**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Caracterização funcional do módulo miR156/*SlSBP6c* no
desenvolvimento do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)**

Felipe Hermínio Oliveira Souza

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas

**Piracicaba
2018**

Felipe Hermínio Oliveira Souza
Engenheiro Agrônomo

**Caracterização funcional do módulo miR156/SISBP6c no desenvolvimento
do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **FÁBIO TEBALDI SILVEIRA NOGUEIRA**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Souza, Felipe Herminio Oliveira

Caracterização funcional do módulo miR156/*SISBP6c* no desenvolvimento do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) / Felipe Herminio Oliveira Souza. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

72 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. MicroRNAs 2 Fatores de transcrição 3 Expressão gênica 4 Complexidade foliar 5 Órgãos florais 6 Florescimento 7. Filogenética I. Título

Aos meus pais, **Antônio Fernando** e **Anita Hermínia**,
Incentivadores do meu crescimento profissional.
E aos que igualmente à eles acreditam que o estudo é uma forma de arte, poética,
iluminando a bela jornada da vida.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por colocar pessoas iluminadas em meu caminho.

Aos meus pais, **Antonio Fernando e Anita Hermínia**, que com simplicidade e amor me ensinaram a encarar a realidade da vida.

Às minhas irmãs, **Fernanda Hermínia e Flávia Hermínia**, e meu cunhado **Nilson**, pelo carinho e companheirismo.

Aos **meus familiares** pelo carinho e atenção que me dispensaram nessa jornada, em especial aos meus avós Luiz Alves (*in memoriam*), Maria Hermínia (*in memoriam*), José S de Souza (*in memoriam*), Maria Adeilde e meus tios Geraldo, Unaldo e Francisco. **A família herminiana**, em especial **minha tia Alaíde Hermínia, e meus primos Luiz Neto, Walter Lisboa, Judson Augusto e Vitória Eugênia**, representando minha extensa e calorosa família que com amor, sempre me incentivou a superar as dificuldades. Vocês são as melhores pessoas do mundo!

À **todos meus amigos de Aracaju** e especialmente, Bia, Catarina, Doia, Daniel, Layanna e Lorena, pela motivação e apoio emocional.

Ao meu orientador, **Profº Dr. Fábio Tebaldi Silveira Nogueira**, por ter me confiado o desafio de desenvolver este projeto de pesquisa, e me apontado os caminhos para o desenvolvimento da tese.

Aos **meus colegas do laboratório**: Letícia Frizzo, ternura em pessoa e fonte de amizade, que sempre me fez ser assertivo com meus compromissos. Eterna gratidão a Antoinette Gady e a Carlos Barreira, que desde o meu primeiro dia no laboratório souberam ser solícitos e amigos, me ensinando a Genética Molecular. A João, Diego, Carol, Raphael, Marcela, Eder, Airton e Geraldo, muito obrigado!

Aos **professores do programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas da Esalq**, em especial a **Dr. Paulo Roberto e Castro e Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres**, grandes baluartes da ciência, que muito me ajudaram nos meus primeiros anos de Doutorado em Piracicaba.

Ao **Profº Dr. Luiz Carlos Basso**, pesquisador sênior do Dpto. de Ciências Biológicas da Esalq, e a todas as pessoas do seu laboratório, em especial a Camila e Marianne; grandes amigas que sempre alegraram meu dia.

À **Profª Drª Professora Helaine Carrer**, presidente da Comissão de Relações Internacionais da Esalq e membro das Comissões de Ética em Pesquisa, Biossegurança e CTNBio- MCTIC; e à equipe do **Cebtec** (Centro de Biotecnologia Agrícola da Esalq); em especial a Fátima, Ênio, Aparecida, Perla e Akemi.

À **Maria Solizete Granziol Silva**, Secretária da Pós-graduação da secretaria do PPG em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, que amorosamente auxilia a todos que a que necessitam do seu apoio.

Aos amigos da Pós-graduação Gabriel, Belarmino, Paula, Geo, Maria, Laécio, Gui, Liginha, Thiago, Taci, Lucas, Lorena, João Cardozo, Julian Múrcia, Joaquim, Aníbal, Thomas; que nos meus dias mais difíceis e nas noites mais escuras fizeramme mostraram que a vida é muito mais, e que vale a pena ser vivida sempre.

À **grande família Piracicabana**, que me acolheu no meu primeiro ano sempre presente para me motivar e encorajar.

Ao **grupo da Calistenia**, em especial a Gulau, Thiago Tracer, Thiago Belleti, Edu, Hotelori, Cris, Gustavo, um grande abraço!

Ao **Conselho Nacional de Ensino Superior - CAPES** e à **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP** pela concessão de bolsa de estudo.

À **Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”** (Universidade de São Paulo), agradeço pela possibilidade de realização do doutorado e pela excelência dos conhecimentos transmitidos, essenciais para minha formação profissional.

Ao **Programa de Aperfeiçoamento em Ensino (PAE)** pela experiência com atividades didáticas na graduação.

A **todos** que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desta importante etapa da minha vida.

Obrigado!

“Apressa-te a viver bem e pensa que cada dia é, por si só, uma vida. ”

(Sêneca)

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Módulo miR156/ <i>SBP</i>	19
2.2 Relevância do módulo miR156/ <i>SBP</i> no desenvolvimento vegetal	21
2.3 Órgãos foliares e sua coordenação pelo módulo miR156/ <i>SBP</i>	22
2.4 Importância do módulo miR156/ <i>SPL</i> para o florescimento	23
2.5 Módulo mir156/ <i>SBP</i> em tomateiro	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Material Vegetal	27
3.2 Análise filogenética	30
3.3 Cultivo das plantas para os experimentos	30
3.4 Análises Morfológicas e Fisiológicas	31
3.5 Análise da Arquitetura Foliar	31
3.6 Determinação Indireta de Clorofila (Índice SPAD)	32
3.7 Atividade Fotossintética	32
3.8 Análise de Tempo de Florescimento	33
3.9 Avaliação da Transição do Meristema Apical	33
3.10 Extração e análise de RNA total	33
3.11 Avaliação da expressão gênica por PCR quantitativo	34
3.12 Análise Estatística	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Análise Filogenética do domínio <i>SBP</i> da <i>SISBP6c</i>	37
4.2 Padrão de expressão do miRNA156 e seus genes alvos <i>SISBP6a</i> , <i>SISBP6b</i> , <i>SISBP6c</i> ao longo do desenvolvimento foliar e nas inflorescências de tomateiro cv. Micro-Tom	39

4.3	Perfil de expressão do gene <i>SISBP6c</i> no ápice de tomateiro cv. Micro-Tom no quarto e décimo dias após emergência.	42
4.4	Super-expressão da versão resistente ao miR156 do gene <i>SISBP6c</i> em tomateiro (<i>rSISBP6c</i>).....	44
4.5	O aumento da expressão do gene <i>SISBP6c</i> influencia na porcentagem de recorte acentuado nos folíolos na segunda folha do eixo principal de tomateiro ..	47
4.6	A super-expressão do gene <i>rSISBP6c</i> nas linhagens transformadas #3 e #6 aumenta a complexidade foliar na quinta folha do eixo principal.	48
4.7	Super-expressão do gene <i>SISBP6c</i> promove redução do acúmulo de transcritos do miR156 nas folhas adultas.....	51
4.8	A super-expressão do gene <i>rSISBP6c</i> nas linhagens transformadas #3 e #6 aumenta a taxa fotossintética do tomateiro.....	53
4.9	A super expressão do gene <i>rSISBP6c</i> atrasa o florescimento nas linhagens transformadas em relação ao tomateiro cv. Micro-Tom.....	55
4.10	Transição do meristema apical vegetativo para reprodutivo em plantas Micro-Tom (MT) e nas linhagens transformadas #3 e #6.....	58
5.	CONCLUSÕES.....	65
	REFERÊNCIAS	67

RESUMO

Caracterização funcional do módulo miR156/*SISBP6c* no desenvolvimento do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)

A genética molecular permite o entendimento dos mecanismos que regulam o desenvolvimento dos órgãos vegetais em resposta a fatores bióticos e abióticos. A regulação de vias gênicas é de fundamental importância no sucesso reprodutivo, evolutivo e econômico dos vegetais. Uma das modalidades de regulação é a pós transcricional através de microRNAs (miRNAs). Tratam-se de pequenos RNAs endógenos não codantes que possuem uma complementaridade quase perfeita em plantas. Em plantas, muitos genes-alvos de miRNA codificam-se para fatores de transcrição, como os genes SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like (*SPL/SBP*). O microRNA156, conservado entre as Angiospermas, regula diversos fatores de transcrição da família *SBP*. O módulo miR156/*SBP*, denominado via da idade (AGE), atua ao longo do ciclo de vida dos vegetais regulando as transições de fase: juvenil-adulta e vegetativa-reprodutiva. O tomateiro, *Solanum lycopersicum* L., possui genes *SISBP*s regulados pelo miR156 e com funcionalidade não esclarecida. Dentre aqueles, o gene *SISBP6c* (Soly12g038520) se destaca por possuir maior similaridade filogenética com *SPL6s/SBP6s* de solanáceas do que seus genes homólogos *SISBP6a* e *SISBP6b* o que sugere a hipótese de um possível ganho de função. Com o intuito de testar essa hipótese, o presente trabalho objetivou caracterizar funcionalmente o gene *SISBP6c*. Para tanto, utilizou-se o genótipo 35S::r*SISBP6c*, planta transformada de tomateiro cultivar Micro-Tom (MT) que super-expressa a versão resistente ao miR156 do gene *SISBP6*, fusionada ao promotor viral 35S. Este material vegetal foi gerado pelo laboratório de Genética Molecular do Desenvolvimento Vegetal e cedido para execução desta pesquisa. O trabalho se desenvolveu em duas etapas: caracterização molecular e morfo-fisiológica. Primeiramente, os genes *SISBP6a*, *SISBP6b* e *SISBP6c* de tomateiro foram analisados quanto a sua expressão ao longo do desenvolvimento em folhas e inflorescência. E, posteriormente, foram analisados a complexidade foliar, o tempo de florescimento, a transição do meristema vegetativo para o reprodutivo, o teor relativo de clorofila e a fotossíntese líquida. Os resultados obtidos demonstram que os genes *SISBP6a* e *SISBP6c* são semelhantes no padrão de expressão gênica na homologia das proteínas que o codificam, indicando similaridade funcional. A de-regulação do gene *SISBP6c* leva ao aumento a complexidade foliar, o teor relativo de clorofila e a fotossíntese líquida. O atraso na transição do meristema vegetativo para o reprodutivo se evidencia por um florescimento tardio nas plantas que super-expressam o gene *SISBP6c*. Os resultados demonstram que o gene *SISBP6c* exerce funcionalidade no tomateiro atuando na transição de fase vegetativo-reprodutivo.

Palavras-chave: MicroRNAs; Fatores de transcrição; Expressão gênica; Complexidade foliar; Órgãos florais; Florescimento; Filogenética

ABSTRACT

Functional characterization of the module miR156/*SISBP6c* in tomato development (*Solanum lycopersicum* L.)

Molecular genetics allows the understanding of the mechanisms that regulate the development of plant organs in response to biotic and abiotic factors. The regulation of gene pathways is of fundamental importance in the reproductive, evolutionary and economic success of the plants. Research has been increasing the knowledge about post-transcriptional regulation through microRNAs (miRNAs). The miRNAs are small non-coding endogenous RNAs that have almost perfect complementarity in plants. Many miRNA target genes in plants are encoded by transcription factors, such as the *SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE* (*SPL* / *SBP*) genes. MicroRNA156 is conserved among Angiosperms and regulates several transcription factors of the *SBP* family. The miR156 / *SBP* module, called the age pathway (AGE), acts throughout the life cycle of plants regulating phase transitions juvenile-adult and vegetative-reproductive. The tomato, *Solanum lycopersicum* L., has newly described and unintelligently regulated miR156 regulated *SISBP*s. Among these, the gene *SISBP6c* (Soly12g038520) stands out for having greater phylogenetic similarity with solanaceous *SBP*s than its homologous genes *SISBP6a* and *SISBP6b*, indicating a possible gain of function related to characteristics of this family of plants as fleshy fruits and composite leaves. In order to test this hypothesis the work aimed to characterize the *SISBP6c* gene functionally. Using as a tool the 35S::r*SISBP6c* genotype, transformed tomato plant micro-Tom (MT) that over-expresses the miR156 resistant version of the *SISBP6* gene, fused to the 35S viral promoter. The Laboratory of Molecular Genetics of Plant Development generated this plant material. The work was developed in two stages: molecular and morpho-physiological characterization. In the first the genes *SISBP6a*, *SISBP6b* and *SISBP6c* of tomato were analyzed for their expression throughout the development in leaves and inflorescence. In the second, the leaf complexity, the flowering time, the transition from vegetative to the reproductive meristem, the relative chlorophyll content and the net photosynthesis were evaluated. The results obtained demonstrate that the *SISBP6a* and *SISBP6c* genes are very similar in the pattern of gene expression in the homology of the coding proteins, indicating a functional similarity. The *SISBP6c* gene acts to increase leaf complexity, relative chlorophyll content and liquid photosynthesis. A late flowering in plants that overexpress the *SISBP6c* gene evidences the delay in the transition from the vegetative to the reproductive meristem. The data set demonstrates that the *SISBP6c* gene has important functionality in tomatoes acting on vegetative-reproductive phase transition.

Keywords: MicroRNAs; Transcription factors; Gene expression; Leaf complexity; Floral organs; Plant; Flowering; Phylogenetics

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Modelo simplificado da biogênese e modo de ação dos miRNAs em plantas. O miRNA primário é transcrito a partir de um loco miRNA por *pol II*, gerando um precursor miRNA com uma estrutura *hairpin*. A DCL1 processa a *hairpin* em um duplex de miRNA (vermelho) e miRNA * (verde) com extremidades 2-nt 3'-terminal. A HEN1 metila o ribonucleótido do terminal 3' do duplex. Posteriormente, o HST transporta o duplex do núcleo para o citoplasma. O miRNA * é rapidamente degradado, enquanto o miRNA é carregado em AGO1 em um complexo RISC para realizar sua função, via inibição da translação ou clivagem do transcrito. Adaptado de (CHEN et al., 2018).19
- Figura 2. miR156 e de miR172. Esquema resumido demonstrando o padrão de expressão do miR156 e do miR172 durante as etapas de desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de *Arabidopsis thaliana* L., evidenciando que a expressão do miR156 é reduzida conforme a planta se desenvolve, e assim seus respectivos alvos (*SPL9* e *SPL10*) ficam livres de sua regulação. Esses alvos ativam a expressão do miR172 que consequentemente reprime os repressores florais (*AP2*), fazendo com que a planta atinja o estágio reprodutivo (MARQUES, 2016).24
- Figura 3. Mutações silenciosas no sítio de reconhecimento de miR156. (A) Representação da ORF (*Open Reading Frame*) do gene *SISBP6c*, indicando em vermelho o sítio de reconhecimento do miR156. Abaixo se observa a sequência nucleotídica do sítio para o miR156 do gene *SISBP6c* (em tomateiro MT), o qual é alvo do miR156, e a sequência nucleotídica do transgene *rSISBP6c* (contendo mutações silenciosas, em vermelho), a qual não é reconhecida pelo miR156.29
- Figura 4. Confirmação da linhagem transgênica 35S::r*SISBP6c* via PCR e análise semi-quantitativa de seus transcritos, por RT-qPCR. Genotipagem e análise de transcritos do transgene p35S::r*SISBP6c* e análise de expressão dos transcritos totais *SISBP6c* (transcritos endógenos *SISBP6c* + os transcritos do transgene p35S::r*SISBP6c*) em plantas de *Solanum lycopersicum* cultivar Micro-Tom e em um evento transgênico r*SISBP6c* (evento #3 contendo o transgene p35S::r*SISBP6c*). O gene *SlyTUBULIN* (*SlyTUB*) foi utilizado como controle por se tratar de um gene endógeno que possui expressão regular em todos os tecidos.29
- Figura 5. Representação do eixo principal de *Solanum lycopersicum* cv. tomateiro Micro-Tom. Regiões utilizadas nas análises morfológicas e fisiológicas. Eixos principal, primário e região lateral (RL). Fonte: Adptado de (VICENTE et al., 2015).31

- Figura 6. Recorte acentuado nos folíolos da folha II. A) Detalhe comparativo do recorte acentuado na folha II do eixo principal no tomateiro cv. Micro-tom (esquerda) e no transgene 35S::r*SISBP6c* linhagem #3 (direita). B) Folíolos que compõem a folha composta do controle Micro-Tom. (A) Folhas do eixo principal no MT. (B) Número de folíolos individualizados, em destaque. 32
- Figura 7. Filograma em destaque do Clado I. Homologia da *SISBP6a* e *SISBP6c* com demais *SBP6* de solanáceas. Bootstrap de 100. 38
- Figura 8. Análise filogenética das sequências gênicas *SBP6*-like. O domínio SBP da *SISBP6c* foi utilizado como base para a comparação de homologia entre as espécies. Os genes foram alinhados utilizando o Clustal W. O filograma foi construído utilizando o olgarítimo de Máxima-verosimilhança. Os grupos formados pelas famílias *SBP6*-like foram diferenciados por cores, divididos em clados e rotulados em numerais romanos. Bootstrap de 100. 39
- Figura 9. Desenvolvimento das folhas do Micro-tom. A) Planta de Micro-Tom com 45 dias após semeadura. B) Órgãos vegetais coletados para extração de RNA: Folha I, III e V e inflorescência. 40
- Figura 11. Expressão relativa gênica via RT-qPCR da sequência *SISBP6c* ao longo do desenvolvimento inicial de ápices de *Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-tom. Ápices com 4 e 10 dias após emergência. Médias de mesma letra não diferem entre si pelo teste t ao nível de significância de 5%. 43
- Figura 12. Genótipos utilizados na análise de expressão do gene *SISBP6c* por RT-q-PCR na quinta folha do eixo principal. A) Planta de Micro-Tom com 45 dias após semeadura. B) Plantas geneticamente modificadas super-expressando a *rSISBP6c* (35S::r*SISBP6c*), linhagens #3, #4 e #6 ao 45 dias após semeadura. 45
- Figura 13. Relação de transcritos do gene *SISBP6c* na quinta folha do eixo principal de tomateiro cv Micro-Tom. A) Análise de expressão relativa do gene *SISBP6c* na linhagem transformada #3, #4 C) #6. Diferenças estatísticas foram representadas por letras ($p < 0,05$ no teste T). 46
- Figura 14. Recorte acentuado na segunda folha do eixo principal em folhas de tomateiro, cultivar Micro-Tom, linhagem *rSISBP6c* #3 e *rSISBP6c* #6 com 35 dias após emergência. Setas em vermelho destacam o recorte acentuado na morfologia das folhas. 48
- Figura 15. A) Folíolos destacados para análise quantitativa, B) Avaliação da complexidade foliar da quinta folha do eixo principal em *Solanum lycopersicum* L. cultivar Micro-Tom e nas linhagens transgênicas 35S::r*SISBP6c* #3 e #6. Médias de mesma letra não diferem entre si pelo teste t ao nível de significância de 5%. 50

- Figura 16. Análise de RT-qPCR do miR156 na quinta (V) folha do eixo principal. A) Planta de Micro-Tom com 45 dias após semeadura. B) Plantas transformadas super expressando *rSISBP6c* (35S::*rSISBP6c*), linhagens #3, #4 e #6, com 45 dias após semeadura. C) Análise de expressão relativa do miR156 na linhagem transformada #3. D) Análise de expressão relativa do fator de transcrição miR156 na linhagem transformada #4. E) Análise de expressão relativa do fator de transcrição miR156 na linhagem transformada #6. Diferenças estatísticas foram representadas por letras. ($p < 0,05$).52
- Figura 17. Teor relativo de clorofila na cultivar de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) Micro-Tom e nas linhagens transformadas 35S::*rSISBP6c* #3 e #6. Médias de mesma letra não diferem entre si pelo teste t ao nível de significância de 5%.54
- Figura 18. Fotossíntese líquida ou taxa de assimilação de CO₂ na cultivar de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) Micro-Tom e nas linhagens transformadas 35S::*rSISBP6c* #3 e #6. Médias de mesma letra não diferem entre si pelo teste t ao nível de significância de 5%.54
- Figura 19. Média do número de folhas no eixo principal até a primeira inflorescência em Micro-Tom e nas linhagens transformadas 35S::*rSISBP6c* #3 e #6. Folhas em destaque. Número de dias até a antese no Micro-Tom e nas linhagens que super expressam a *rSISBP6c*. Estabelecido quando 50% das plantas apresentam a 1° flor em antese. Médias de mesma letra não diferem entre si pelo teste t ao nível de significância de 5%.56
- Figura 20. Média do número de flores por inflorescência no Micro-Tom e nas linhagens transgênicas 35S::*rSISBP6c* #3 e #6. Médias de mesma letra não diferem entre si pelo teste t ao nível de significância de 5%.57
- Figura 21. Padrão de desenvolvimento meristemático de plântulas de tomateiro MT. A-C) meristemas representativos dos estágios de desenvolvimento avaliados. D) imagem representativa do primeiro dia de desenvolvimento. E) Frequência do estado meristemático de ápices de plântulas MT e e das linhagens transformadas 35S::*rSISBP6c* #3 e #6 ao longo do desenvolvimento do 4o ao décimo dia após germinação. Foram avaliadas 18 plântulas para cada genótipo em cada tempo de desenvolvimento. ...60
- Figura 22. Desenvolvimento dos verticilos florais em *Solanum lycopersicum* L. cultivar Micro-Tom e nas linhagens transformadas #3 e #6 aos 10 dias após emergência. A) Ápices de Micro-Tom. B) Ápices da linhagem 35S::*rSISBP6c* #3. C) Ápices da linhagem 35S::*rSISBP6c* #6. Setas em destaque apontam para verticilos florais em estágio de desenvolvimento avançado em relação aos demais.62

LISTA DE TABELAS

Tabela1. Genótipos utilizados no presente trabalho. O cultivar Micro-Tom (MT), o transgênico resistente ao miR156, 35S::rS/IBP6c; a planta super expressando o miR156 (SILVA et al., 2014);	27
Tabela 2. Porcentagem de plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> L. para cada genótipo que apresentam recorte acentuado.	47

1 INTRODUÇÃO

No estudo de plantas é preciso considerar a capacidade de adaptação diante de contingências ambientais e fisiológicas. Em seu ciclo de vida, uma planta pode desenvolver órgãos e tecidos, garantindo sua adaptação, por meio de diferentes processos metabólicos, fisiológicos e moleculares no interior da célula vegetal. As investigações sobre esta temática incluem análises sobre os mecanismos de regulação gênica que participam de diferentes aspectos do desenvolvimento vegetal. Dentre os elementos gênicos que podem ser analisados destaca-se, neste trabalho, a expressão de fatores de transcrição e microRNAs.

Pesquisas sobre microRNAs trouxeram novas perspectivas para o estudo da regulação gênica e sua aplicabilidade no melhoramento vegetal e na engenharia genética (AUNG; GRUBER; HANNOUFA, 2015). Estes conhecimentos têm sido usados como alternativas eficazes para aumentar a produtividade dos cultivos agrícolas (AUNG; GRUBER; HANNOUFA, 2015). MicroRNAs (miRNAs) são um grupo de pequenos RNAs não-codantes, endógenos, com cerca de 21-24 nucleotídeos de comprimento. Atuam como reguladores negativos de seus genes alvo, por clivagem específica do RNA mensageiro, repressão translacional ou modificações de cromatina. Alterações na expressão de um miRNA ou de seus alvos, frequentemente resultam em uma variedade de anormalidades morfológicas e fisiológicas, sugerindo o forte impacto dos miRNAs no desenvolvimento das plantas (LIU et al., 2018). Os microRNAs atuam no silenciamento de transcritos e na regulação pós-transcricional da expressão gênica (JIN et al., 2013). Em plantas, eles reconhecem os RNAs específicos (DEBERNARDI et al., 2012; JIN et al., 2013), devido, à complementaridade de pares de bases, existente entre o miRNA e o RNA mensageiro (mRNA) (VOINNET, 2009).

Dentre as vias genéticas reguladas pelos microRNAs com influência no desenvolvimento vegetal se destaca a família de fatores de transcrição: SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (*SBP/SPL*) regulada pelo microRNA 156 (miR156) (WANG; WANG, 2015); que são fatores de transcrição exclusivos de plantas (KLEIN; SAEDLER; HUIJSER, 1996), e altamente conservados ao longo da evolução no reino vegetal. O módulo miR156/*SPL/SPB* regula as fases de transição: juvenil a adulta, e vegetativa a reprodutiva (RUBIO-SOMOZA et al., 2014) (ZHANG; HU, 2015), além de formar uma extensa rede de fatores de transcrição, que controla o crescimento e o desenvolvimento das plantas (AUNG; GRUBER; HANNOUFA, 2015).

Trabalhos recentes indicam que o papel da família de genes *SBP*, principalmente focando o desenvolvimento do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), tem destaque como uma ferramenta para uso em transformações gênicas devido ao genoma diploide, ciclo curto, fácil cultivo e com recursos genômicos disponíveis em site público <<https://solgenomics.net/>> (FERNANDEZ et al., 2009).

Os genes *SISBP* específicos de tomateiro, não possuem caracterização funcional totalmente esclarecida (SALINAS et al., 2012). A família de genes *SBP/SPL*, ou *SPL-SBP* box, devido ao alto potencial de duplicação gênica, é um excelente sistema para o estudo de genes que divergiram evolutivamente e funcionalmente (PRESTON; HILEMAN, 2013a). A duplicação gênica pode ocasionar: perda funcional em uma cópia (não-funcionalização), evolução funcional (sub-funcionalização) (Lynch e Connery 2000; Ohno 1970; Zhang et al. 1998; Zhang 2003; Preston 2013.)

Os genes homólogos *SISBP6* de tomateiro: *SISBP6a*, *SISBP6b*, *SISBP6c*, possuem sequências de DNA de origem comum. Na análise filogenética que comparou o domínio conservado *SBP* destas *SBP6* foi encontrado que os genes *SISBP6a* e *SISBP6c* apresentam maior homologia entre si. O gene *SISBP6b* apresenta maior homologia com a *SPL6* de *Arabidopsis thaliana* L., espécie vegetal com características morfológicas diferentes das do tomateiro, não possuindo frutos carnosos nem folhas compostas. Entretanto, na análise do padrão de expressão gênica, os genes *SISBP6a* e *SISBP6b* apresentaram níveis de transcritos em tecidos semelhantes (das sementes aos frutos completamente maduros). O gene *SISBP6c* apresentou transcritos nos ápices (em desenvolvimento inicial e tardio) e na inflorescência (SALINAS et al., 2012).

Em plantas, muitos genes-alvos de miRNA codificam-se para fatores de transcrição, como os genes SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like (*SPL/SBP*). O microRNA156, conservado entre as Angiospermas, regula diversos fatores de transcrição da família *SBP*. O módulo miR156/*SBP*, denominado via da idade (AGE), atua ao longo do ciclo de vida dos vegetais regulando as transições de fase: juvenil para a adulta e vegetativa para a reprodutiva.

O tomateiro, *Solanum lycopersicum* L., possui genes *SISBPs* regulados pelo miR156 e com funcionalidade não esclarecida. Dentre aqueles, o gene *SISBP6c* (Solyc12g038520) se destaca por possuir maior similaridade filogenética com *SBP6s* de solanáceas do que seus genes homólogos *SISBP6a* e *SISBP6b*. Os níveis de transcritos

do gene *SISBP6c* nos ápices em desenvolvimento inicial podem ter influência na transição de fase vegetativa para a reprodutiva, uma vez que esse processo é regulado pelo módulo miR156/*SBP*. Em tomateiro cultivar Micro-Tom a transição ocorre no quarto dia após a emergência das plântulas (SILVA et al., 2014). Essas informações sugerem a hipótese de um possível ganho de função relacionado as características desta família de plantas como frutos carnosos e folhas compostas. Assim, o gene *SISBP6c* apresenta características filogenéticas e transcricionais que parecem indicar um possível evento de duplicação gênica e ganho de função, por ser o mais divergente dos três homólogos de tomateiro.

Com o intuito de testar essa hipótese, esta tese objetivou caracterizar funcionalmente o gene *SISBP6c*. Para tanto, utilizou-se o genótipo 35S::*rSISBP6c*, planta transformada de tomateiro cultivar Micro-Tom (MT) que super-expressa a versão resistente ao miR156 do gene *SISBP6*, fusionada ao promotor viral 35S.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Módulo miR156/SBP

Os microRNAs (miRNAs) são ferramentas da genética molecular, que regulam o desenvolvimento vegetal cuja abrangência sobre a fisiologia e bioquímica de plantas, ainda não está totalmente esclarecida. Pesquisas recentes apontam para a influência, e em alguns casos, para o controle, de características de grande importância na produtividade agrícola, na produção de sementes e no florescimento (SILVA et al., 2017, 2018). Os miRNAs constituem uma classe funcional bem estudada de pequenos RNAs em plantas (CHEN et al., 2018), e estão entre os elementos regulatórios de expressão gênica (NOZAWA; MIURA; NEI, 2012). E se caracterizam por serem advindos de sequências não codantes, com comprimento variando entre 21-24 (nt) nucleotídeos (LIU et al., 2018).

A biogênese dos miRNAs é um processo complexo e amplamente conservado em plantas (CHEN et al., 2018) (Figura 1).

Figura 1. Modelo simplificado da biogênese e modo de ação dos miRNAs em plantas. O miRNA primário é transcrito a partir de um loco miRNA por *pol II*, gerando um precursor miRNA com uma estrutura *hairpin*. A DCL1 processa a *hairpin* em um duplex de miRNA (vermelho) e miRNA* (verde) com extremidades 2-nt 3'-terminal. A HEN1 metila o ribonucleótido do terminal 3' do duplex. Posteriormente, o HST transporta o duplex do núcleo para o citoplasma. O miRNA* é rapidamente degradado, enquanto o miRNA é carregado em AGO1 em um complexo RISC para realizar sua função, via inibição da tradução ou clivagem do transcrito. Adaptado de (CHEN et al., 2018).

Um gene de miRNA (*MIR*) é transcrito pela RNA polimerase II (RNAP II), produzindo pequenos RNAs, micromicroRNAs primários (pri-miRNAs), que possuem longa cadeia nucleotídica com uma estrutura *stem-loop*, uma 7-metilguanosina (*cap*) no terminal 5' e uma poliadenilação no terminal 3'. No núcleo, o pri-miRNA é sequencialmente clivado pela endoribonuclease RNA polimerase III Dicer-like1 (DCL1) para produzir o miRNA precursor (pre-miRNA), que consiste em um duplex miRNA/miRNA com dois nucleotídeos 3' em estrutura de gramp (*hairpin*). O duplex é metilado nos resíduos terminais 3' por Hua enhancer1 (HEN1) 9. Nessa etapa, uma proteína chamada *Exportina-5* forma um complexo com outras proteínas nucleares e o pre-miRNA, para que este seja transportado para fora do núcleo. No citoplasma, o duplex é clivado, o miRNA rapidamente degradado e o miRNA maduro incorporado à proteína argonaute 1 (AGO1) para formar um complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) (CHEN et al., 2018).

O complexo RISC (RNA – Induced Silencing Complex) possibilita o controle preciso dos seus genes alvos por necessitar das sequências complementares perfeitas ou quase perfeitas destes genes (AUNG; GRUBER; HANNOUFA, 2015). Portanto, os miRNAs agem como reguladores negativos pós-transcricionais, atuando na clivagem específica de RNA mensageiro, na repressão translacional, e em alguns casos, na modificação da cromatina (LIU et al., 2018).

Existem inúmeros miRNAs que atuam controlando a expressão de diversos genes e em várias rotas metabólicas. Porém alguns se destacam por ser conservados ao longo da evolução, atuando nos mesmos genes alvos em uma ampla gama de espécies vegetais, de embriófitas a angiospermas; o que lhes confere papéis-chave na coordenação do crescimento e desenvolvimento das plantas (CHEN et al., 2018). Como exemplo, a família miR156 é altamente conservada em plantas e está envolvida nas principais etapas do desenvolvimento pós-embrionário. O miR156, regula negativamente os genes *Squamosa promoter binding protein-like* (*SBP/SPL*) com impacto direto sobre o desempenho e sucesso reprodutivo (XU et al., 2016). Os fatores de transcrição *SBP/SPL* são responsáveis pelas transições de fase juvenil a adulta e vegetativa a reprodutiva (FORNARA; COUPLAND, 2009).

2.2 Relevância do módulo miR156/SBP no desenvolvimento vegetal

A importância do módulo regulatório miRNA/SBP/SPL para o desenvolvimento das plantas, é evidente. SBP/SPL são proteínas de ligação ao DNA, capazes de ativar ou reprimir a transcrição de múltiplos genes alvo, além de serem fatores de transcrição exclusivos do reino vegetal (YANG et al., 2008). Essa cadeia regulatória está envolvida em uma cascata de interações gênicas, metabólicas, fisiológicas, bioquímicas e anatômicas evidenciando que, alterações no módulo miR156/SBP/SPL podem ter efeitos expressivos no desenvolvimento vegetal (SILVA et al., 2014; CHEN, 2005; GUO et al., 2017; JUNG et al., 2016; LEE et al., 2012; XIE et al., 2012).

Investigações recentes sobre microRNAs e seus alvos, objetivaram desenvolver melhores tratos agrícolas, por meio do conhecimento das suas ações envolvendo: arquitetura foliar, tempo de florescimento, desenvolvimento de frutos, imunidade a patógenos e resposta a nutrientes (CHEN et al., 2018; LEI et al., 2016; SILVA et al., 2017; TOUSI et al., 2017).

Os principais miRNAs descritos na literatura atuantes nesses processos são miR156, miR172, miR159 e miR319. A interação miR156/miR172 destaca-se pela regulação das principais fases de transição com influência na organogênese de diversos vegetais (LIU et al., 2018). A espécie *Arabidopsis thaliana*, principal modelo na área de genética molecular de desenvolvimento vegetal, possui 16 genes SBP/SPL. Daqueles, 10 são alvo da miR156 e divididos em três grupos funcionalmente distintos: *SPL2*, *SPL9*, *SPL10*, *SPL11*, *SPL13* e *SPL15* que contribuem para a transição da fase vegetativa juvenil para a adulta, e da vegetativa para a reprodutiva. Apesar dos genes *SPL3*, *SPL4* e *SPL5* não desempenharem papel importante na mudança de fase vegetativa ou indução floral, eles promovem a transição da identidade do meristema floral. O gene *SPL6* parece não possuir função preponderante na morfogênese da parte aérea (XU et al., 2016).

Nos estádios iniciais do desenvolvimento de *arabidopsis*, o microRNA156 possui níveis elevados de expressão, que regulam os genes *SPL9* e *SPL10*, promovendo a manutenção da fase vegetativa. Ao longo do tempo, essa expressão diminui induzindo a transição da fase juvenil para a adulta, devido aos altos níveis de transcritos dos genes *SPL9* e *SPL10*. Estes, por sua vez, induzem a expressão do miR172, que inibe os repressores florais da família gênica *APETALA2-like* (*AP2*),

promovendo a transição da fase vegetativa para a reprodutiva e induzindo o florescimento (AUKERMAN; SAKAI, 2003).

2.3 Órgãos foliares e sua coordenação pelo módulo miR156/SBP

Em relação ao miR156, ressalta-se que a redução da sua atividade também interfere na organogênese vegetal, visto que, as folhas têm grande importância para a fotossíntese, para a manutenção do balanço hídrico e para as trocas gasosas. A mudança da fase juvenil para adulta acelera a arquitetura foliar (heteroblastia), pela sinalização da glicose (produzido pela fotossíntese) e pela atividade reduzida do miR156 regulando os genes *SPLs*. As mudanças na morfologia ocorrem na presença de folhas com diferentes formatos no mesmo indivíduo (heterofilia), em resposta ao ambiente mediadas pela temperatura e pelos genes *Knotted1-Like Homeobox (KNOX)* (CHITWOOD; SINHA, 2016).

A heteroblastia, envolvida na complexidade foliar, é moldada com o aumento nos níveis de proteína SBP/SPL, principalmente a expressa pelo gene *SPL9*, durante a transição da fase juvenil para a adulta. A proteína SPL9 desestabiliza o complexo (Cup-Shaped Cotyledon-CUC) CUC-TCP, sendo os fatores *TCPs* (*Teosinte branched1*, *CYCLOIDEA*, *PROLIFERATING CELL FACTORS*) importantes no controle da proliferação de células durante o desenvolvimento foliar. Na fase juvenil as proteínas TCP encontram-se complexadas às proteínas CUCs, fatores de transcrição que esculpem as margens foliares. Esse complexo CUC-TCP impede a formação de serrilhamentos tanto em *A. thaliana*, quanto em *Cardamine hirsuta* L. (CHITWOOD; SINHA, 2016). À medida que as plantas envelhecem ocorre a liberação das proteínas CUC, devido ao surgimento do complexo *TCP-SPL9*. As proteínas CUC livres, rapidamente se complexam entre si (CUC1-CUC2) e, assim, aumentam o número de serrilhamentos e de folíolos à medida que a série heteroblástica progride (RUBIO-SOMOZA et al., 2014).

O gene *Single Flower Truss (SFT)* homólogo ao gene *Flowering locus T (FT)* de *Arabidopsis*, é um dos principais responsáveis pelo controle de tempo de florescimento do tomateiro (ZHANG et al., 2011). A proteína FT é principalmente produzida nas folhas e transportada para o meristema apical vegetativo (MAV), onde interage com a proteína *Flowering locus D (FD)* para induzir a transição de meristema apical para meristema de floral (WENG et al., 2016).

Outros sinais endógenos (ação de hormônios e expressão de genes específicos) e ambientais (fotoperíodo e temperatura) interagem para determinar a passagem do estágio vegetativo para o reprodutivo. Esses sinais marcam o início da conversão do meristema apical vegetativo para meristema de inflorescência primária, e na sequência forma-se lateralmente ao meristema de inflorescência primária o meristema floral e, a partir dele, iniciam-se a formação e desenvolvimento dos verticilos florais e, conseqüentemente, da flor (TAIZ; ZEIGER, 2010).

2.4 Importância do módulo miR156/SPL para o florescimento

Dentre os fatores de transcrição endógenos supracitados, o miR172 possui papel importante no desenvolvimento floral, reprimindo os fatores de transcrição da família *AP2*, a qual é composta por genes que codificam proteínas conhecidas como repressores florais e possui cinco membros *TARGET OF EAT (TOE1, TOE2, TOE3)*, *SCHLAFMUTZE (SMZ)* e *SCHNARCHZAPFEN (SNZ)*. A ação regulatória do miR172 ocorre por inibição da tradução, ao invés de induzir clivagem do transcrito dos seus alvos, como ocorre com a maioria dos miRNAs. Os fatores de transcrição *SPL3*, *SPL4* e *SPL5* potencializam o módulo *FT-FD*. O gene *FD* é um fator de transcrição do tipo bZIP preferencialmente expresso no meristema apical, e é necessário para que *FT* promova o florescimento. As proteínas *FT* e *FD* interagem fisicamente para dar início ao desenvolvimento floral através da ativação transcricional dos genes de identidade floral, tais como o *APETALA1 (AP1)*, *LEAFY (LFY)*, e *FRUITFULL (FUL)* (ABE et al., 2005). Por facilitar o acesso do *FT* ao *FD*, as proteínas codificadas pelos fatores de transcrição *SPL3*, *SPL4* e *SPL5* possuem influência direta no florescimento (JUNG et al., 2016).

Na Figura 2, apresenta-se a redução na expressão de miR156, que é diretamente proporcional ao desenvolvimento da planta. Portanto, seus respectivos alvos (*SPL9* e *SPL10*) ficam livres da sua regulação, e ativam a expressão do miR172 que, conseqüentemente reprime os repressores florais (*AP2*), fazendo com que a planta entre no estágio reprodutivo (MARQUES et al., [s.d.]).

Figura 2. miR156 e de miR172. Esquema resumido demonstrando o padrão de expressão do miR156 e do miR172 durante as etapas de desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de *Arabidopsis thaliana* L., evidenciando que a expressão do miR156 é reduzida conforme a planta se desenvolve, e assim seus respectivos alvos (*SPL9* e *SPL10*) ficam livres de sua regulação. Esses alvos ativam a expressão do miR172 que consequentemente reprime os repressores florais (*AP2*), fazendo com que a planta atinja o estágio reprodutivo (MARQUES, 2016).

As proteínas *SBP/SPL* vêm sendo estudadas em diversos aspectos do desenvolvimento vegetal, desde a sua descoberta em *Antirrhinum majus* L, devido a sua interação *in vitro* com a região promotora do gene de identidade floral *SQUAMOSA* (KLEIN; SAEDLER; HUIJSER, 1996). As *SBP/SPL* foram isoladas e caracterizadas em diversas plantas, tais como *arabidopsis* (Cardon et al. 1999), *Cardamine hirsuta* L. (CHITWOOD; SINHA, 2014), *Oryza sativa* L. (arroz) (XIE, 2006) *Zea mays* L. (milho) (HULTQUIST; DORWEILER, 2008), e *Solanum lycopersicum* L. (tomateiro) (SALINAS et al., 2012).

2.5 Módulo mir156/SBP em tomateiro

O tomateiro é uma das culturas vegetais de grande importância mundial (ZHANG et al., 2011). Esta solanácea, além do destaque econômico, é considerada um modelo frequentemente utilizado para o estudo do desenvolvimento vegetal, particularmente na biologia de seus frutos carnosos. O tomateiro *S. lycopersicum* possui genoma diploide ($2n=2x=24$), curto período entre gerações e facilidade de obtenção de plantas geneticamente modificadas; e seus recursos genômicos e genéticos são de domínio público (FERNANDEZ et al., 2009).

Salinas et al. (2012) descreveram 16 genes *SBP/SPL* de tomateiro e os renomeou com o prefixo Sly (*SISBP*), tornando menos ambígua a denominação. Das 16

SISBP, dez contem a sequência de reconhecimento para o miR156: *SISBP15*, *SISBP13*, *SISBP10*, *SISBP2*, *SISBP6c*, *SISBP6b*, *SISBP6a*, *SISBP4*, *SISBP3*, e o gene *CNR*. Tais genes se distinguem em dois grupos com base no tamanho da proteína produzida e na posição do sítio de regulação para o miR156. Os genes *SISBP* pequenos, como o *SISBP3*, apresentam o sítio de reconhecimento para o miR156 na região 3' Untranslated region; e os genes *SISBP* maiores, como *SISBP15*, apresentam o sítio de reconhecimento para o miR156 na região codante.

Em relação ao padrão de expressão, os genes *SISBP* foram divididos em duas categorias, os de maior tamanho *SISBP12a* e *SISBP7*, e os de tamanho médio *SISBP10*, que parecem se expressar de forma constitutiva, isto é, desde a plântula até o fruto maduro. Os demais genes *SISBP* apresentam padrão de expressão global diferenciado (SALINAS et al., 2012). Transcritos de quase todos os genes *SISBP* foram encontrados nos órgãos florais, com exceção dos transcritos de *SISBP6c* e *SISBP6a*, os quais também foram encontrados em baixos níveis em órgãos vegetativos (SALINAS et al., 2012). Um vasto campo de pesquisa se vislumbra para o entendimento do padrão de expressão desses novos fatores de transcrição e das possíveis novas funções que podem desempenhar no cenário da inovação agrícola. E neste cenário se destaca o impacto do módulo miRNA156/SISBP no desenvolvimento de tomateiro.

Dentre os genes *SBP/SPL* regulados pós-transcricionalmente pelo miR156 em arabidopsis, descritos na extensa pesquisa realizada por Xu et al. (2016), apenas o gene *SPL6* não apresentou uma função preponderante na morfogênese vegetal, podendo ser importante para outros processos fisiológicos e colocado em um grupo funcional a parte das demais *SBP/SPL* (XU et al., 2016). Diferentemente de arabidopsis, o tomateiro possui três genes homólogos a *SPL6*: *SISBP6a*, *SISBP6b*, *SISBP6c* (SALINAS et al., 2012). Os genes homólogos *SISBP6a* e *SISBP6b* são expressos de forma semelhante, abrangendo quase todos os tecidos vegetais (das sementes aos frutos completamente maduros). Entretanto o gene *SISBP6c* apresenta níveis transcritos concisos em região anatômica precisa, principalmente nos ápices em desenvolvimento inicial e em inflorescências.

A expressão da *SISBP6c* é restrita aos ápices em desenvolvimento (SALINAS et al., 2012), e pode indicar um papel importante da *SISBP6c* na maturação do meristema vegetativo de tomateiro (SILVA et al., 2018). É no ápice que se encontra o meristema apical que ao longo do seu desenvolvimento responde a diversos sinais: hormonais,

genéticos e ambientais resultando nas transições de estágio juvenil a adulto e de vegetativo a reprodutivo.

Novas e complexas interações entre os dados descritos acima estão sendo estudadas, a exemplo, da interação do módulo miR156/*SBPs*, que na indução floral do tomateiro em correlação com a resposta ao hormônio vegetal giberelina (SILVA et al., 2018). Portanto, como hipótese deste trabalho, foi proposto que o gene *S/SBP6c* pode ter adquirido novas funções no desenvolvimento de tomateiro, principalmente em relação ao florescimento e ao desenvolvimento de órgãos laterais como as folhas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular do Desenvolvimento Vegetal, do Departamento de Ciências Biológicas (LCB), na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- ESALQ- USP, com financiamento da agência de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

3.1 Material Vegetal

Os genótipos utilizados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela1. Genótipos utilizados no presente trabalho. A cultivar Micro-Tom (MT), o transgênico resistente ao miR156, 35S::r*SISBP6c*; a planta super expressando o miR156 (SILVA et al., 2014).

Genótipo	Efeito/Função	Acesso	Referências
cvMicro-Tom (MT)	<i>Solanum lycopersicum</i>	LA3911	Scott; Harbaugh, 1995
miR156OE	Plantas de tomateiro cv. MT super-expressando o miR156		Silva et al., 2014
35S::r<i>SISBP6c</i>	Plantas de tomateiro com super expressão da <i>SISBP6c</i> que é resistente a regulação pelo miR156.	Solyc12g038520	Neste trabalho

A cultivar Micro-Tom foi escolhida como planta modelo desta pesquisa devido ao seu porte reduzido, crescimento determinado e ao seu menor ciclo de vida (35 dias). Em relação ao nanismo (pequeno porte) sabe-se que esta característica se deve parcialmente, à deficiência na síntese do hormônio vegetal brassinoesteróide, e ao alelo recessivo *dwarf*, que codifica uma versão defectiva da enzima 6-deoxocastasterona oxidase (citocromo P450; grupo CYP85), responsável pela conversão de 6-deoxocastasterona em castasterona (BISHOP et al., 1999; MARTÍ et al., 2006). O crescimento determinado da cultivar deve-se à presença do alelo recessivo *self-pruning* (*SP*). O gene funcional *self-pruning* é um gene regulatório da família CETS, homólogo ao

gene *terminal flower* (*TF*) de *A. thaliana*, responsável pela repressão do florescimento (MEISSNER et al., 1997; PINO-NUNES et al., 2009; PINO et al., 2010)

A cultivar Micro-Tom foi cedida pelo Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal (ESALQ) e constituiu-se no controle (Tipo selvagem) a planta GM, resistente ao miR156, 35S::*rSISBP6c*, previamente descrita (SILVA et al., 2014). A planta super-expressando o miR156 foi gerada no Laboratório de Genética Molecular do Desenvolvimento Vegetal (ESALQ), por pesquisadores do grupo, e cedida para a pesquisa desta tese.

O transgênico 35S::*rSISBP6c* foi gerado para esta pesquisa pelo Laboratório de Genética Molecular do Desenvolvimento Vegetal (ESALQ) e a transformação realizada conforme a metodologia de Pino et al. (2014). A sequência do precursor do gene *SISBP6c* foi amplificada a partir do DNA genômico do tomate cv. Micro-Tom empregando a Reação em Cadeia de Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR). Os produtos da PCR foram clonados empregando kit de clonagem comercial (pENTR™/D-TOPO™ Cloning Kit, with One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* Invitrogen) e, posteriormente, sequenciados.

Após o sequenciamento, foram realizadas mutações silenciosas no sítio de reconhecimento de miR156, gerando o precursor *rSISBP6c*. Estas mutações não alteram a transcrição do gene, porém impedem a regulação de miR156. Para a obtenção da planta geneticamente modificada 35S::*rSISBP6c*, o gene foi fusionado com o promotor viral 35S e re combinado com o vetor binário pk7WG2, usando o sistema Gateway (de acordo com as instruções do fabricante). O vetor binário portador do 35S::*r* foi transformado em *Agrobacterium tumefaciens* estirpe LBA4404. A transformação do tomateiro foi então realizada de acordo com (PINO et al., 2010).

Figura 3. Mutações silenciosas no sítio de reconhecimento de miR156. (A) Representação da ORF (*Open Reading Frame*) do gene *SISBP6c*, indicando em vermelho o sítio de reconhecimento do miR156. Abaixo se observa a sequência nucleotídica do sítio para o miR156 do gene *SISBP6c* (em tomateiro MT), o qual é alvo do miR156, e a sequência nucleotídica do transgene *rSISBP6c* (contendo mutações silenciosas, em vermelho), a qual não é reconhecida pelo miR156.

Os transformantes foram autopolinizados para obtenção das sementes T₁, que deram sequência à próxima geração T₂. As gerações T₁ e T₂ foram confirmadas quanto à resistência à canamicina, antibiótico de seleção, em casa de vegetação com pulverizações de 400 mg L⁻¹, em plântulas de 14 dias, por 3-5 dias consecutivos. As linhagens confirmadas como transgênicas (#3, #4, #6, #10) após a pulverização com canamicina, foram selecionadas e coletado material para genotipagem via PCR (Figura 4). Posteriormente, foi avaliada a expressão semi-quantitativa de *SISBP6c*, e realizada a caracterização molecular por PCR quantitativo em tempo real (RTq-PCR). Foram selecionadas as linhagens *rSISBP6c* #3 e *rSISBP6c* #6 para as análises morfológicas e fisiológicas. Figura 5.

Figura 4. Confirmação da linhagem transgênica 35S::r*SISBP6c* via PCR e análise semi-quantitativa de seus transcritos, por RT-qPCR. Genotipagem e análise de transcritos do transgene p35S::r*SISBP6c* e análise de expressão dos transcritos totais *SISBP6c* (transcritos endógenos *SISBP6c* + os transcritos do transgene p35S::r*SISBP6c*) em plantas de *Solanum lycopersicum* cultivar Micro-Tom e em um evento transgênico *rSISBP6c* (evento #3 contendo o transgene p35S::r*SISBP6c*). O gene *SlyTUBULIN* (*SlyTUB*) foi utilizado como controle por se tratar de um gene endógeno que possui expressão regular em todos os tecidos.

3.2 Análise filogenética

A análise filogenética foi realizada utilizando o domínio SBP conservado da sequência gênica *SISBP6c*, objeto de estudo desta pesquisa. A sequência de aminoácidos

(**CQVQGC****GD****LT****SC****KDYH****KR****H****KV****CEI****HS****K****TAK****VIV****NG****I****Q****Q****R****F****C****Q****Q****C****S****R****F****H****L****L****A****E****F****D****D****G****K**
R**S****C****R****K****R****L****A****G****H****N****E****R****R****R****K****P**) foi analisada através do programa BLAST® (*Basic Local Alignment Search Tool*) nos seguintes bancos de dados: Sol genomics (solgenomics.net), NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) e TAIR - *The Arabidopsis Information Resource* (www.arabidopsis.org). As sequências de maior similaridade (acima de 70%) foram selecionadas para a análise com a finalidade de determinar o grau de homologia entre elas. As quais foram selecionados como controle negativo da análise filogenética. Como validação estatística foi utilizado o Bootstrap de 100.

3.3 Cultivo das plantas para os experimentos

As plantas de tomateiro cv. Micro-Tom, acesso LA0335, plantas superexpressando miR156 (SILVA et al., 2014) e superexpressando *SISBP6c* foram cultivadas em vasos plásticos de 150 ml, contendo mistura de substrato comercial (Plantmax HT, Eucatex, São Paulo, Brasil); e vermiculita expandida, na proporção 1:1 (Lombardi-Crestana et al., 2012).

Na adubação foi utilizado 1 g de NPK 10:10:10, por litro de substrato, e 4 g de calcário dolomítico ($\text{MgCO}_3 + \text{CaCO}_3$), por litro de substrato. As plantas foram mantidas em casa de vegetação livre de escape, sob irrigação automática (quatro vezes ao dia), a uma temperatura média de 28°C; fotoperíodo de 11,5 / 13 h (inverno / verão), e radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de 250–350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por redução de radiação natural, com tela refletora (Aluminet-Polysack Industrias Ltda., Leme, SP, Brasil).

No estágio de floração (~ 35 dias após a semeadura), foi realizada a suplementação com NPK (~ 0,2 gramas por vaso de 150 ml).

Para a obtenção de sementes, os frutos maduros foram colhidos e a polpa removida por fermentação em 12 horas, utilizando-se levedura comercial de padeiro

(*Saccharomyces cerevisiae*, Fermix, São Paulo, Brasil). Posteriormente, as sementes lavadas, secaram ao ar livre e foram armazenadas a 10 °C.

3.4 Análises Morfológicas e Fisiológicas

Foram utilizadas para as análises morfológicas e fisiológicas os seguintes genótipos: cultivar Micro-Tom controle (tipo selvagem); linhagens transgênicas resistente ao miR156, 35S::*rSISBP6c* (#3, #4, #6); planta super-expressando o miR156 (SILVA et al., 2014).

Figura 5. Representação do eixo principal de *Solanum lycopersicum* cv. tomateiro Micro-Tom. Regiões utilizadas nas análises morfológicas e fisiológicas. Eixos principal, primário e região lateral (RL). Fonte: Adaptado de (VICENTE et al., 2015).

3.5 Análise da Arquitetura Foliar

As folhas do tomateiro são compostas e possuem como característica morfológica uma lâmina foliar subdividida em folíolos. A análise da arquitetura foliar se constituiu de dois experimentos. O primeiro qualitativo: contagem da incidência de recortes acentuados da lâmina foliar na folha II (Figura 6). O segundo quantitativo: número de folíolos por folha. A quantificação do número de folíolos das linhagens transgênicas 35S::*rSISBP6c* em relação a cultivar Micro-Tom foi determinada pela separação dos folíolos individualmente e posterior contagem.

Figura 6. Recorte acentuado nos folíolos da folha II. A) Detalhe comparativo do recorte acentuado na folha II do eixo principal no tomateiro cv. Micro-tom (esquerda) e no transgene *35S::rSISBP6c* linhagem #3 (direita). B) Folíolos que compõem a folha composta do controle Micro-Tom. (A) Folhas do eixo principal no MT. (B) Número de folíolos individualizados, em destaque.

3.6 Determinação Indireta de Clorofila (Índice SPAD)

A determinação indireta da clorofila (unidade SPAD) foi realizada em equipamento SPAD 502 MINOLTA. Oito plantas foram utilizadas para cada genótipo avaliado e avaliadas com medidas compostas de uma média de dez leituras na quinta folha do eixo principal (folha V) excluindo-se a bordadura e nervura central (LAVRES JUNIOR; SANTOS JUNIOR; MONTEIRO, 2010).

3.7 Atividade Fotossintética

As mesmas plantas utilizadas na análise de teor de clorofila foram utilizadas para avaliar a atividade fotossintética. Para tal foram levadas para câmara de crescimento, objetivando a aclimação por 24 h, com temperatura constante de 27° C, intensidade luminosa artificial de 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR e CO_2 atmosférico médio de 350 mg L^{-1} . A atividade fotossintética foi então avaliada no terço médio de cada planta (folhas III-V) excluindo-se a nervura central das mesmas, utilizando o analisador de fotossíntese IRGA WALZ-GFS-3000 de fluorescência de troca gasosa. Foram quantificadas a taxa de assimilação de CO_2 (A), a taxa de transpiração (E), a condutância estomática (CE), a eficiência quântica do fotossistema II (EFSII) e a taxa de transporte de elétrons (TTE). Os dados foram processados pelo software do equipamento e extraídos para análise computacional. As médias das repetições foram utilizadas para gerar os gráficos e estatística (ANOVA).

3.8 Análise de Tempo de Florescimento

Em tomateiro, o tempo de florescimento foi medido de duas formas, pelo número de dias até a antese e pela contagem do número de folhas no eixo principal (SAMACH; LOTAN, 2007). Para este último parâmetro foram semeadas 40 sementes de cada genótipo (Micro-Tom, *rSISBP6c* #3 e *rSISBP6c* #6). Quando 100% das plantas atingiram a antese (por volta dos 70 dias) foi realizada a contagem de folhas no eixo principal.

O tempo de florescimento também foi avaliado em relação ao número de dias até a abertura total das flores presentes na inflorescência, denominado de antese. Para determinar o dia inicial da contagem, as plântulas foram marcadas individualmente com um pequeno palito, quando na emergência do gancho plumular. Este dia sendo considerado o dia 1 na contagem. O tempo de florescimento foi determinado quando 50% das plantas para cada genótipo, atingiram a antese.

3.9 Avaliação da Transição do Meristema Apical

Plântulas de MT e das plantas geneticamente modificadas *rSISBP6c* #3 e *rSISBP6c* #6 foram avaliadas ao 4º e 10º dias após a emergência. Para cada genótipo, foram utilizadas 10 repetições por tempo de avaliação. Os meristemas foram classificados em três categorias de acordo com a sua morfologia: vegetativo, transição e reprodutivo (PARK et al., 2012). A emergência foi demarcada com uma pequena bandeira quando observado a presença do gancho plumular acima do substrato de plantio. A partir dessa data cada planta tinha sua idade contada individualmente. As plântulas foram avaliadas aos 4 e 10 dias após emergência observando-se o estágio de desenvolvimento do meristema (SILVA et al., 2014).

3.10 Extração e análise de RNA total

Foram feitas as extrações de RNA total das diferentes amostras. Que consistiram para o Micro-Tom: folha I, folha III, folha V, inflorescência e ápice caulinar com 4 e 10 dias. E para as linhagens super-expressando o gene *rSISBP6c* foi utilizada a quinta folha.

A coleta foi realizada quando todo o stand de plantas atingiu a antese, entre os 45 a 50 dias após emergência. Foram selecionadas 5 folhas de 5 plantas ao acaso, compondo uma amostra biológica. Foram utilizadas 5 amostras biológicas para cada análise de cada genótipo.

Para cada 1ml de amostra de tecido foi utilizado 1 ml de TRIZOL (Invitrogen). Cada genótipo foi macerado em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido. Após a extração do RNA total, as amostras foram tratadas com 2 μ l de DNase I Amplification Grade (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante para remoção total de DNA genômico. Em seguida foi verificada a integridade das amostras de RNA por verificação de eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com 0,001% (v/v) de brometo de etílio, em tampão de corrida TAE 1x (40mM Tris-acetato; 1mM EDTA) com tensão constante de 130V. A concentração e pureza do RNA foi avaliada por espectrofotometria de absorção no espectro de onda 230\260, utilizando o equipamento Thermo NanoDrop 2000 (Uniscience). Este aparelho analisa amostras de 0,5 a 2 μ L com alta precisão e reprodutibilidade.

3.11 Avaliação da expressão gênica por PCR quantitativo

Foi realizada a análise do acúmulo de mRNA e miRNA maduro como descrito por Silva et al. (2014) e Silva et al. (2018). O reagente adotado nesse experimento foi o Go Taq® qPCR Master Mix (PROMEGA). Os iniciadores específicos estão descritos no Apêndice A. Foram utilizados como controle o gene endógeno Tubulina (*TUB*) (Solyc04g081490) (MOUNET et al., 2009) para análise nos meristemas e o gene endógeno CAC (Solyc08g006960) (EXPOSITO-RODRIGUES et al., 2008) como controle para as análises de expressão nas folhas I, III, V e inflorescências.

Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX para correção de flutuações na leitura decorrentes de variações de volume e evaporação ao longo da reação. O resultado, expresso em valor de CT, se refere ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atinja o limiar de detecção. O cálculo de expressão relativa dos genes de interesse em relação aos genes controle, foram calculados utilizando o valores de variação (Δ) dos CTs obtidos pelo método de 'delta delta Ct' ($\Delta\Delta Ct$) (PFAFFL, 2004).

3.12 Análise Estatística

Os dados obtidos foram testados quanto a homocedasticidade de variância e a distribuição dos dados. As amostras que apresentaram distribuição normal foram analisadas pelo Test-T Student's $p < 0,01$ no programa Assistat versão 7.7 para Windows. Para os dados não paramétricos foi usado o teste de Wilcoxon $p < 0.05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise Filogenética do domínio *SBP* da *SISBP6c*

Com o intuito de avaliar a relação evolutiva da proteína *SISBP6c* com seus homólogos de diversas espécies vegetais, a sequência contida no domínio conservado *SBP* da *SISBP6c* foi utilizada como parâmetro para a construção da árvore filogenética. O filograma gerado (Figura 8) permitiu a identificação de cinco clados baseados nos graus de homologia.

Entre as proteínas homólogas a *SISBP6c*, muitas ainda não possuíam notação, qual seja uma denominação referente à sua homologia. Foram então denominados de *SBP6* precedidos pelo nome da espécie abreviado. Quando duas sequências apresentaram a mesma notação, foram colocadas letras em sequência como sufixo. A exemplo das *SBP6*-like de *Solanum tuberosum* L., as quais foram denominadas para a análise como *StSBP6a* e *StSBP6b*.

No clado I, agruparam-se as *SBP6*-like da família das solanáceas, incluindo as *SISBP6a* e *SISBP6c*. Corroborando com SALINAS et al., 2012 a *SISBP6c* apresentou os maiores graus de homologia com a *StSBP6a* de *S. tuberosum* junto a *SISBP3a* de *Solanum pimpinellifolium* L. Presentes no clado I estão também os demais genes de tomateiro e de tabaco (*Nicotiana benthamiana* L., *Nicotiana tabacum* L. e *Nicotiana glauca* L.) (Figura 7). O clado II, com menor grau de homologia, encontram-se as proteínas *SBP6*-like de espécies diversas como petúnia, algodão, maçã, pepino, feijão, soja. Próximo ao Clado IV, composto por outras *SPLs/SBPs* que não são *SBP6*-like, portanto um clado constituído de *outlayers*, encontra-se o Clado III.

Figura 7. Filograma em destaque do Clado I. Homologia da *SISBP6a* e *SISBP6c* com demais *SBP6s* de solanáceas. Bootstrap de 100.

Evidências filogenéticas indicam que os genes contendo o domínio SBP-box foram submetidos a vários eventos de duplicação ao longo do curso evolutivo, resultando na formação e retenção de múltiplos parálogos e clados *SPL/SBP* (LI et al., 2018; PRESTON; HILEMAN, 2013b). Os genes duplicados são geralmente seguidos por dois tipos de destino: perda de função, ou ganho de função via subfuncionalização ou neofuncionalização (ZHANG et al., 2018).

Dentre os homólogos do gene *SPL6* em tomateiro *SISBP6a*, *SISBP6b* e *SISBP6c*, este último se apresenta em ramificação do Clado I, com seu produto gênico apresentando maior homologia com as proteínas codificadas pelos genes *StSBP6a* e *SISBP3a*. Esta maior distância filogenética parece indicar que o gene *SISBP6c* pode ter sofrido rápida evolução funcional por ser o menos conservado entre os três homólogos da *SBP6-like* de tomateiro e com padrão de expressão diferente (SALINAS et al., 2012). Assim o dado apresentado na Figura 8, sugere que dentre os homólogos das proteínas codificadas pelos genes *SISBP6a*, *SISBP6b* e *SISBP6c* de tomateiro, este último possui características filogenéticas que o tornam candidato a possuir funcionalidade diferente no desenvolvimento vegetal.

4.2 Padrão de expressão do miRNA156 e seus genes alvos *S/ISBP6a*, *S/ISBP6b*, *S/ISBP6c* ao longo do desenvolvimento foliar e nas inflorescências de tomateiro cv. Micro-Tom

Para determinar a possível função do gene *SISBP6c* no desenvolvimento de tomateiro, inicialmente avaliou-se o acúmulo de transcritos ao longo do desenvolvimento foliar e nas inflorescências do tomateiro Micro-Tom. Órgãos vegetais

foram selecionados e coletados para uma ampla amostragem desde a fase vegetativa, constituída pelos órgãos foliares, e a reprodutiva, constituída pela inflorescência. As plantas de tomateiro Micro-Tom produzem em média cinco folhas no seu eixo principal até a formação da primeira inflorescência, assim foram selecionados tecidos contidos nas folhas I, III e V, além da inflorescência. Figura 10.

Figura 9. Desenvolvimento das folhas do Micro-tom. A) Planta de Micro-Tom com 45 dias após semeadura. B) Órgãos vegetais coletados para extração de RNA: Folha I, III e V e inflorescência. ONDE ESTA A ESCALA DA FIGURA?

O miR156 é o regulador pós-transcricional de genes *SISBP* (SALINAS et al., 2012; SILVA et al., 2014). A expressão relativa do miR156 foi analisada e comparada a dos genes *SISBP6a*, *SISBP6b* e *SISBP6c*. Os resultados apresentados na Figura 11C, demonstram que no desenvolvimento inicial do Micro-Tom, o miR156 é expresso em maior quantidade nas folhas I e III. Na folha V, o nível de transcritos do miR156 maduro apresenta queda acentuada, com 50% a menos de expressão. Como o miR156 é um marcador molecular de juvenilidade (Via da idade) (GUO et al., 2017), esses dados sugerem que o tomateiro cv. MT mantém seu estado juvenil até a produção da folha IV, sendo que a presença da folha V indica mudança para a fase adulta. Análises de tipos de tricomas associados a juvenilidade em tomateiro corroboram essa ideia (VENDEMIATTI et al., 2017). Na inflorescência, a expressão do miR156 foi baixa (Figura 10).

Como os níveis do miR156 diminuem ao longo do desenvolvimento foliar e na inflorescência, é possível que os níveis de transcritos dos genes *SISBP6c* aumentem. As Figuras 10B, 10C e 10D apresentam a expressão relativa dos homólogos *SISBP6* de tomateiro.

Figura 10. Análises de RT-qPCR ao longo do desenvolvimento do Micro-tom. A) miR156 B) *SISBP6a* C) *SISBP6b* e D) *SISBP6c*. Médias de mesma letra não diferem entre si pelo teste t a um nível de significância de 5%.

A expressão relativa da *SISBP6a* nas folhas basais (I e III) foi reduzida, não se diferenciando estatisticamente. Porém a partir da folha V ocorreu aumento acentuado de sua expressão, culminando no pico 34 vezes maior da expressão de *SISBP6a* na inflorescência em relação as folhas basais. (Figura 10B)

O gene *SISBP6b* apresentou padrão de expressão menor que o gene *SISBP6a*, sendo que sua expressão não variou entre os órgãos foliares analisados (folhas I, III e V), não diferindo estatisticamente (Figura 10C). Apenas para a inflorescência houve diferença estatística com um aumento de 2 vezes na expressão relativa da *SISBP6b* em relação aos tecidos foliares.

O gene *SISBP6c* apresentou padrão de expressão similar ao de *SISBP6a*. Houve aumento da expressão relativa para o gene *SISBP6c* ao longo do desenvolvimento com pico de expressão nas inflorescências (10 vezes mais transcritos do que na folha I) (Figura 10D). Esses dados corroboram as análises filogenéticas

anteriores em que *SISBP6c* agrupa-se próximo a *SISBP6a*, enquanto *SISBP6b* encontra-se em outro Clado (Figura 7), sugerindo funções diferenciadas de *SISBP6a* e *SISBP6c* no desenvolvimento de tomateiro. Assim, *SISBP6a* aparenta ter função mais marcante no desenvolvimento dos tecidos foliares e de inflorescências. A *SISBP6c* aparenta ter expressão mais branda; entretanto, ambos os genes *SISBP6* apresentam expressão gênica inversamente proporcional à expressão do miR156. O gene *SISBP6b*, o qual seu produto gênico na análise filogenética exibiu maior homologia com *SPL6* de *arabidopsis* (Figura 8), não apresentou padrão de expressão inverso ao miR156 nos tecidos amostrados.

4.3 Perfil de expressão do gene *SISBP6c* no ápice de tomateiro cv. Micro-Tom no quarto e décimo dias após emergência.

O laboratório de genética molecular do desenvolvimento vegetal (GMDV – ESALQ/USP) demonstrou recentemente que a transição do meristema vegetativo para reprodutivo no tomateiro cv. Micro-Tom ocorre entre 4-5 dias após a emergência da plântula. A emergência é demarcada pela presença do gancho plumular acima do substrato de plantio (SILVA et al., 2018). Com o objetivo de avaliar o padrão de expressão do gene *SISBP6c* durante a transição do meristema, análises de RT-qPCR foram realizadas em ápices vegetativos (4 dias após a emergência) e reprodutivos (10 dias após a emergência) de tomateiro Micro-Tom (Figura 11). Os níveis de transcritos de *SISBP6c* são reduzidos no meristema reprodutivo (10 dias após a emergência), embora *SISBP6c* seja altamente expresso em inflorescências desenvolvidas quando comparada a sua expressão em folhas (Figura 11).

Quanto à expressão do gene *SISBP6c* ocorreu um pico de presença de transcritos aos 4 dias, logo no início do desenvolvimento do ápice e, por conseguinte do meristema apical (Figura 11).

Figura 11. Expressão relativa gênica via RT-qPCR da sequência *SISBP6c* ao longo do desenvolvimento inicial de ápices de *Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-tom. Ápices com 4 e 10 dias após emergência. Médias de mesma letra não diferem entre si pelo teste t ao nível de significância de 5%.

Possivelmente a variação na expressão da *SISBP6c* está relacionada a um limiar muito sutil necessário ao Pool de fatores de transcrição regulados pelo miR156. Esse gene pode estar sendo mais expresso no início do desenvolvimento, porém devido aos altos níveis de miR156 ele é rapidamente reprimido.

No décimo dia ocorreu um decréscimo de 50% nos transcritos deste gene. Este dado demonstra que mesmo na presença de altos níveis de expressão do miR156, a *SISBP6c*, aparenta um certo desacoplamento do módulo miR156/*SPB*. Seria esperado que este gene não fosse expresso, ou variasse pouco a sua transcrição devido a regulação do miR156, que é acentuada no desenvolvimento inicial do tomateiro (WANG et al., 2015).

O miR156 possui padrão de acúmulo de transcritos proporcional ao *SISBP6c* durante a transição de fase vegetativa para reprodutiva (SILVA et al., 2018). Como a transição ocorre em um intervalo de 6 dias, o perfil de expressão nos ápices

parece indicar que a atuação da *SISBP6c* possui não só importância local e temporal, mas também é constricta para a transição de fase do meristema.

4.4 Super-expressão da versão resistente ao miR156 do gene *SISBP6c* em tomateiro (*rSISBP6c*)

Com o objetivo de estudar o papel funcional da *SISBP6c* em tomateiro, foi utilizada a metodologia de superexpressão da versão resistente do gene *SISBP6c* ao miR156, controlada pelo promotor viral CaMV35S, o qual consegue induzir a transcrição do gene ao longo de todo o desenvolvimento da planta. Este procedimento possui a vantagem de possibilitar a visualização de uma função gênica, através de mudanças fenotípicas acentuadas pela super-expressão do gene (ZHANG et al., 2011). O gene *SISBP6c* foi mutado no sítio de reconhecimento ao miR156, para que os transcritos gerados pela super-expressão do gene não pudessem ser regulados pelo miR156, acentuando diferenças fenotípicas.

O procedimento de transformação é moroso e pode apresentar falhas, mesmo na inserção do gene (PINO et al., 2010). Assim, a única forma de comprovar que a transformação gênica, para a super expressão deste gene realizada com sucesso, é determinar a quantidade de transcritos em relação a um controle. Nos trabalhos de genética molecular este controle constitui-se da planta modelo utilizada na transformação gênica (SILVA et al., 2014). As plantas geneticamente modificadas de tomateiro cv.MT *p35S::rSISBP6c* (denominadas *rSISBP6c*) foram obtidas pelo laboratório de Genética Molecular do Desenvolvimento Vegetal (GMDV) no trabalho do aluno de doutorado Mike Anderson Corazon Guivin, e foram caracterizadas molecularmente, quanto à expressão relativa do genótipo *rSISBP6c* nesta tese de doutorado.

Figura 12. Genótipos utilizados na análise de expressão do gene *SISBP6c* por RT- q-PCR na quinta folha do eixo principal. A) Planta de Micro-Tom com 45 dias após semeadura. B) Plantas geneticamente modificadas super-expressando a *rSISBP6c* (*35S::rSISBP6c*), linhagens #3, #4 e #6 ao 45 dias após semeadura.

No total, foram geradas cinco linhagens transformadas de tomateiro cv. Micro-Tom *rSISBP6c*, sendo três apresentadas com detalhes neste trabalho (#3, #4 e #6; Figura 12). Cerca de 40 plantas para cada genótipo, incluindo o controle Micro-Tom, foram plantadas para as avaliações. A seleção do tecido a ser avaliado levou em consideração os resultados anteriores (Figura 11). A folha cinco (V) de cada linhagem foi utilizada para a análise de expressão relativa do gene *SISBP6c*.

Figura 13. Relação de transcritos do gene *SISBP6c* na quinta folha do eixo principal de tomateiro cv Micro-Tom. A) Análise de expressão relativa do gene *SISBP6c* na linhagem transformada #3, #4 C) #6. Diferenças estatísticas foram representadas por letras ($p < 0,05$ no teste T).

Todas as linhagens transformadas apresentaram maior quantidade de transcritos em relação ao controle Micro-Tom (Figura 13A). As linhagens *rSISBP6c* #3 e #6 apresentaram padrão de expressão semelhante, com aumento de 8 e 4 vezes mais do que o controle. A linhagem *rSISBP6c* #4 apresentou os maiores valores de

transcritos, com cerca de 24 vezes mais expressão do gene *SISBP6c* (Figura 13B). Para avaliação de fenótipos reproduzíveis em mais de uma linhagem transformada, foram selecionadas as linhagens #3 e #6 com padrões de expressão similares para conduzir os estudos de funcionalidade.

4.5 O aumento da expressão do gene *SISBP6c* influencia na porcentagem de recorte acentuado nos folíolos na segunda folha do eixo principal de tomateiro

A folha do tomateiro é complexa e, portanto, se constitui de pelo menos 5 folíolos cada, no caso do cultivar Micro-Tom (Figura 9). Estes folíolos apresentam um padrão de serrilhamento nas bordas que é uma característica de estágio de desenvolvimento adulto. Este padrão morfológico se consolida por volta da terceira ou quarta folha do eixo principal. A segunda folha apresenta 3 a 4 folíolos e menor incidência de serrilhamento nas bordas foliares.

Entretanto, nas linhagens transformadas super-expressando o *rSISBP6c*, este padrão foi alterado. As primeiras folhas apresentaram folíolos mais serrilhados e com incidência de recorte acentuado, com destaque para a folha II do eixo principal (Figura 14). Metade das plantas das linhagens #3 e #6 apresentaram este tipo recorte pronunciado (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de plantas de *Solanum lycopersicum* L. para genótipos que apresentam recorte acentuado.

Genótipo	Nº total de plantas avaliadas	Nº plantas com folíolos fusionados na folha II	% de Plantas com recorte acentuado folha II
Micro-Tom (MT)	38	5	4,7%
#3	60	31	51,66%
#6	67	47	70,15%
miR156OE^a	11	0	0

^aPlantas de tomateiro cv. MT super-expressando o miR156 (SILVA et al., 2014).

Possivelmente a expressão causada pelo promotor viral 35S, que induz a transcrição do gene no tempo e no espaço, onde normalmente ele não se expressa ou é

pouco expresso, levou a uma alteração no desenvolvimento foliar. Folhas que apresentam folíolos com recorte acentuado são típicas da fase adulta. Assim, a folha II do eixo principal nas linhagens transformadas possui características físicas das plantas adultas, por apresentar recorte acentuado, característica associada a maior complexidade foliar.

Figura 14. Recorte acentuado na segunda folha do eixo principal em folhas de tomateiro, cultivar Micro-Tom, linhagem *rSISBP6c* #3 e *rSISBP6c* #6 com 35 dias após emergência. Setas em vermelho destacam o recorte acentuado na morfologia das folhas.

Nas plantas *miR156OE*, super-expressando o *miR156* em que vários genes *SISBP* estão reprimidos, incluindo *SISBP6c* (SILVA et al., 2014), a folha II não apresenta folíolos recortados ou fusionados (Tabela 2).

4.6 A super-expressão do gene *rSISBP6c* nas linhagens transformadas #3 e #6 aumenta a complexidade foliar na quinta folha do eixo principal.

Como o desenvolvimento dos folíolos foi alterado nas primeiras folhas das plantas super-expressando o gene *SISBP6c* (Figura 14), é possível que a complexidade foliar também tenha sido modificada. A complexidade foliar em folhas compostas pode ser determinada pelo número de folíolos produzidos (SLUIS; HAKE, 2015). Para determinar se ocorre alteração da complexidade foliar, folhas das linhagens transgênicas #3 e #6 e de plantas de tomateiro cv. Micro-Tom foram analisadas para a quantidade de folíolos. Foram selecionadas a quinta e última folha do eixo principal do Micro-Tom que possui em média 5 folíolos (Figura 15B).

O dado anterior corrobora as linhagens transgênicas #3 e #6 apresentaram um maior número de folíolos (Figura 15B). A partir da quinta folha no eixo principal, os transgênicos #3 e #6, apresentam folhas mais complexas, com maior número de folíolos por folha. A Figura 17A, apresenta a sequência de folhas do eixo principal de cada genótipo analisado. O Micro-Tom apresenta 5 folhas, enquanto ambas as linhagens super-expressando a *rSISBP6c* possuem números mais elevados com 7 a 8 folhas. Mesmo quando avaliada a quinta folha (V), presente em todos os genótipos, o número de folíolos foi significativamente maior nas linhagens #3 e #6 (Figura 15A). O número de folíolos na quinta folha apresenta diferença estatística significativa. Enquanto a quinta folha do Micro-Tom possui em média 5 folíolos, as linhagens transformadas *rSISBP6c* #3 e *rSISBP6c* #6 possuem entre 6 e 7 folíolos.

Figura 15. A) Folíolos destacados para análise quantitativa, B) Avaliação da complexidade foliar da quinta folha do eixo principal em *Solanum lycopersicum* L. cultivar Micro-Tom e nas linhagens transgênicas 35S::*rS/SBP6c* #3 e #6. Médias de mesma letra não diferem entre si pelo teste t ao nível de significância de 5%.

A super-expressão da *rSISBP6c* aumenta a complexidade foliar contribuindo para um maior número de folíolos por folha no eixo principal, bem como recortes acentuados nas folhas basais.

4.7 Super-expressão do gene *SISBP6c* promove redução do acúmulo de transcritos do miR156 nas folhas adultas.

Como demonstrado na Figura 11, a expressão do miR156 no Micro-Tom, é alta em folhas jovens, mas é reduzida em folhas adultas, embora ainda haja transcritos detectáveis do miR156 na folha adulta V. Para determinar a possível base molecular das modificações no desenvolvimento foliar associadas a super-expressão do gene *rSISBP6c* (Figura 16), o acúmulo de transcritos do miR156 foi avaliado na V folha das linhagens transformadas *rSISBP6c* e comparadas ao controle. Todas as linhagens transformadas analisadas apresentaram expressão relativa do miR156 menores do que o Micro-Tom na folha V.

Figura 16. Análise de RT-qPCR do miR156 na quinta (V) folha do eixo principal. A) Planta de Micro-Tom com 45 dias após semeadura. B) Plantas transformadas super expressando *rSISBP6c* (35S::rSISBP6c), linhagens #3, #4 e #6, com 45 dias após semeadura. C) Análise de expressão relativa do miR156 na linhagem transformada #3. D) Análise de expressão relativa do fator de transcrição miR156 na linhagem transformada #4. E) Análise de expressão relativa do fator de transcrição miR156 na linhagem transformada #6. Diferenças estatísticas foram representadas por letras. ($p < 0,05$).

O aumento de *SISBP6c* pode ter levado ao controle negativo do acúmulo do miR156. Este provavelmente é um efeito indireto, provavelmente causado pela aceleração do estágio adulto das folhas II, maior recorte foliar (Tabela 10), e folha V das linhagens transformadas. Entretanto, é também possível que *SISBP6c* regule negativamente o miR156 de forma direta, o que ocorre para outros microRNAs e seus genes-alvos (GUO et al., 2017).

4.8 A super-expressão do gene *rSISBP6c* nas linhagens transformadas #3 e #6 aumenta a taxa fotossintética do tomateiro

Os órgãos foliares se constituem nas principais estruturas fotossintetizantes das plantas e atuam como relevante órgão de interação entre ambiente biótico e abiótico que permeia a parte aérea dos vegetais (EFRONI; ESHED; LIFSCHITZ, 2010). Folhas que apresentam área foliar maior tendem a possuir maior taxa fotossintética. Os resultados anteriores de complexidade foliar sugerem que as folhas das linhagens transformadas *rSISBP6c* possuem uma quantidade maior de folíolos e assim uma área de absorção luminosa maior.

Com isso, apresenta-se hipótese de que possivelmente esse incremento na área foliar pode refletir em efeito na taxa fotossintética do tomateiro. Foram então analisadas a quinta folha do eixo principal de cada genótipo estudado para os parâmetros fisiológicos: teor de clorofila e taxa de absorção de CO₂.

Figura 17. Teor relativo de clorofila na cultivar de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) Micro-Tom e nas linhagens transformadas 35S::rSISBP6c #3 e #6. Médias de mesma letra não diferem entre si pelo teste t ao nível de significância de 5%.

Figura 18. Fotossíntese líquida ou taxa de assimilação de CO₂ na cultivar de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) Micro-Tom e nas linhagens transformadas 35S::rSISBP6c #3 e #6. Médias de mesma letra não diferem entre si pelo teste t ao nível de significância de 5%.

Os dados apresentados nas Figura 17 e Figura 18 se complementam e demonstram que a maior quantidade de folíolos por folha pode ter levado a uma maior captação de luz, e maiores taxas fotossintéticas com maior absorção de CO₂ nas plantas

que super expressam o gene *rSISBP6c*. Entretanto, estudos mais detalhados precisam ser realizados para corroborar a correlação entre aumento de complexidade foliar e fotossíntese nas linhagens transformadas *rSISBP6c*.

4.9 A super expressão do gene *rSISBP6c* atrasa o florescimento nas linhagens transformadas em relação ao tomateiro cv. Micro-Tom.

O número de folhas, parâmetro também importante para determinar o tempo de florescimento, foi alterado pela super-expressão de *rSISBP6c* (Figura 19). Portanto, o número de folhas até o aparecimento da primeira inflorescência foi avaliado nas linhagens *rSISBP6c* e tomateiro MT. Os resultados apresentados na Figura 20B, demonstram diferença estatística significativa entre as linhagens transformadas e o Micro-Tom em termos de dias até a antese. As plantas transformadas apresentaram, em média de 8 a 9 folíolos no eixo principal. O controle apresentou, em média, 5 folhas no eixo principal (Figura 20A). Os resultados indicam um atraso no florescimento nas linhagens transformadas, visto que as plantas produziram mais folhas na fase vegetativa antes de realizar a transição para a fase reprodutiva.

Figura 19. Média do número de folhas no eixo principal até a primeira inflorescência em Micro-Tom e nas linhagens transformadas 35S::rSISBP6c #3 e #6. Folhas em destaque. Número de dias até a antese no Micro-Tom e nas linhagens que super expressam a rSISBP6c. Estabelecido quando 50% das plantas apresentam a 1ª flor em antese. Médias de mesma letra não diferem entre si pelo teste t ao nível de significância de 5%.

Para validar essa hipótese foi realizado um segundo experimento visando a contagem temporal de dias até a antese, que consiste na abertura total dos órgãos

florais. A Figura 19B apresenta o número de dias necessário para que 50% das plantas amostradas ($n=20$) atingissem a antese. As linhagens que super expressam o gene *rSISBP6c* possuem contagem de dias semelhante, com atraso de quase 2 semanas no florescimento em comparação as plantas de tomateiro cv. Micro-tom.

Este atraso de florescimento, porém, não interfere na quantidade de flores por inflorescência. A Figura 20 demonstra que não houve diferença estatística entre o Micro-Tom e as linhagens transgênicas em termos de número de flores por inflorescência.

Figura 20. Média do número de flores por inflorescência no Micro-Tom e nas linhagens transgênicas 35S::r*SISBP6c* #3 e #6. Médias de mesma letra não diferem entre si pelo teste t ao nível de significância de 5%.

É interessante ressaltar que o papel da *SISBP6c* parece ter influência nas etapas de desenvolvimento inicial dos tecidos e órgãos vegetais. O padrão de expressão da *SISBP6c* em MT aumenta ao longo do desenvolvimento (Figura 11D), com pico de expressão na inflorescência, porém nada se evidencia de alteração nessa estrutura. Assim, sugere-se que no Micro-Tom o aumento da *SISBP6c* se deve à queda de expressão do miR156, porém este aumento tardio não parece ter influência nessa fase do desenvolvimento.

A super-expressão da *rSISBP6c* aumenta a complexidade foliar contribuindo para um maior número de folíolos por folha no eixo principal, bem como recortes acentuados nas folhas basais. Possivelmente os transcritos em maior quantidade da *rSISBP6c* no meristema apical estariam atrasando a transição de fase. O tempo de florescimento e a complexidade foliar são parâmetros morfológicos que dependem da transição de fase vegetativa para a reprodutiva que ocorre no meristema.

4.10 Transição do meristema apical vegetativo para reprodutivo em plantas Micro-Tom (MT) e nas linhagens transformadas #3 e #6

A maturação do ápice caulinar pode ser acompanhada pelas alterações morfológicas e moleculares que definem os principais estágios de transição: meristema vegetativo, meristema de transição e meristema reprodutivo (contendo o meristema de inflorescência e os meristemas florais) (PARK et al., 2012; SILVA et al., 2018; Figura 21C). Para estabelecer se o aumento de expressão de *SISBP6c* leva ao atraso na maturação do meristema apical (PARK et al., 2012) e, conseqüentemente, atraso na transição do ápice vegetativo para o ápice reprodutivo, os diferentes tipos de meristemas (vegetativo, transição e reprodutivo) foram acessados no tomateiro Micro-Tom e nas linhagens transformadas #3 e #6 (Figura 21). O meristema do Micro-Tom e das linhagens transformadas foram avaliadas em dois períodos, aos 4 e 10 dias após emergência do gancho plumular, como descrito (SILVA et al., 2018). Aos 4 dias após emergência, as plantas Micro-Tom apresentaram 60% de meristemas vegetativos e 40% de meristemas em transição. E aos 10 dias após emergência, 100% dos meristemas apresentavam-se em estágio reprodutivo (Figura 21C). Por outro lado, as linhagens transformadas #3 e #6 apresentaram apenas meristemas vegetativos em 4 dias após emergência (Figura 21B), e somente iniciando a transição do meristema aos 10 dias após a emergência do gancho plumular (Figura 21C). Os resultados sugerem que a desregulação da expressão de *SISBP6c* leva ao atraso do florescimento devido sua influência direta na transição de fase vegetativa para a reprodutiva.

Entretanto, este resultado foi inesperado, visto que o aumento de expressão de várias *SBP/SPL* leva a promoção do florescimento, e não ao seu atraso (SILVA et al., 2014). Por exemplo, o aumento de expressão de *SPL3*, *SPL4*, *SPL5*, *SPL9*, *SPL15*, e *SPL10* leva a uma aceleração da transição de fase juvenil para a adulta

e aceleração da transição de fase vegetativa para reprodutiva (JUNG et al., 2016). O único exemplo de gene SPL que pode atrasar a mudança de fase juvenil-adulta é o gene *SPL14* em *arabidopsis* (STONE et al., 2005). A perda de função de *SPL14* leva a aceleração de mudança de fase juvenil para a adulta, mas ao mesmo tempo atrasa o florescimento (STONE et al., 2005). A causa molecular destas alterações não foi ainda elucidada, mas a análise do mutante *sp/14* de *arabidopsis* sugere que algumas *SBP/SPL* podem ter funções divergentes durante o desenvolvimento.

No caso de *SISBP6c*, possivelmente este fator de transcrição atue negativamente na regulação dos efetores do florescimento, como o miR172 e o gene da família MADS-box como o *APETALA1/MACROCALLYX* em tomateiro (SILVA et al., 2018).

A **B** **C**

Figura 21. Padrão de desenvolvimento meristemático de plântulas de tomateiro MT. A-C) meristemas representativos dos estágios de desenvolvimento avaliados. D) imagem representativa do primeiro dia de desenvolvimento. E) Frequência do estado meristemático de ápices de plântulas MT e e das linhagens transformadas 35S::rSISBP6c #3 e #6 ao longo do desenvolvimento do 4o ao décimo dia após germinação. Foram avaliadas 18 plântulas para cada genótipo em cada tempo de desenvolvimento.

O número de ápices contendo verticilos florais desenvolvidos ou em desenvolvimento foi também avaliado nas plantas MT e nas linhagens transformadas #3 e #6 (Figura 22). Em ápices de plântulas MT aos 10 dias após emergência, 92% das plântulas apresentaram ápices com verticilos florais desenvolvidos. As plântulas super-expressando o gene *SISBP6c* apresentaram de 25%-41% de ápices com verticilos florais desenvolvidos. O atraso na transição causado pelo aumento nos níveis de *SISBP6c* levou a um atraso na formação dos verticilos florais.

O gene *SISBP6c* possui papel importante na transição da fase vegetativa para reprodutiva no meristema de tomateiro. A super-expressão da *rSISBP6c* atrasa este tempo de transição. Esta maior janela morfogênética permite que os órgãos gerados no meristema tenham mais tempo para se desenvolver e modulação temporal altera profundamente o desenvolvimento do tomateiro. Em estádios mais iniciais os primórdios foliares são afetados por eventos que ocorrem em três fases contínuas que se sobrepõem: iniciação; morfogênese primária (MP), também denominada de morfogênese, onde a lâmina é iniciada e as estruturas marginais da folha tais quais folíolos, lóbulos e serrações são formados; e morfogênese secundária (MS), também denominada de diferenciação, na qual a área foliar cresce substancialmente, os tecidos maturam e se diferenciam (Maya Bar e Naomi Ori, 2015). O prolongamento dessas etapas permite que a morfogênese primária e secundária aumentem a quantidade de estruturas geradas, o que, por conseguinte aumenta a complexidade foliar.

Figura 22. Desenvolvimento dos verticilos florais em *Solanum lycopersicum* L. cultivar Micro-Tom e nas linhagens transformadas #3 e #6 aos 10 dias após emergência. A) Ápices de Micro-Tom. B) Ápices da linhagem 35S::rSISBP6c #3. C) Ápices da linhagem 35S::rSISBP6c #6. Setas em destaque apontam para verticilos florais em estágio de desenvolvimento avançado em relação aos demais.

Este aumento na complexidade foliar ocasionou um aumento na produtividade fotossintética na quinta folha. Demonstrou também que a fase vegetativa foi prolongada atrasando o florescimento. O maior número de folhas no eixo principal e de dias até antese foram dois parâmetros interdependentes que sugerem o papel da *SISBP6c* nesse atraso na transição de fase. Entretanto por não alterar o número de flores e não ter sido observados alterações perceptíveis na inflorescência, permite alocar a atuação do fator de transcrição *SISBP6c* no meristema e que este modula a transição da fase vegetativa-reprodutiva.

Este padrão funcional ao longo do desenvolvimento do tomateiro ainda não foi descrito para as *SBP6*-like. E dentre as *SISBP6*s a análise filogenética, figura 9, demonstrou que dentre os homólogos estudados a *SISBP6b* obteve grande similaridade filogenética com a *SPL6* de *A. thaliana*. (XU et al., 2016).

Os dados obtidos nesta pesquisa, sobre a caracterização funcional da *SISBP6c*, sugerem que o gene *SISBP6c* (e talvez o *SISBP6a*) tenham novas funções no desenvolvimento, e provavelmente específicas para algumas espécies vegetais, tais como tomateiro. Comparadas com *SISBP6b*, os fatores de transcrição *SISBP6a* e *SISBP6c* são distantes filogeneticamente da *SPL6* de *arabisopsis*, a qual não possui funções claras no desenvolvimento. É possível que os genes *SISBP6a* e *SISBP6c* sejam duplicações recentes de *SISBP6b*. Entretanto, estudos filogenéticos mais detalhados precisam ser realizados. Por fim, o aumento de expressão do gene *SISBP6c* promove atraso na transição do meristema apical vegetativo para o reprodutivo, atrasando o florescimento. O *SISBP6c* parece atuar também no controle da complexidade foliar e na taxa fotossintética. Para confirmar tais achados, trabalhos futuros serão realizados utilizando mutantes de tomateiro com perda de função para o gene *SISBP6c* utilizando a metodologia CRISPR/Cas9 (LIU et al., 2017). Esta estratégia pode auxiliar a desvendar como as vias gênicas reguladas pelo módulo *miR156/SBP/SPL* se alteram de acordo com a expressão do fator de transcrição *SISBP6c*. O que pode trazer novos avanços na área da genética molecular do desenvolvimento vegetal.

5. CONCLUSÕES

- Os genes *SISBP6a* e *SISBP6c* são semelhantes no padrão de expressão gênica ao longo do desenvolvimento do tomateiro cv. Micro-Tom. Bem como na homologia das proteínas que estes genes codificam, indicando uma possível similaridade funcional.

- O gene *SISBP6c* possui influência na complexidade foliar, no teor relativo de clorofila e na fotossíntese líquida. Estes parâmetros morfo-fisiológicos foram incrementados nas linhagens transgênicas *35S::rSISBP6c*. Estas características indicam que as folhas avaliadas apresentam características adultas mais acentuadas.

- Os níveis de miR156 são regulados negativamente nas linhagens transgênicas *35S::rSISBP6c*. Por ser um marcador de juvenilidade, níveis baixos de miR156 são características de órgãos foliares em estágio de desenvolvimento mais avançado.

- Os resultados demonstram que o gene *SISBP6c* influencia o desenvolvimento inicial do meristema do tomateiro atrasando o estágio reprodutivo e altera características de juvenilidade nos órgãos foliares.

- O gene *SISBP6c* se constitui, portanto como um candidato, dentre os homólogos *SISBP6* de tomateiro, a ter ganho de função em um processo de neofuncionalização ao longo do curso evolutivo de membros da família Solanaceae.

REFERÊNCIAS

ABE, M.; KOBAYASHI, Y.; YAMAMOTO, S.; DAIMON, Y.; YAMAGUCHI, A.; IKEDA, Y.; ICHINOKI, H.; NOTAGUCHI, M.; GOTO, K.; ARAKI, T. FD, a bZIP Protein Mediating Signals from the Floral Pathway Integrator FT at the Shoot Apex. **Science**, v. 309, p. 1052–1055, 2005.

AUKERMAN, M. J.; SAKAI, H. Regulation of Flowering Time and Floral Organ Identity by a MicroRNA and Its APETALA2 -Like Target Genes. **The Plant cell**, v. 15, n. November, p. 2730–2741, 2003.

AUNG, B.; GRUBER, M. Y.; HANNOUFA, A. The MicroRNA156 system: A tool in plant biotechnology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. BABD1500120, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818115001048>>

BISHOP, G. J.; NOMURA, T.; YOKOTA, T.; HARRISON, K.; NOGUCHI, T.; FUJIOKA, S.; TAKATSUTO, S.; JONES, J. D.; KAMIYA, Y. The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 4, p. 1761–1766, 1999.

BURKO, Y.; SHLEIZER-BURKO, S.; YANAI, O.; SHWARTZ, I.; ZELNIK, I. D.; JACOB-HIRSCH, J.; KELA, I.; ESHED-WILLIAMS, L.; ORI, N. A Role for APETALA1/FRUITFULL Transcription Factors in Tomato Leaf Development. **The Plant Cell**, v. 25, n. 6, p. 2070–2083, 2013. Disponível em: <<http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.113.113035>>

CHEN, C.; ZENG, Z.; LIU, Z.; XIA, R. Small RNAs, emerging regulators critical for the development of horticultural traits. **Horticulture Research**, v. 5, n. 1, p. 63, 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41438-018-0072-8>>

CHEN, X. microRNA biogenesis and function in plants. **FEBS Letters**, v. 579, n. 26, p. 5923–5931, 2005.

CHITWOOD, D. H.; SINHA, N. R. Plant development: Small RNAs and the metamorphosis of leaves. **Current Biology**, v. 24, n. 22, p. R1087–R1089, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.10.013>>

CHITWOOD, D. H.; SINHA, N. R. Evolutionary and Environmental Forces Sculpting Leaf Development. **Current Biology**, v. 26, n. 7, p. R297–R306, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2016.02.033>>

DEBERNARDI, J. M.; RODRIGUEZ, R. E.; MECCHIA, M. A.; PALATNIK, J. F. Functional specialization of the plant miR396 regulatory network through distinct microRNA-target interactions. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 1, 2012.

EFRONI, I.; ESHED, Y.; LIFSCHITZ, E. Morphogenesis of Simple and Compound Leaves: A Critical Review. **Plant Cell**, v. 22, n. 4, p. 1019–1032, 2010. Disponível em:

<<http://www.plantcell.org/cgi/content/abstract/22/4/1019%5Cnhttp://www.plantcell.org/cgi/content/full/22/4/1019>>

FERNANDEZ, A. I.; VIRON, N.; ALHAGDOW, M.; KARIMI, M.; JONES, M.; AMSELLEM, Z.; SICARD, A.; CZEREDNIK, A.; ANGENENT, G.; GRIERSON, D.; MAY, S.; SEYMOUR, G.; ESHED, Y.; LEMAIRE-CHAMLEY, M.; ROTHAN, C.; HILSON, P. Flexible Tools for Gene Expression and Silencing in Tomato. **Plant Physiology**, v. 151, n. 4, p. 1729–1740, 2009. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.109.147546>>

FORNARA, F.; COUPLAND, G. Plant Phase Transitions Make a SPLash. **Cell**, v. 138, n. 4, p. 625–627, 2009.

GUO, C.; XU, Y.; SHI, M.; LAI, Y.; WU, X.; WANG, H.; ZHU, Z.; POETHIG, R. S.; WU, G. Repression of miR156 by miR159 Regulates the Timing of the Juvenile-to-Adult Transition in Arabidopsis. **The Plant Cell**, p. tpc.00975.2016, 2017. Disponível em:

<<http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.16.00975%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28536099>>

HULTQUIST, J. F.; DORWEILER, J. E. Feminized tassels of maize mop1 and ts1 mutants exhibit altered levels of miR156 and specific SBP-box genes. **Planta**, v. 229, n. 1, p. 99–113, 2008.

JIN, D.; WANG, Y.; ZHAO, Y.; CHEN, M. MicroRNAs and their cross-talks in plant development. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 40, n. 4, p. 161–170, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgg.2013.02.003>>

JUNG, J.; LEE, H.; RYU, J. Y.; PARK, C. SPL3 / 4 / 5 Integrate Developmental Aging and Photoperiodic Signals into the FT-FD Module in Arabidopsis Flowering. **Molecular Plant**, v. 9, n. 12, p. 1647–1659, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2016.10.014>>

KLEIN, J.; SAEDLER, H.; HUIJSER, P. A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene *SQUAMOSA*. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 250, n. 1, p. 7–16, 1996. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF02191820>>

LAVRES JUNIOR, J.; SANTOS JUNIOR, J. de D. G. Dos; MONTEIRO, F. A. Nitrate reductase activity and spad readings in leaf tissues of guinea grass submitted to nitrogen and potassium rates. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 3, p. 801–809, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832010000300022&lng=en&tlng=en>

LEE, J. H.; KIM, J. J.; AHN, J. H.; LEE, J.; KIM, J. J. gene of miR156-SPL3-FT circuitry in ambient temperature-responsive flowering Role of SEPALLATA3 (SEP3) as a downstream gene of miR156-SPL3-FT circuitry in ambient temperature-responsive flowering. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 9, p. 1151–1154, 2012.

LEI, K.; LIN, Y.; REN, J.; BAI, L.; MIAO, Y.; AN, G.; SONG, C. Modulation of the Phosphate-Deficient Responses by MicroRNA156 and its Targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 3 in Arabidopsis. **Plant & cell physiology**, v. 57, n. December 2015, p. 192–203, 2016.

LI, X.-Y.; LIN, E.-P.; HUANG, H.-H.; NIU, M.-Y.; TONG, Z.-K.; ZHANG, J.-H. Molecular Characterization of SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Gene Family in Betula luminifera. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. May, p. 1–17, 2018. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2018.00608/full>>

LIU, H.; YU, H.; TANG, G.; HUANG, T. Small but powerful: function of microRNAs in plant development. **Plant Cell Reports**, v. 37, n. 3, p. 515–528, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00299-017-2246-5>>

LIU, X.; WU, S.; XU, J.; SUI, C.; WEI, J. Application of CRISPR/Cas9 in plant biology. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, n. 3, p. 292–302, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2017.01.002>>

LOMBARDI-CRESTANA, S.; AZEVEDO, M. da S.; SILVA, G. F. F.; PINO, L. E. P.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; FIGUEIRA, A.; NOGUEIRA, F. T. S.; PERES, L. E. P. **The tomato (Solanum lycopersicum cv Micro-Tom) natural genetic variation Rg1 and the DELLA mutant procera control the competence necessary to form adventitious roots and shoots.** Journal of Experimental Botany, v. 63, n. 2, p. 695–709, 2012.

MARQUES, E. S. **Caracterização funcional da via miR159/SlyGAMYB-like ao longo do processo de frutificação em tomateiro (Solanum lycopersicum L.).** 2016. UNESP, 2016.

MARQUES, M. S. E.; GICELA, M. S. E.; MOREA, O.; HERNÁN, C.; ROJAS, B.; FÁBIO, P.; SILVEIRA, T. **MicroRNAs e desenvolvimento vegetal** Capítulo. p. 1–28, 2016.

MARTÍ, E.; GISBERT, C.; BISHOP, G. J.; DIXON, M. S.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J. L. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. **Journal of experimental botany**, v. 57, n. 9, p. 2037–47, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16687436>>. Acesso em: 30 nov. 2014.

MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYATUV, S.; SHALEV, G.; ASHRI, A.; ELKIND, Y.; LEVY, A. A new model system for tomato genetics. **The Plant cell**, v. 12, p. 1465–1472, 1997.

MOUNET F, MOING A, GARCIA V, PETIT J, MAUCOURT M, DEBORDE C, BERNILLON S, LE GALL G, COLQUHOUN I, DEFERNEZ M, ET AL. 2009. Gene and metabolite regulatory network analysis of early developing fruit tissues highlight new candidate genes for the control of tomato fruit composition and development. **Plant Physiology** 149: 1505–1528.

BAR, M.; ORI, N. Compound leaf development in model plant species. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 23, p. 61–69, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2014.10.007>>

NOZAWA, M.; MIURA, S.; NEI, M. Origins and evolution of microRNA genes in plant species. **Genome Biology and Evolution**, v. 4, n. 3, p. 230–239, 2012.

PARK, S. J.; JIANG, K.; SCHATZ, M. C.; LIPPMAN, Z. B. Rate of meristem maturation determines inflorescence architecture in tomato. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 2, p. 639–644, 2012. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1114963109>>

PFAFFL, M. W. Relative quantification. In: **Real-time PCR**. p. 63–82.

PINO-NUNES, L. E.; DE, A. V.; NETO, A. T.; ZSÖGÖN, A.; PIOTTO, F. A.; SILVA, J. A.; BERNARDI, W. F.; PERES, L. E. P. Induced mutagenesis and natural genetic variation in tomato “micro-tom”. **Acta Horticulturae**, v. 821, p. 63–72, 2009.

PINO, L. E.; LOMBARDI-CRESTANA, S.; AZEVEDO, M. S.; SCOTTON, D. C.; BORGIO, L.; QUECINI, V.; FIGUEIRA, A.; PERES, L. E. P. The Rg1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato ‘Micro-Tom’ model system. **Plant Methods**, v. 6, n. 1, p. 23, 2010.

PRESTON, J. C.; HILEMAN, L. C. Functional Evolution in the Plant SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Gene Family. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, 2013. a. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2013.00080/abstract>>

PRESTON, J. C.; HILEMAN, L. C. Functional Evolution in the Plant SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Gene Family. **Frontiers in plant science**, v. 4, n. April, p. 80, 2013. b. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3617394&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

RUBIO-SOMOZA, I.; ZHOU, C. M.; CONFRARIA, A.; MARTINHO, C.; VON BORN, P.; BAENA-GONZALEZ, E.; WANG, J. W.; WEIGEL, D. Temporal control of leaf complexity by miRNA-regulated licensing of protein complexes. **Current Biology**, v. 24, n. 22, p. 2714–2719, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.058>>

SALINAS, M.; XING, S.; HÖHMANN, S.; BERNDTGEN, R.; HUIJSER, P. Genomic organization, phylogenetic comparison and differential expression of the SBP-box family of transcription factors in tomato. **Planta**, v. 235, n. 6, p. 1171–1184, 2012.

SAMACH, A.; LOTAN, H. The Transition to Flowering. **Plant Biotechnology Journal**, v. 24, p. 71–82, 2007. Disponível em: <<http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.10.12.1973>>

SCOTT, J. W.; HARBAUGH, B. K. ‘ Micro-Gold ’ Miniature Dwarf Tomato. **HortScience**, v. 30, n. 3, p. 643–644, 1995.

SILVA, E. M.; SILVA, G. F. F.; BIDOIA, D. B.; AZEVEDO, M. da S.; JESUS, F. A.; PINO, L. E.; PERES, L. E. P.; CARRERA, E.; LÓPEZ-DÍAZ, I.; NOGUEIRA, F. T. S. microRNA159-target SIGAMYB transcription factors are required for fruit set in tomato. **The Plant Journal**, v. 92, n. 10, p. 95–109, 2017.

SILVA, G. F. F. E.; SILVA, E. M.; DA SILVA AZEVEDO, M.; GUIVIN, M. A. C.; RAMIRO, D. A.; FIGUEIREDO, C. R.; CARRER, H.; PERES, L. E. P.; NOGUEIRA, F. T. S. MicroRNA156-targeted SPL/SBP box transcription factors regulate tomato ovary and fruit development. **Plant Journal**, v. 78, n. 4, p. 604–618, 2014.

SILVA, G. F. F.; SILVA, E. M.; CORREA, J. P. O.; VICENTE, M. H.; JIANG, N.; NOTINI, M. M.; JUNIOR, A. C.; JESUS, F. A. De; CASTILHO, P.; LOPES-DIAZ, I.; GROTEWOLD, E.; PERES, L. E. P.; NOGUEIRA, F. T. S.; AGRICULTURA, E. S. De; PAULO, S.; AGRICULTURA, E. S. De. Tomato floral induction and flower development are orchestrated by the interplay between gibberellin and two unrelated microRNA-controlled modules. **New Phytologist**, n. September, p. 0–3, 2018.

SLUIS, A.; HAKE, S. Organogenesis in plants: Initiation and elaboration of leaves. **Trends in Genetics**, v. 31, n. 6, p. 300–306, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2015.04.004>>

TAIZ L, ZEIGER E. **Plant physiology**. 4th ed. Sunderland: Sinauer Associates; 2010.

TOUSI, N.; EINI, O.; AHMADVAND, R.; CARRA, A.; MIOZZI, L.; NORIS, E.; ACCOTTO, G. P. In silico prediction of miRNAs targeting ToLCV and their regulation in susceptible and resistant tomato plants. **Australasian Plant Pathology**, v. 46, n. 4, p. 379–386, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13313-017-0500-5>>

VENDEMIATTI, E.; ZSÖGÖN, A.; SILVA, G. F. F. e.; DE JESUS, F. A.; CUTRI, L.; FIGUEIREDO, C. R. F.; TANAKA, F. A. O.; NOGUEIRA, F. T. S.; PERES, L. E. P. Loss of type-IV glandular trichomes is a heterochronic trait in tomato and can be reverted by promoting juvenility. **Plant Science**, v. 259, p. 35–47, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.03.006>>

VICENTE, M. H.; ZSÖGÖN, A.; DE SÁ, A. F. L.; RIBEIRO, R. V.; PERES, L. E. P. Semi-determinate growth habit adjusts the vegetative-to-reproductive balance and increases productivity and water-use efficiency in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Journal of Plant Physiology**, v. 177, p. 11–19, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2015.01.003>>

VOINNET, O. Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 669–687, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.046>>

WANG, T.; LI, R.; WEN, L.; FU, D.; ZHU, B.; LUO, Y.; ZHU, H. Functional analysis and RNA sequencing indicate the regulatory role of argonaute1 in tomato compound leaf development. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–16, 2015.

WENG, L.; BAI, X.; ZHAO, F.; LI, R.; XIAO, H. Manipulation of flowering time and branching by overexpression of the tomato transcription factor SIZFP2. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 12, p. 2310–2321, 2016.

XIE, K. Genomic Organization, Differential Expression, and Interaction of SQUAMOSA Promoter-Binding-Like Transcription Factors and microRNA156 in Rice. **Plant Physiology**, v. 142, n. 1, p. 280–293, 2006. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.106.084475>>

XIE, K.; SHEN, J.; HOU, X.; YAO, J.; LI, X.; XIAO, J.; XIONG, L. Gradual Increase of miR156 Regulates Temporal Expression Changes of Numerous Genes during Leaf Development in Rice. **Plant Physiology**, v. 158, n. 3, p. 1382–1394, 2012.

XU, M.; HU, T.; ZHAO, J.; PARK, M.-Y.; EARLEY, K. W.; WU, G.; YANG, L.; POETHIG, R. S. Developmental Functions of miR156-Regulated SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Genes in *Arabidopsis thaliana*. **PLOS Genetics**, v. 12, n. 8, p. 10–29, 2016. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1006263>>

YANG, Z.; WANG, X.; GU, S.; HU, Z.; XU, H.; XU, C. Comparative study of SBP-box gene family in *Arabidopsis* and rice. **Gene**, v. 407, n. 1–2, p. 1–11, 2008.

ZHANG, L.; HU, Y. Involvement of miR156 in the Regulation of Vegetative Phase Change in Plants. **J. AMER.SOC.HORT.SCI.**, v. 140, n. 5, p. 387–395, 2015.

ZHANG, X.; ZOU, Z.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; HAN, Q.; HU, T.; XU, X.; LIU, H.; LI, H.; YE, Z. Over-expression of sly-miR156a in tomato results in multiple vegetative and reproductive trait alterations and partial phenocopy of the sft mutant. **FEBS Letters**, v. 585, n. 2, p. 435–439, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2010.12.036>>

ZHANG, Y. H.; WAN, S. Q.; WANG, W. D.; CHEN, J. F.; HUANG, L. L.; DUAN, M. S.; YU, Y. Ben. Genome-wide identification and characterization of the CsSnRK2 family in *Camellia sinensis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 132, n. 1, p. 287–296, 2018.