schemberger *et al.* (2020) há uma associação de ARF1 a proteínas argonautas, que por sua vez têm ligação com hexiltransferases capazes de translocar grupos funcionais para sacarose sintase 1 e alfa-trealose-fosfatase-sintase 4 e 5. As proteínas argonautas são endonucleases que ativam um mecanismo de clivagem da fita do RNAm alvo a um RNA interferente (capaz de silenciar um gene) (MITTAL *et al.*, 2012). Muitos trabalhos já relataram RNAi silenciando ARF e provocando a maturação de frutos em melão. Portanto, essa pode ser outra vertente complementar e interessante a nível proteômico a ser estudada no amadurecimento de frutos (ZHANG *et al.*, 2017; BAI *et al.*, 2020).

Para *CmARF3-X3*, os resultados (Figura 14) apresentaram diferenças entre os tratamentos, sendo que frutos maduros sem tratamento e com tratamento de sacarose obtiveram a maior expressão relativa, com cerca de 16 e 11 vezes a mais que frutos jovens, respectivamente. Os frutos tratados como sorbitol não diferiram estatisticamente dos tratamentos maduro, com sacarose, AIA e TIBA, entretanto, exibiram distinções na expressão em relação ao tratamento de frutos verdes. Concentrações de TIBA foram insuficientes para inibir o transporte polar de auxina. Frutos jovens não diferiram a 5% de probabilidade no teste de Tukey apenas dos tratamentos com AIA e TIBA.

Figura 14. Expressão relativa do gene *CmARF3-X3*, determinada através de $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$. Resultados expressos através da média obtida para os tratamentos \pm erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.



Fonte: a autora (2022).

Além de *CpARF1*, outros fatores de transcrição como *CpARF2*, *CpARF3*, *CpARF6* e *CpARF1*, são altamente expressos no desenvolvimento dos frutos de mamão, especialmente no estágio de pleno amadurecimento, entretanto, *CpARF4*, *CpARF5* e *CpARF17* são fortes candidatos a reguladores negativos da maturação (LIU *et al.*, 2015). Em morango, a maioria dos fatores responsivos à auxina são mais expressos em frutos imaturos, entretanto, há uma interação entre genes *FaTAR2* (triptofano aminotransferase – síntese de AIA), *FaAux/IAA11*, *FaAux/IAA14b*, *FaAux/IAA33* (repressores de auxina) e, *FaARF6a/FaARF16c*, sendo que os mesmos foram mais expressos em frutos maduros e potenciais participantes no amadurecimento independente de auxina (ESTRADA-JOHNSON *et al.*, 2017; GU *et al.*, 2019).

Em tomate, mutantes de ARF foram estudados e foi constatado que os frutos apresentaram defeitos, e o nível de síntese de etileno reduzido, portanto, os autores afirmam

que genes *SIARF2A* e *SIARF2B* funcionam como reguladores positivos do amadurecimento de frutos (HAO *et al.*, 2015). Paralelo a isso, *SIARF2A* e *SIARF2B* são regulados pela luz, e contribuem na biossíntese e acúmulo de carotenoides (CRUZ *et al.*, 2018), mas ao contrário disso, *SIARF4* é mais expresso no pericarpo de frutos imaturos, e suprime *SIAGPase* (enzima envolvida na síntese de amido), e consequentemente os níveis de amido e os produtos de sua degradação, os açúcares solúveis (SAGAR *et al.*, 2013).

Embora alguns homólogos de *CmARF1* e *CmARF3-X3* tenham sido relatados no genoma publicado por Garcia-Mas *et al.* (2012) e em bancos de dados do NCBI e CuGenDB, ainda não há informações tão amplas de suas funções no amadurecimento de melão. Apesar disso, Schemberger *et al.*, (2020) descreve que esses genes são mais expressos em frutos maduros de melão, e podem ter alta relação com a sacarose numa interação proteína-proteína. Nesse trabalho, supõe-se que *CmARF3-X3* é um importante fator de transcrição na regulação do amadurecimento, de acordo com os resultados expostos na Figura 13. Estudos mais aprimorados necessitam ser realizados para elucidar qual é a sua interação com a sacarose, já que frutos tratados com esse açúcar obtiveram alto nível de expressão, assim como frutos plenamente maduros. Ademais, frutos tratados com auxina apresentaram expressão diminuída, assim como frutos verdes, sugerindo que provavelmente *CmARF3-X3* seja regulado negativamente por esse hormônio vegetal.

5.2.2 Proteína responsiva a auxina (Aux/IAA)

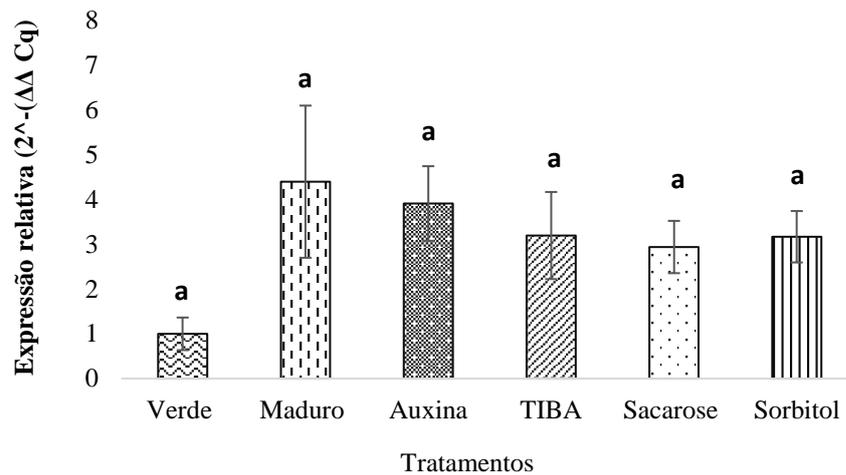
As proteínas Aux/IAA são fatores transcricionais de curta duração que funcionam como repressores de genes de resposta precoce em baixas concentrações de auxina. Acredita-se que a repressão resulte da interação com fatores de resposta à auxina (ARFs), proteínas que se ligam ao elemento promotor responsivo à auxina (AuxRE). O gene *CmIAA11* que codifica a proteína responsiva a auxina, foi investigado a nível de expressão relativa e não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 15).

Em mirtilo, um fruto não-climatérico, *VcIAA27* apresenta um perfil de expressão maior em estádios iniciais de desenvolvimento do que em estádios de maturação avançados (HOU *et al.*, 2019). Outros trabalhos relatam que em pêssigo e maçã algumas isoformas de Aux/IAA são induzidas por auxina endógena e exógena, mas outras são reprimidas por esse hormônio e recebem estímulo de etileno no amadurecimento (TRAINOTTI *et al.*, 2007; SU *et al.*, 2021).

Em bagas de uva, nove de oito genes de Aux/IAA foram diferencialmente expressos e regulados positivamente ao tratamento com auxina exógena, sugerindo também que os mesmos

são expressos no início do desenvolvimento da baga e pós mudanças de cor, estádios onde há expansão celular (SANTO *et al.*, 2020).

Figura 15. Expressão relativa do gene *CmIAA11*, determinada através de $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$. Resultados expressos através da média obtida para os tratamentos \pm erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.



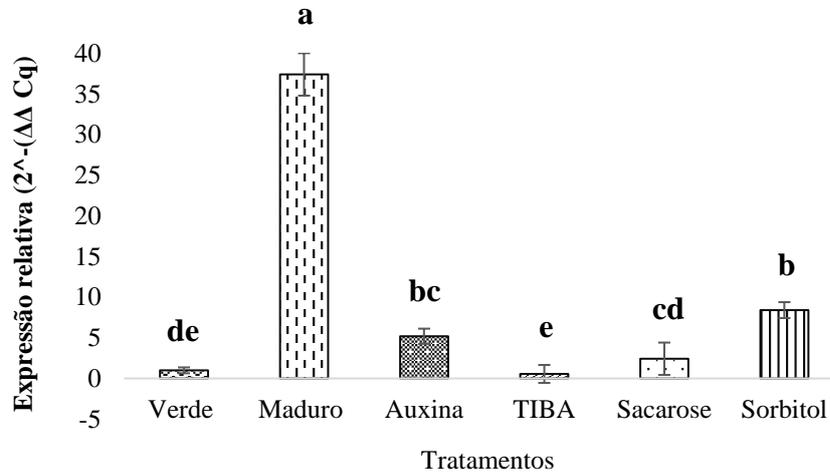
Fonte: a autora (2022).

Embora isso ocorra em muitos perfis de frutas e em diferentes estádios, no presente estudo, *CmIAA11* parece não ter um papel fundamental em frutos de melão da cultivar Eldorado devido ao seu baixo nível de expressão. Esse gene pode atuar em eventos secundários ao desenvolvimento e amadurecimento, assim como *CmARF1*. Entretanto, são relevantes mais pesquisas sobre essa isoforma (ou seus homólogos) e as suas interações com fatores responsivos a auxina a nível transcricional e pós – transcricional, já que o mesmo é um repressor a quando há baixos níveis de auxina no núcleo. Apesar de aqui nenhum tratamento (nem mesmo frutos imaturos e maduros) apresentaram diferenças significativas, o transcrito de Schemberger *et al.* (2020) relata que *CmIAA11* é mais expresso em frutos maduros.

5.2.3 *Gretchen Hagen 3* - ácido indolacético amido sintetase (GH3)

Para a isoforma GH3.5, o tratamento com frutos maduros mostrou ser 37 vezes mais expresso que frutos jovens (Figura 16). Frutos com aplicações de sorbitol e auxina não diferiram, assim como a sacarose exógena não diferiu de frutos verdes e de AIA. O controle aos 30 D.A.P. se assemelha ao tratamento com TIBA, sendo que este último apresenta 0,5 vezes menos expresso.

Figura 16. Expressão relativa do gene *CmGH3.5*, determinada através de $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$. Resultados expressos através da média obtida para os tratamentos \pm erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.



Fonte: a autora (2022).

Ao contrário do RNA-Seq de Schemberger *et al.* (2020), os resultados evidenciam que *CmGH3.5* tem a maior expressão relativa em frutos maduros, e os demais tratamentos parecem suprimir o nível de expressividade desse gene. A enzima GH3 é responsável por catalisar a síntese de conjugados de ácido indolacético com aspartato e glutamato (para degradação), ou com leucina e alanina (armazenamento temporário), proporcionando um mecanismo de homeostase de auxina endógena (STASWICK *et al.* 2005; JAIN *et al.*, 2005). A expressão de *VvGH3.1*, *VvGH3.2*, *VvGH3.8* é aumentada pelo tratamento exógeno com ácido 1-naftalenoacético (sintética), o que pode ser explicado devido à alta estabilidade dessa auxina sintética em relação a AIA, favorecendo a possível diminuição desse fitormônio ativo (BOTTCHEER *et al.*, 2010; SANTO *et al.*, 2020).

Em bagas de uva, *VvGH3.1* também é altamente expresso quando há a aplicação de sacarose combinada com ácido abscísico, ambos bem relatados na literatura por promover o amadurecimento de frutos (BOTTCHEER *et al.*, 2010). Já na maturação de morango *FveGH3.1*, *FveGH3.1a*, *FveGH3.6b*, *FveGH3.9* foram mais expressos em aquênios e nos estádios iniciais de desenvolvimento, além de que os conjugados AIA-Asp. e AIA-Glu foram indetectáveis nos receptáculos, independente do estágio (GU *et al.*, 2019). Além disso, *FveGH3.1* é regulado positivamente quando os receptáculos são tratados com um inibidor de ABA, sugerindo que algumas isoformas de GH3 podem apresentar funções divergentes em diferentes espécies, mesmo com o perfil não – climático em comum (GU *et al.*, 2019).

No melão *Cantalupensis*, *CmGH3.1* e *CmGH3.5* são fundamentais na abscisão de frutos maduros em 38 D.A.P, sendo que a expressão desses genes é diminuída na indução tardia de abscisão dos frutos (CORBACHO *et al.*, 2013). A zona de abscisão em frutos climatéricos é um importante indicativo do amadurecimento pleno, juntamente com a mudança de coloração e aroma da polpa e casca em melões (SALADIÉ *et al.*, 2015; YANO; EZURA, 2016). Esse evento pode ser favorecido por etileno, entretanto, por mais que em frutos não – climatéricos não haja a sua síntese autocatalítica, esse hormônio parece ser bem relevante no amadurecimento (REIS *et al.*, 2020). A atividade de uma proteína *CcGH3* foi associada ao amadurecimento do fruto na pimenta pungente (não - climatérica), onde é altamente expressa no pericarpo e na placenta. Contudo, este gene é indutível por etileno no início da maturação e a superexpressão do gene GH3 da pimenta levou ao amadurecimento mais rápido após um estímulo de etileno (LIU *et al.*, 2005; BÖTTCHER *et al.*, 2010).

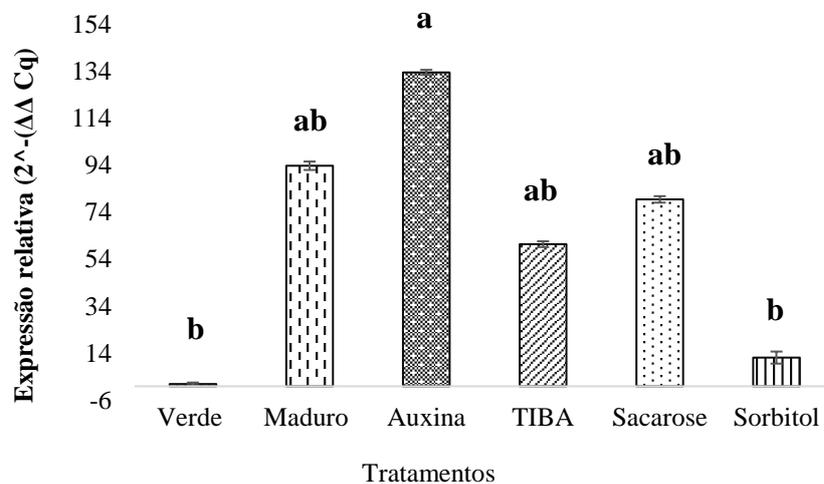
Esses resultados levam a crer que no melão não – climatérico, *CmGH3.5* também pode ter um papel fundamental no amadurecimento, visto que os níveis de auxina podem ser diminuídos pela ação desse gene com conjugados (a nível pós – transcricional) nos estádios finais de desenvolvimento dos frutos. *CmGH3.5* pode não ser regulado positivamente por AIA, entretanto, é evidente o papel de TIBA sobre a expressão desse gene, uma vez que o transporte polar endógeno de auxina reprimido, não há a necessidade de manter a homeostase (com degradação ou estoque) desse hormônio.

5.2.4 Proteína induzida/responsiva a ácido indolacético (SAUR)

A extensa família das proteínas induzidas ou responsivas por auxina (*CmSAUR36*) integram os “RNAs pequenos de auxina - *Small Auxin-Up RNAs* (SAUR)”. Suas funções consistem em interagir com as proteínas fosfatases (PP2C), atuando no alongamento celular em resposta rápida a auxina. O gene *CmSAUR36* foi diferencialmente expresso entre os tratamentos, sendo que as aplicações de auxina aumentaram a expressão do mesmo em 133 e 120 vezes em relação aos frutos verdes e tratados com sorbitol, respectivamente (Figura 17).

Recentemente foi publicado um amplo estudo sobre o genoma e análise de expressão da família SAUR em melão, onde a maioria dos genes estão contidos nos cromossomos 1 e 11 de *Cucumis melo*. Todos os 66 genes identificados foram altamente expressos em flores e grande parte em frutos jovens, especialmente *CmSAUR19* e *CmSAUR58* (TIAN *et al.*, 2022). O mesmo ocorre em bagas de uva, onde a maioria é mais expresso nos primeiros momentos de desenvolvimento, inclusive *VvSAUR36* (LI *et al.*, 2021).

Figura 17. Expressão relativa do gene *CmSAUR36*, determinada através de $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$. Resultados expressos através da média obtida para os tratamentos \pm erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.



Fonte: a autora (2022).

A interação das proteínas fosfatases 2C e com SAUR, faz com que as H+ATPases da membrana plasmática sejam desfosforiladas e juntamente com a auxina, proporcionam a acidificação da parede celular promovendo a indução da expansão celular (GIL *et al.*, 1994; SPARTZ *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2021).

Contudo, foi aplicado um mutante de tomate através de um RNAi *Sl-SAUR69* regulado por RIN (inibidor de amadurecimento), a qual induz a síntese inicial de etileno. Concluíram então que a atividade da auxina no mutante *Sl-SAUR69* RIN em tomate permanece em níveis elevados conforme a progressão do amadurecimento dos frutos, resultando no início prematuro do amadurecimento (SHIN *et al.*, 2019). Além disso, a expressão de *FveSAUR* é aumentada quando receptáculos de morango são tratados com um inibidor de ABA, sugerindo que a atividade desse gene seja reprimida com a interação dos principais hormônios que desencadeiam a maturação (GU *et al.*, 2019).

Os resultados desse trabalho demonstram que a auxina aumenta significativamente a expressão relativa de *CmSAUR36* em relação aos demais tratamentos, especialmente quanto aos frutos jovens. Embora o pH para frutos tratados com auxina não tenha sido alterado, tampouco o conteúdo de sólidos solúveis não tenha decrescido comparado aos outros tratamentos, o gene da família SAUR foi afetado, sustentando a hipótese que o mesmo possa ser responsivo pelo tratamento exógeno, mesmo que o fenótipo do fruto não tenha apresentado diferenças nítidas que seriam provocadas por altas concentrações de AIA. *CmSAUR36* não tem

expressão elevada em frutos verdes, tendo em vista duas eventualidades possíveis: os níveis de auxina endógena que o estimulam para exercer a expansão celular são realmente diminuídos drasticamente a partir dos 30 D.A.P., e essa isoforma pode simultaneamente ser estimulada por açúcares e outros compostos em frutos completamente maduros.

Li *et al.* (2021) e Tian *et al.* (2022) fomentam que há muitas particularidades da família SAUR entre espécies, porque em melão, uva e melancia, por exemplo, grande parte dos genes está contido em um ou dois cromossomos em tandem (ZHANG *et al.*, 2017). Esse fato torna o estudo desses genes muito interessante, pois parece haver uma hierarquia na interação genética, modulando respostas fisiológicas e moleculares ainda desconhecidas sobre outros genes envolvidos no metabolismo transducional de auxina (JIA *et al.*, 2018).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstram que a concentração de 600 μM de ácido indolacético não foram suficientes para alterar algumas propriedades físicas de frutos de meloeiro amarelo, como peso, comprimento, diâmetro e firmeza da polpa. Em relação a colorimetria, a auxina exógena provocou mudanças na casca apresentando tons esverdeados, sugerindo seus efeitos na superfície do fruto.

A sacarose exógena por sua vez, provocou apenas um aumento significativo na relação entre sólidos solúveis e acidez titulável, evidenciando o seu papel essencial no sabor do fruto. A concentração de 200 μM de TIBA parece não ser o suficiente para inibir o transporte polar de auxina endógena em sua totalidade, assim como a aplicação de sorbitol não foi o bastante para incrementar em nenhum atributo físico – químico na maturação de frutos.

Em relação a expressão gênica ligada a transdução de auxina, de uma maneira geral, os genes *CmARF1* e *CmIAA11* são pouco expressos em frutos de melão amarelo não – climatérico. Entretanto a isoforma *CmARF3* parece ter um papel fundamental sobre o amadurecimento de melão da cv. Eldorado, visto que os níveis endógenos e exógenos de auxina suprimiram a sua expressão, mas frutos maduros sem e com tratamentos com açúcares induziram – a.

O gene que codifica a enzima amido-sintetase de auxina (*CmGH3.5*) também parece atuar na maturação de melão amarelo, podendo ser um candidato importante como regulador dos níveis elevados de auxina e outros compostos que desestimulam a homeostase. *CmSAUR36* é regulado positivamente pelo tratamento com AIA, contudo, é também bastante expresso em frutos maduros, no geral. Este, pode também ser um possível regulador do amadurecimento, entretanto, sua função e de sua família em *Cucumis melo* deve ser melhor investigada acerca do crescimento do fruto pelo poder ácido da parede celular e sua relação com a auxina.

REFERÊNCIAS

- ABRAFRUTAS. **Estatística de exportações de frutas no primeiro trimestre de 2022**. 2022. Disponível em: <https://abrafrutas.org/2022/04/23/estatistica-de-exportacoes-de-frutas-no-tes-trimestres-de-2022/>. Acesso em: 03 maio de 2022.
- ADAMOWSKI, M; FRIML, J. PIN-Dependent Auxin Transport: action, regulation, and evolution. **The Plant Cell**, v. 27, n. 1, p. 20-32, 2015.
- AHARONI, A. *et al.* Novel insight into vascular, stress, and auxin-dependent and -independent gene expression programs in strawberry, a non-climacteric fruit. **Plant Physiology**, v. 129, n. 3, p. 1019-1031, 2002.
- ANDRADE, I. S. *et al.* Morphoagronomic genetic diversity of Brazilian melon accessions based on fruit traits. **Scientia Horticulturae**, v. 243, p. 514-523, 2019.
- AYUB, R. *et al.* Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. **Nature Biotechnology**, v. 14, n. 7, p.862-866, jul. 1996.
- BAI, S. *et al.* Genome-wide identification of microRNAs involved in the regulation of fruit ripening and climacteric stages in melon (*Cucumis melo*). **Horticulture Research**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 1 jul. 2020.
- BENNETT, M. J. *et al.* Arabidopsis AUX1 Gene: a permease-like regulator of root gravitropism. **Science**, v. 273, n. 5277, p. 948-950, 1996.
- BERNALES, M. *et al.* Expression of two indole-3-acetic acid (IAA)-amido synthetase (GH3) genes during fruit development of raspberry (*Rubus idaeus* Heritage). **Scientia Horticulturae**, v. 246, p. 168-175, 2019.
- BOTTCHEER, C. *et al.* Sequestration of auxin by the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-1 in grape berry (*Vitis vinifera* L.) and the proposed role of auxin conjugation during ripening. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 13, p. 3615-3625, 2010.
- BURGER, Y.; SCHAFFER, A. A. The contribution of sucrose metabolism enzymes to sucrose accumulation in *Cucumis melo*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 132, n. 5, p. 704-712, 2007.
- ÇAKIR, B; KILIÇKAYA, O; OLCAY, A. C. Genome-wide analysis of Aux/IAA genes in *Vitis vinifera*: cloning and expression profiling of a grape Aux/IAA gene in response to phytohormone and abiotic stresses. **Acta Physiologiae Plantarum**, p. 365-377, 2012.
- CALDERON-VILLALOBOS, L. I. *et al.* Auxin Perception--Structural Insights. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 7, p.1-17 2010.
- CAMPOS, G. S. de *et al.* High-quality total RNA isolation from melon (*Cucumis melo* L.) fruits rich in polysaccharides. **Semina Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 4, p.10-15, 2017.

CASANOVA-SÁEZ R; MATEO-BONMAT E; LJUNG K. **Auxin Metabolism in Plants**. In: Weijers D, Ljung K, Estelle M, *et al.* editores *Auxin Signaling: From Synthesis to Systems Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2021. p. 27-48.

CASTRO, R. I. *et al.* Effect of exogenous auxin treatment on cell wall polymers of strawberry fruit. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, p. 6294, 11 jun. 2021.

CHEN, J. *et al.* Transcriptome profiling of postharvest strawberry fruit in response to exogenous auxin and abscisic acid. **Planta**, v. 243, n. 1, p. 183-197, 15 set. 2015.

CLAYTON-CUCH, D. *et al.* Auxin treatment enhances anthocyanin production in the non-climacteric sweet cherry (*Prunus avium* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 19, p. 10760, 5 out. 2021.

COMMISSION INTERNATIONALE DE L'ECLAIRAGE. **Colorimetry**. Vienna: Central Bureau Of The Cie A-1033, 1986. Cap. 5.3, p. 36–37.

CORBACHO, J. *et al.* Transcriptomic events involved in melon mature-fruit abscission comprise the sequential induction of cell-wall degrading genes coupled to a stimulation of endo and exocytosis. **Plos One**, v. 8, n. 3, p. 58363, 6 mar. 2013.

CRUZ, A. B. *et al.* Light, ethylene and auxin signaling interaction regulates carotenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1-16, 18 set. 2018.

DALASTRA, G. M. *et al.* Produção e qualidade de três tipos de melão, variando o número de frutos por planta 1. **Revista Ceres**, v. 63, n. 4, p. 523-531, 2016.

DAVIES, C; BOSS, P. K; ROBINSON, S. P. Treatment of grape berries, a non-climacteric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. **Plant Physiology**, v. 115, n. 3, p. 1155-1161, 1997.

DAVIES, P. J. **Plant Hormones: biosynthesis, signal transduction, action!** 3. ed. London: Kluwer Academic Publishers, 2004. 750 p.

ENDL, J. *et al.* Repeated domestication of melon (*Cucumis melo*) in Africa and Asia and a new close relative from India. **American Journal of Botany**, v. 105, n. 10, p. 1662-1671, 2018.

ESTRADA-JOHNSON, E. *et al.* Transcriptomic analysis in strawberry fruits reveals active auxin biosynthesis and signaling in the ripe receptacle. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1-16, 2017.

FENG, J. *et al.* Reporter gene expression reveals precise auxin synthesis sites during fruit and root development in wild strawberry. **Journal Of Experimental Botany**, v. 70, n. 2, p. 563-574, 27 out. 2018.

FIGUEIRÊDO, M. C. B. *et al.* The carbon footprint of exported Brazilian yellow melon. **Journal of Cleaner Production**, v. 47, p. 404-414, 2013.

- FIGUEROA, C. R. *et al.* Effect of postharvest treatment of calcium and auxin on cell wall composition and expression of cell wall-modifying genes in the Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis*) fruit. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 2014-2022, 2012.
- FUENTES, L; FIGUEROA, C. R; VALDENEGRO, M. Recent advances in hormonal regulation and cross-talk during non-climacteric fruit development and ripening. **Horticulturae**, v. 5, n. 2, p. 45, 2019.
- GAN, Z. *et al.* Identification and expression analysis of Gretchen Hagen 3 (GH3) in kiwifruit (*Actinidia chinensis*) during postharvest process. **Plants**, v. 8, n. 11, p. 473-486, 2019.
- GARCIA-MAS, J. *et al.* The genome of melon (*Cucumis melo* L.). **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 109, n. 29, p. 11872-11877, 2012.
- GIL, P. *et al.* Characterization of the auxin-inducible SAUR-AC1 gene for use as a molecular genetic tool in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 104, n. 2, p. 777-784, 1 fev. 1994.
- GIOVANNONI, J. J. Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, n. 3, p. 283-289, 2007.
- GONÇALVES, C. X. *et al.* Putative role of cytokinin in differential ethylene response of two lines of antisense ACC oxidase cantaloupe melons. **Postharvest Biology and Technology**, v. 86, p. 511-519, dez. 2013.
- GRAY, W. M. *et al.* Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. **Nature**, v. 414, n. 6861, p. 271-276, 2001.
- GUAN, D. *et al.* Genome-Wide Analysis and Identification of the Aux/IAA Gene Family in Peach. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, p. 4703-4721, 2019.
- HAGEN, G; GUILFOYLE, T J. Rapid induction of selective transcription by auxins. **Molecular and Cellular Biology**, v. 5, n. 6, p. 1197-1203, 1985.
- HAO, Y. *et al.* Auxin Response Factor SlARF2 Is an Essential Component of the Regulatory Mechanism Controlling Fruit Ripening in Tomato. **Plos Genetics**, v. 11, n. 12, p. e1005649, 30 dez. 2015.
- HAYASHI, K.-I. The interaction and integration of auxin signaling components. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 6, p. 965-975, 2012.
- HODGES, D. M; LESTER, G. E. Cucurbits: Cucumber, Melon, Pumpkin and Squash. In: THOMPSON, A. K. **Health-promoting properties of fruit and vegetables**. 2011. p. 118-134.
- HOU, Y. *et al.* Identification and functional characterization of the Aux/IAA gene *VcIAA27* in blueberry. **Plant Signaling & Behavior**, v. 15, n. 1, p. 1700327, 10 dez. 2019.
- HU, W. *et al.* The auxin response factor gene family in banana: genome-wide identification and expression analyses during development, ripening, and abiotic stress. **Frontiers In Plant Science**, v. 6, p. 1-16, 15 set. 2015.

IBGE. **Área plantada, produção e produtividade de melão no Brasil**. 2020. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/1612#resultado>. Acesso em: 03 ago. 2020.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 25-26.

JAIN, M. *et al.* The auxin-responsive GH3 gene family in rice (*Oryza sativa*). **Functional & Integrative Genomics**, v. 6, n. 1, p. 36-46, 2005.

JENNESS, M. K. *et al.* The Arabidopsis ATP-BINDING CASSETTE transporter ABCB21 regulates auxin levels in cotyledons, the root pericycle, and leaves. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1-14, 2019.

JIA, D. *et al.* Apple fruit acidity is genetically diversified by natural variations in three hierarchical epistatic genes: mdsaur37, mdpp2chandmdalmtii. **The Plant Journal**, v. 95, n. 3, p. 427-443, 12 jun. 2018.

JIA, H. *et al.* Abscisic acid, sucrose, and auxin coordinately regulate berry ripening process of the Fujiminori grape. **Functional & Integrative Genomics**, v. 17, n. 4, p. 441-457, 21 fev. 2017.

JIA, H. *et al.* Sucrose promotes strawberry fruit ripening by stimulation of abscisic acid biosynthesis. **Pakistan Journal Of Botany**, v. 41, n. 1, p. 169-175, 2013.

KEFELI, V. I; KALEVITCH, M. V. **Natural Growth Inhibitors and Phytohormones in Plants and Environment**. Si: Springer-Science, 2003. 323 p.

KHAKSAR, G; SIRIKANTARAMAS, S. Auxin response factor 2A is part of the regulatory network mediating fruit ripening through auxin-ethylene crosstalk in durian. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1-15, 2020.

KIM, H. *et al.* Non-climacteric ripening and sorbitol homeostasis in plum fruits. **Plant Science**, v. 231, p. 30-39, 2015.

KIMBALL, D. A. Analyses of brix, soluble solids, acids, oils, and pulp. **Citrus Processing**, p. 191-246, 1999.

KONG, Q. *et al.* Assessment of suitable reference genes for quantitative gene expression studies in melon fruits. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1-10, 2016.

KONG, Q. *et al.* Screening suitable reference genes for normalization in reverse transcription Quantitative Real-Time PCR analysis in melon. **Plos One**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2014.

KUANG, J.-F. *et al.* Carbohydrate stress affecting fruitlet abscission and expression of genes related to auxin signal transduction pathway in litchi. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 12, p. 16084-16103, 2012.

KULTUR, F.; HARRISON, H.C.; STAUB, J. Spacing and Genotype Affect Fruit Sugar Concentration, Yield, and Fruit Size of Muskmelon. **Hortscience**, v. 36, n. 2, p. 274-278, abr. 2001.

KÜPERS, J. J.; OSKAM, L.; PIERIK, R. Photoreceptors regulate plant developmental plasticity through auxin. **Plants**, v. 9, n. 8, p. 940, 2020.

KUTSCHERA, U; BRIGGS, W. R. From Charles Darwin's botanical country-house studies to modern plant biology. **Plant Biology**, v. 11, n. 6, p. 785-795, 2009.

LEE, J. Sorbitol, *Rubus* fruit, and misconception. **Food Chemistry**, v. 166, p. 616-622, jan. 2015.

LI, J. *et al.* A role for auxin response factor 19 in auxin and ethylene signaling in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 140, n. 3, p. 899-908, 2006.

LI, J.-L; SUN, D.-W; CHENG, J.-H. Recent advances in nondestructive analytical techniques for determining the total soluble solids in fruits: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 5, p. 897-911, 6 jul. 2016.

LI, M. *et al.* Grape small auxin upregulated RNA (SAUR) 041 is a candidate regulator of berry size in grape. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11818, 30 out. 2021.

LIANG, R. *et al.* Comparative transcriptomic analysis of two Cucumis melo var. saccharinus germplasms differing in fruit physical and chemical characteristics. **BMC Plant Biology**, v. 22, n. 1, p. 1-12, 12 abr. 2022.

LIU, D.-J.; CHEN, J.-Y.; LU, W.-J. Expression and regulation of the early auxin-responsive Aux/IAA genes during strawberry fruit development. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 2, p. 1187-1193, 2010.

LIU, K. *et al.* A GH3-like gene, CcGH3, isolated from *Capsicum chinense* L. fruit is regulated by auxin and ethylene*. **Plant Molecular Biology**, v. 58, n. 4, p. 447-464, jul. 2005.

LIU, K. *et al.* Genome-wide analysis and characterization of Aux/IAA family genes related to fruit ripening in papaya (*Carica papaya* L.). **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2017.

LIU, K. *et al.* Genome-wide identification and characterization of auxin response factor (ARF) family genes related to flower and fruit development in papaya (*Carica papaya* L.). **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1-12, 2015.

LIU, K. *et al.* Identification, expression and IAA-Amide Synthetase activity analysis of Gretchen Hagen 3 in papaya fruit (*Carica papaya* L.) during postharvest process. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1-13, 2016.

LIU, X. *et al.* The nuclear localized RIN13 induces cell death through interacting with ARF1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 527, n. 1, p. 124-130, jun. 2020.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

- LJUNG K. Auxin metabolism and homeostasis during plant development. **Development** 2013; 140: 943-950.
- LJUNG, K; BHALERAO, R. P; SANDBERG, G. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. **The Plant Journal**, v. 28, n. 4, p. 465-474, 2002.
- LUO, Y. *et al.* Sucrose promotes strawberry fruit ripening and affects ripening-related processes. **International Journal of Genomics**, v. 2019, p. 1-14, 20 nov. 2019.
- MASHIGUCHI, K. *et al.* The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 108, n. 45, p. 18512-18517, 2011.
- MISHRA, B. S; SHARMA, M; LAXMI, A. Role of sugar and auxin crosstalk in plant growth and development. **Physiologia Plantarum**, v. 174, n. 1, p. 1-20, 17 set. 2021.
- MITTAL, P. *et al.* Phenomenal RNA Interference: from mechanism to application. In: GOYAL, A. **Crop Plant**. InTech, 2012. cap. 4, p. 61-73.
- NUÑEZ-PALENIUS, H. G. *et al.* Melon Fruits: genetic diversity, physiology, and biotechnology features. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 13-55, jan. 2008.
- PAN, Y. *et al.* Genetic architecture of fruit size and shape variation in cucurbits: a comparative perspective. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 133, n. 1, p. 1-21, 25 nov. 2019.
- PAQUE, S.; WEIJERS, D. Q&A: Auxin: The plant molecule that influences almost anything. **BMC Biology**, v. 14, n. 1, p. 1-5, 2016.
- PARIS, H. S. Overview of the origins and history of the five major cucurbit crops: issues for ancient DNA analysis of archaeological specimens. **Vegetation History and Archaeobotany**, v. 25, n. 4, p. 405-414, 2016.
- PARIS, H. S; TADMOR, Y; SCHAFFER, A. A. Cucurbitaceae Melons, Squash, Cucumber. **Encyclopedia of Applied Plant Sciences**, p. 209-217, 2017.
- PÉREZ-LLORCA, M. *et al.* Biosynthesis, metabolism and function of auxin, salicylic acid and melatonin in climacteric and non-climacteric fruits. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 136, 2019.
- PETERSSON, S. V. *et al.* An auxin gradient and maximum in the Arabidopsis root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. **The Plant Cell**, v. 21, n. 6, p. 1659-1668, 2009.
- PILATI, S. *et al.* Genome-wide transcriptional analysis of grapevine berry ripening reveals a set of genes similarly modulated during three seasons and the occurrence of an oxidative burst at véraison. **BMC Genomics**, v. 8, n. 1, p. 428-450, 2007.
- PITRAT, M. Melon Genetic Resources: Phenotypic Diversity and Horticultural Taxonomy. In: GRUMET, R; KATZIR, N; GARCIA-MAS, J. **Genetics and Genomics of Cucurbitaceae**. Springer, 2017. p. 25-60.

- QUINT, M; GRAY, W. M. Auxin signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 5, p. 448-453, 2006.
- REIS, L. *et al.* Metabolic profile of strawberry fruit ripened on the plant following treatment with an ethylene elicitor or inhibitor. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1-15, 2020.
- SAGAR, M. *et al.* *SIARF4*, an auxin response factor involved in the control of sugar metabolism during tomato fruit development. **Plant Physiology**, v. 161, n. 3, p. 1362-1374, 22 jan. 2013.
- SALADIÉ, M. *et al.* Comparative transcriptional profiling analysis of developing melon (*Cucumis melo* L.) fruit from climacteric and non-climacteric varieties. **BMC Genomics**, v. 16, p. 440, 2015.
- SANTO, S. D. *et al.* Auxin treatment of grapevine (*Vitis vinifera* L.) berries delays ripening onset by inhibiting cell expansion. **Plant Molecular Biology**, v. 103, n. 1-2, p. 91-111, 10 fev. 2020.
- SCHEMBERGER, M. O. *et al.* Transcriptome profiling of non-climacteric 'yellow' melon during ripening: insights on sugar metabolism. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 1-20, 30 mar. 2020.
- SEBASTIAN, P. *et al.* Cucumber (*Cucumis sativus*) and melon (*C. melo*) have numerous wild relatives in Asia and Australia, and the sister species of melon is from Australia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 32, p. 14269-14273, 2010.
- SERRANO, A. *et al.* The glucose-related decrease in polar auxin transport during ripening and its possible role in grapevine berry coloring. **Journal of Plant Growth Regulation**, p. 1-11, 7 jan. 2022.
- SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (Complete Samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3/4, p. 591-611, 1965.
- SHIN, J.-H. *et al.* The RIN -regulated Small Auxin-Up RNA SAUR 69 is involved in the unripe-to-ripe phase transition of tomato fruit via enhancement of the sensitivity to ethylene. **New Phytologist**, v. 222, n. 2, p. 820-836, 2019.
- SILVA, H. R. *et al.* **Cultivo do meloeiro para o Norte de Minas Gerais**. Circular Técnica 20, p. 20, 2000.
- SILVA, H. R., COSTA, N. **Melão: produção aspectos técnicos**. Embrapa, Brasília, 2003.
- SINGH, G. *et al.* Advances in understanding the mechanism of action of the auxin permease AUX1. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 3391, 2018.
- SOUZA, H. C. X. **Produção de haplóides de melão (*Cucumis melo*) por meio de cruzamento interespecífico entre melão e outras espécies da família Cucurbitaceae**. 2017. 54 f. Monografia - Curso de Agronomia, Universidade Federal do Ceará, 2017.
- SPARTZ, A. K. *et al.* The SAUR19 subfamily of SMALL AUXIN UP RNA genes promote cell expansion. **The Plant Journal**, v. 70, n. 6, p. 978-990, 2012.

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

STROKA, M. A. *et al.* Sugar metabolism in climacteric and non-climacteric melon. **Annual Plant Reviews Online**, p. 243-262, mar. 2021.

SU, L. *et al.* Carotenoid accumulation during tomato fruit ripening is modulated by the auxin-ethylene balance. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2015.

SU, Y. *et al.* Genome-wide characterization and expression analyses of the auxin/indole-3-acetic acid (Aux/IAA) gene family in apple (*Malus domestica*). **Gene**, v. 768, p. 145302, fev. 2021.

SUTSAWAT, D. *et al.* Properties of sorbitol dehydrogenase in strawberry fruit and enhancement of the activity by fructose and auxin. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 77, n. 3, p. 318-323, 2008.

SWARUP, R; PÉRET, B. AUX/LAX family of auxin influx carriers—an overview. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, p. 1-12, 2012.

TAIZ, L. *et al.* **Plant Physiology and Development**. 6. ed. Sinauer Associates, 2017. 896 p.
TANG, M. *et al.* Changes in organic acids and acid metabolism enzymes in melon fruit during development. **Scientia Horticulturae**, v. 123, n. 3, p. 360-365, jan. 2010.

TERIBIA, N; TIJERO, V; MUNNÉ-BOSCH, S. Linking hormonal profiles with variations in sugar and anthocyanin contents during the natural development and ripening of sweet cherries. **New Biotechnology**, v. 33, n. 6, p. 824-833, 2016.

TIAN, Z. *et al.* Genome-wide characterization and expression analysis of SAUR gene family in Melon (*Cucumis melo* L.). **Planta**, v. 255, n. 6, p. 123-134, 13 maio 2022.

TIWARI, S. B. *et al.* The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. **The Plant Cell**, v. 15, n. 2, p. 533-543, 2 jan. 2003.

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

ULMASOV, T. *et al.* ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. **Science**, v. 276, n. 5320, p. 1865-1868, 20 jun. 1997.

WAN, S. *et al.* Genome-wide identification, characterization and expression analysis of the auxin response factor gene family in *Vitis vinifera*. **Plant Cell Reports**, v. 33, n. 8, p. 1365-1375, 2014.

WANG, B. *et al.* Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 15, p. 4821-4826, 2015.

- WANG, S.-X. *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of auxin response factor (ARF) gene family in strawberry (*Fragaria vesca*). **Journal of Integrative Agriculture**, v. 18, n. 7, p. 1587-1603, 2019.
- WINKLER, M. *et al.* Variation in auxin sensing guides AUX/IAA transcriptional repressor ubiquitylation and destruction. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2017.
- WISNIEWSKA, J. *et al.* Polar PIN localization directs auxin flow in plants. **Science**, v. 312, n. 5775, p. 883-883, 2006.
- WRIGHT, A. D. *et al.* Indole-3-Acetic acid biosynthesis in the mutant maize orange pericarp, a tryptophan auxotroph. **Science**, v. 254, n. 5034, p. 998-1000, 15 nov. 1991.
- WU, B. *et al.* Genome-wide characterization and expression analysis of the auxin response factor (ARF) gene family during melon (*Cucumis melo* L.) fruit development. **Protoplasma**, v. 257, n. 3, p. 979-992, 2020.
- XIAO, K. *et al.* DNA methylation is involved in the regulation of pepper fruit ripening and interacts with phytohormones. **Journal of Experimental Botany**, v. 71, n. 6, p. 1928-1942, 2020.
- YANO, R.; EZURA, H. **Fruit Ripening in Melon**. In: GRUMET, R.; KATZIR, N.; GARCAMAS, J. (ed.). *Genetics and Genomics of Cucurbitaceae*. Springer, 2016. p. 345-375.
- YUAN, Y. *et al.* Auxin response factor 6A regulates photosynthesis, sugar accumulation, and fruit development in tomato. **Horticulture Research**, v. 6, n. 1, p. 1-16, 2019.
- YUE, J; HU, X; HUANG, J. Origin of plant auxin biosynthesis. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 12, p. 764-770, 2014.
- ZHANG, H. *et al.* Comparative transcriptomic analysis of two bottle gourd accessions differing in fruit size. **Genes**, v. 11, n. 4, p. 359, 27 mar. 2020.
- ZHANG, H. *et al.* Genome-wide identification of Hami melon miRNAs with putative roles during fruit development. **Plos One**, v. 12, n. 7, p. 0180600, 24 jul. 2017.
- ZHANG, H. *et al.* Transcriptome profiling of *Cucumis melo* fruit development and ripening. **Horticulture Research**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 27 abr. 2016.
- ZHANG, N. *et al.* Genome-wide identification of SAUR genes in watermelon (*Citrullus lanatus*). **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 23, n. 3, p. 619-628, 12 maio 2017.