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

Regulação do desenvolvimento e determinação do fruto de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) pela via microRNA156/ *SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like* (SPL)

Geraldo Felipe Ferreira e Silva

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

**Piracicaba
2012**

Geraldo Felipe Ferreira e Silva
Bacharel em Ciências Biológicas

Regulação do desenvolvimento e determinação do fruto de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) pela via microRNA156/ *SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like* (SPL)

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

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

**Piracicaba
2012**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Silva, Geraldo Felipe Ferreira e
Regulação do desenvolvimento e determinação do fruto de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) pela via microRNA156/ *SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like (SPL)* / Geraldo Felipe Ferreira e Silva. - - Piracicaba, 2012.
90 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Plantas transgênicas 2. Regulação gênica 3. Tomate 4. Transferência de genes 5. Variação genética em plantas I. Título

CDD 635.642
S586r

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Fábio T. S. Nogueira por todo o aprendizado, em especial, por ter me ensinado a começar a pensar criticamente como cientista. Agradeço pela orientação e confiança depositada, sempre acreditando que eu seria capaz de realizar os trabalhos. Sou muito grato por tudo, você é um exemplo de orientador.

Ao professor Dr. Lázaro E. P. Peres, meu co-orientador, por tudo que me ensinou sobre desenvolvimento e por ter participado efetivamente da minha dissertação sempre contribuindo de forma construtiva para o desenvolvimento de todos os experimentos atuando verdadeiramente como um orientador. Você contribuiu muito para esse trabalho.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos meus pais (José Maurício Ferreira e Marília Magdelene M. F. e Silva) e meu irmão José Maurício Ferreira Filho por todo o apoio incondicional na minha escolha em seguir carreira científica.

Aos amigos Rafael Reis e Maurícia Nardi por se demonstrarem sempre interessados e preocupados com o andamento do meu trabalho.

A professora Dra. Helaine Carrer por ter me recebido tão bem no seu laboratório, o qual foi crucial para o desenvolvimento dessa dissertação.

Ao professor Dr. Daniel Scherer de Moura, que mesmo não sendo um orientador oficial sempre se portou como tal estando sempre pronto para ajudar em todos os aspectos desde discussões científicas a burocracias imobiliárias.

A Mariana da Silva Azevedo e Dr. Daniel Alves Ramiro que realmente colocaram a mão na massa juntamente comigo para que esse trabalho fosse realizado. Sou muito grato por toda a ajuda e por tudo que pude aprender com vocês.

A Msc. Valentina de Fátima de Martin por me auxiliar em tudo que precisei no laboratório e por ter realizado o sequenciamento de amostras em várias etapas deste trabalho.

À Cássia Regina Figueiredo por toda a ajuda nas análises anatômicas dos ovários de tomateiro. Sem a sua ajuda com certeza tudo teria sido muito mais difícil.

A Maria Solizete G. Silva do PPG em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, por todo o auxílio nas várias questões burocráticas.

Ao Msc. Fausto Andrés Ortiz-Morea e Msc. Frederico Almeida de Jesus por todas as discussões sobre microRNAs e desenvolvimento vegetal que me ajudaram a enxergar melhor o que tinha em mãos.

Ao Msc. Raphael Ricon de Oliveira que mesmo não estando mais na mesma Universidade continuou contribuindo com discussões interessantes, principalmente sobre MADS-Box.

Aos membros do Laboratório da professora Helaine Carrer: Eduardo Picelli, Evandro Tambarussi, Dr. Marcelo Rogalski, André Luis Barbosa, Olegth Rojas, Esteban Galeano e Carina Sacco por toda ajuda e ensinamentos.

Aos membros do Laboratório do prof. Lázaro Peres: Ana Gomes, Dr.Ivan Sestari, Mateus Henrique, Eloisa Vendemiatti, Guilherme e Gabriel por me ajudarem na casa de vegetação e por todas as discussões no café das 14:00 ou das 16:00.

Aos membros do Laboratório do prof. Daniel Moura: Tábata Bergonci, Paulo Ceciliato, Bianca Ribeiro, Juan Carlos e Keini Dressano por todas as placas de meio LB, alíquotas de Taq e outras coisas que possa ter pegado emprestado.

Aos membros do Laboratório do prof. Antonio Figueira: Ilse Ferrari, Danielle Scotton, Juliana Deganello, Mariana Belloti, Thaísa Tessuti, Débora Nishimura, Roberto Camargo, Vlamir, Joni Lima e Eduardo Bressan por todas as mil vezes que fui quantificar RNA. Em especial a Ilse e Dani pelas cepas de E.coli , Agrobacterium e vários cafés.

Aos membros do Laboratório do prof. Fábio Nogueira (LGMDV): Gicela Ortiz-Morea, Cristiane de Santis, Vitor Pinotti, Eder Marques, Mike Anderson pelos vários envios de materiais e ideias para o trabalho.

Stay hungry, stay foolish.
Steve Jobs

A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.
Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 MicroRNAs e o desenvolvimento vegetal	17
2.2 Cultura do tomateiro (<i>Solanum lycopersicum</i>) e seu uso como planta-modelo em estudos genéticos	22
2.3 Bases moleculares e genéticas do desenvolvimento de fruto carnoso	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Construção do vetor pGS156 para transformação genética.....	31
3.2 Cultivo, transformação e regeneração de plantas transgênicas de tomateiro MT e MT- <i>Rg1</i>	33
3.3 Caracterização genotípica das plantas transgênicas.....	34
3.4 Caracterização fenotípica das plantas transgênicas contendo o transgene <i>p35S::AtMIR156b</i>	35
3.5 Cortes histológicos de ovários	35
3.6 Cruzamento de plantas transgênicas com tomateiro comercial cultivar Santa Clara	35
3.7 Isolamento, tratamento com DNase I e quantificação do RNA total	36
3.8 Síntese de cDNA via <i>pulsed stem-loop</i> RT-PCR	36
3.9 Identificação <i>in silico</i> de genes de interesse em tomateiro	37
3.10 Avaliação do acúmulo dos transcritos por RT-qPCR	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1 Obtenção do vetor pGS156	43
4.2 Transformação e regeneração de plantas transgênicas	43
4.3 Genotipagem dos eventos transgênicos obtidos	44
4.4 Caracterização morfológica e fenotípica	45
4.5 Avaliação anatômica dos ovários	56
4.6 Identificação <i>in silico</i> de genes / Filogenia SPLs de tomateiro	58
4.7 Análise da expressão de genes via qRT-PCR	59
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	71

REFERÊNCIAS.....	73
ANEXOS.....	86

RESUMO

Regulação do desenvolvimento e determinação do fruto de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) pela via microRNA156/ *SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like* (SPL)

Muitas plantas apresentam crescimento indeterminado e são capazes de produzir novos órgãos e tecidos ao longo de todo seu ciclo de vida. Essa capacidade é devida parcialmente à expressão altamente regulada de genes específicos, tais como os genes *SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like* (SPLs). SPLs codificam fatores de transcrição específicos de plantas que desempenham papéis importantes em diferentes aspectos do desenvolvimento, tais como mudança de fase juvenil-adulto, definição da arquitetura da planta e amadurecimento do fruto. A maioria dos genes SPLs são pós-transcricionalmente regulados pelo microRNA (miRNA) miR156. Apesar de alguns aspectos regulados pelas SPLs serem bem estudados, suas funções moleculares durante o desenvolvimento do fruto são pouco compreendidas. Neste trabalho, nós geramos 22 eventos transgênicos de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom (MT) superexpressando o precursor *AtMIR156b*. Plantas transgênicas exibiram morfologia foliar e floral anormal além de alteração na arquitetura vegetal. Interessantemente, a maioria dos eventos apresentou frutos de crescimento indeterminado, os quais não apresentam sementes sendo caracterizados pelo crescimento de frutos secundários além da presença de estruturas vegetativas e meristemas florais ectópicos. Fazendo uso da técnica de RT-qPCR, nós encontramos uma robusta correlação entre expressão do miR156 e o fenótipo dos frutos, sugerindo que esta rota regula o desenvolvimento e determinação do fruto de tomateiro. O mutante de tomateiro *Mouse ears* (Me) apresenta um fraco nível de indeterminação no fruto, sendo que os níveis do transcrito miR156 maduro são maiores no fruto mutante quando comparado aos controles MT, mas significativamente menores que nos frutos transgênicos. Oito SPLs de tomateiro foram silenciadas em diferentes níveis em frutos de diferentes eventos transgênicos e no mutante Me. O fator de transcrição do tipo MADS-box *MACROCALYX* (MC), o qual é ortólogo ao gene *APETALA1* (AP1) de arábida (alvo direto *in vivo* da proteína SPL3), afeta a determinação da inflorescência e o desenvolvimento das sépalas. A expressão de MC foi severamente reduzida nos frutos dos eventos transgênicos, mas não no mutante Me. Este dado sugere que a desregulação da expressão de MC deve ser responsável pelo forte fenótipo de indeterminação do fruto observados nos eventos transgênicos. Tomados em conjunto, nossos dados sugerem uma nova função para a via genética miR156/SPL na regulação do desenvolvimento e determinação de frutos carnosos, provavelmente através da regulação da expressão de MC.

Palavras-chave: MADS-Box; Knox; *Mouse ears*; Meristema ectópico; Frutos do tipo umbigo

ABSTRACT

MiR156–targeted Squamosa Promoter-binding proteins (SPLs) regulate fruit development and determinacy

Many plants have indeterminate growth and are capable of producing new organs and tissues throughout their life. This capability is partially due to the highly regulated expression of specific genes such as *SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like* (SPL) genes. SPLs encode plant-specific transcription factors that play important roles in development, such as phase transition, plant architecture, and fruit ripening. Most SPL genes are post-transcriptionally regulated by the microRNA (miRNA) miR156. Although some developmental aspects regulated by SPLs have been well studied, their molecular roles during fruit development are poorly understood. In this work, we generated 22 transgenic events of *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom (MT) overexpressing *AtMIR156b* precursor. Transgenic plants exhibit abnormal leaf and flower morphology and altered vegetative architecture. Interestingly, most events display navel-like fruits that are seedless and characterized by the growth of secondary fruits and present leaf-like structures as well as ectopic flowering meristems. By using RT-qPCR, we found a robust correlation between miR156/SPL expression and the fruit phenotype, suggesting that this pathway regulates tomato fruit development and determinacy. The tomato mutant *Mouse ears* (*Me*) displays a weak level of fruit indeterminacy. Levels of mature miR156 transcripts are higher in fruits from the mutant as comparing to MT fruits, but significantly lower than in transgenic fruits. Eight tomato SPLs were downregulated at variable levels in fruits from distinct transgenic events and *Me* plants. The MADS-type of transcription factor *Macrocalyx* (*MC*) gene is an orthologue of *Arabidopsis* *AP1* (a direct *in vivo* target of SPL3) and affects tomato inflorescence determinacy and sepal development. *MC* was severely downregulated in fruits from transgenics but not in fruits from *Me* mutant. This data suggests that the *MC* misregulation may lead to the strong fruit indeterminacy phenotype observed in the transgenic events. Taken together, our data suggest a new function for miR156/SPL pathway in regulating fruit development and determinacy likely through the regulation of *MC* expression.

Keywords: MADS-Box; Knox; *Mouse ears*; Ectopic meristem; Navel-like fruits

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo da Biogênese e ação de microRNAs em plantas.....	17
Figura 2 - Plantas de mesma idade de <i>Arabidopsis thaliana</i> (ecótipo Col-0) selvagem (WT), duplo mutante (<i>sp19 sp15</i>) e transgênica (<i>p35S::AtMIR156b</i>) crescidas em nosso laboratório sob regime de luz de 16 h.....	21
Figura 3 - Desenvolvimento do fruto de tomateiro.....	25
Figura 4 - Amplificação do locus correspondente ao <i>AtMIR156b</i> (1.6Kb).....	32
Figura 5 - Vetor topo utilizado para sub-clonagem e sequenciamento do amplicon.....	32
Figura 6 - Representação esquemática do vetor pGS156, contendo o gene <i>AtMIR156b</i> sob o controle do promotor CaMV35S (35S).....	33
Figura 7 - Confirmação dos clones pBI121 + <i>AtMIR156b</i> (pGS156) via digestão com enzimas <i>BamHI</i> e <i>SacI</i> que liberaram o fragmento do tamanho esperado correspondente ao precursor <i>AtMIR156b</i> (elipse preta).....	33
Figura 8 - Esquema do <i>pulsed stem-loop</i> RT-PCR.....	37
Figura 9 - Acompanhamento do desenvolvimento de plantas transformadas com a construção pGS156 em dias após co-cultivo com <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	44
Figura 10 - Análise genotípica dos 25 eventos transgênicos obtidos.....	45
Figura 11 - Variação morfológica entre os diferentes eventos transgênicos 35S: <i>AtMIR156b</i>	46
Figura 12 - Comparação morfológica entre evento transgênico e MT- <i>Rg1</i> 27 dias após semeadura.....	48
Figura 13 - Avaliação do crescimento de plantas transgênicas MT- <i>Rg1</i> 156-19 comparada ao MT- <i>Rg1</i>	49
Figura 14 – Variação morfológica entre os diferentes eventos transgênicos 35S: <i>AtMIR156b</i>	50
Figura 15 - Correlação entre o acúmulo do microRNA156 maduro e o fenótipo indeterminado em oito eventos transgênicos independentes.....	51
Figura 16 - Comparação morfológica entre fruto do mutante <i>clau:shl</i> e evento MT 156-1.....	53

Figura 17 - Comparação morfológica de folhas e flores de três eventos transgênicos e o controle MT- <i>Rg1</i>	55
Figura 18 - Avaliação fenotípica dos transgênicos superexpressando <i>AtMIR156b</i> no <i>background</i> Santa Clara.....	56
Figura 19 - Visão anatômica dos ovários e morfológica dos frutos.....	58
Figura 20 - Dendograma de similaridade comparando as sequências identificadas em <i>Solanum lycopersicum</i> com <i>Arabidopsis thaliana</i>	59
Figura 21 - Acúmulo dos microRNAs maduros miR156 e miR172 em três eventos transgênicos, mutantes <i>Me</i> e <i>clau</i> além dos controles nos dois <i>backgrounds</i> adotados.....	62
Figura 22 - RT-qPCR mostrando o acúmulo de oito SPLs diferentes em dois <i>backgrounds</i> diferentes.....	65
Figura 23 - Modelo do controle da determinação do desenvolvimento envolvendo o microRNA miR156 e os genes <i>SPLs</i> , <i>MADS-Box</i> e <i>TKn2</i>	66
Figura 24 - Acúmulo do gene <i>Knox</i> classe I <i>TKn2</i> via RT-qPCR em frutos estágio três de desenvolvimento.....	67
Figura 25 - Acúmulo dos genes <i>MADS-Box</i> <i>MACROCALYX (MC)</i> e <i>TDR4</i> via RT-qPCR em frutos estágio três de desenvolvimento.....	69

1 INTRODUÇÃO

Apesar de frutos secos e deiscentes representarem a maioria dos frutos das espécies vegetais, os estudos de desenvolvimento de fruto são focados principalmente em espécies de frutos carnosos devido a sua importância para a dieta humana. Ênfase particular tem sido dada ao tomateiro como sistema para análises genéticas e moleculares do desenvolvimento e amadurecimento de frutos carnosos, tais como os frutos de tomateiro (*Solanum Lycopersicum*) (GIOVANNONI, 2001). Atualmente, a produção mundial de tomateiro é liderada pela China seguida dos EUA sendo o Brasil apenas o oitavo maior produtor. Dentre as hortaliças, o seu consumo é menor apenas do que o de batata demonstrando a sua grande importância econômica (UNITED STATES. Department of Agriculture, 2009).

O desenvolvimento do fruto de tomateiro pode ser dividido em etapas com características distintas: No primeiro estágio, é determinada a identidade dos verticilos florais com consequente estabelecimento da arquitetura floral, a qual será responsável pela estrutura final do fruto. Em seguida, inicia-se um período de intensa divisão celular seguido por uma fase de rápida expansão celular que culmina em extensivo aumento no tamanho do fruto. O último estágio é o amadurecimento, no qual ocorre uma série de modificações bioquímicas e fisiológicas responsáveis pela produção do fruto maduro.

Recentemente, notável progresso tem sido obtido na caracterização das vias genéticas que controlam o amadurecimento desta espécie modelo. A identificação de genes tais como *MADS-RIN* (VREBALOV et al., 2002) e *COLORLESS NON RIPENING (CNR)* (MANNING et al., 2006) mostrou a existência de rotas independentes ao fitohormônio etileno, as quais são capazes de regular o processo de amadurecimento. Diferentemente do amadurecimento, as etapas iniciais e intermediárias do desenvolvimento do fruto são pouco compreendidas ao nível de regulação gênica e não se sabe ao certo, por exemplo, qual ou quais via(s) genética (s) regula(m) a determinação do desenvolvimento do fruto.

Recentemente, foi demonstrado que o perfil de expressão de pequenos RNAs (principalmente microRNAs) apresenta mudanças acompanhando os

diferentes estágios do desenvolvimento do fruto de tomateiro (MOHORIANU et al., 2011). Tais resultados sugerem que estes pequenos RNAs não codantes apresentam funções regulatórias no desenvolvimento do fruto. Já foi demonstrado a importância da regulação por microRNAs (miRNAs) nos mais diversos processos do desenvolvimento vegetal (ORI et al., 2007; WU et al., 2009; AUKERMAN;SAKAI, 2003, NOGUEIRA et al., 2007). Dentre estes vários processos, a regulação gênica negativa exercida pelo miR156 sobre os fatores de transcrição (FTs) do tipo *SQUAMOSA PROMOTER-BINDING-LIKE PROTEINS* (SPLs) merece destaque especial por desempenharem papéis significativos em diversos aspectos do desenvolvimento em plantas (CHEN et al. 2010). Membros dessa família de FTs atuam em diferentes processos tais como: transição das fases juvenil-adulto e vegetativo-reprodutivo (WU et al.,2009), distribuição de tricomas (YU et al. 2010) e biossíntese de antocianina (GOU et al.,2011). MANNING et al. (2006) descrevem um gene do tipo *SPL* em tomateiro, *CNR*, que regula o amadurecimento do fruto. A descrição desta família de fatores de transcrição em uma espécie de fruto carnoso mostrou a existência de um novo papel regulatório para esses genes, diferentemente do que já havia sido descrito para as espécies modelo *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* (SCHWAB et al.,2005; XIE;WU;XIONG, 2006). Baseando-se nas informações citadas, surgiu a hipótese de que processos relacionados ao desenvolvimento de frutos carnosos tal como o de tomateiro poderiam ser regulados pela via genética envolvendo os genes *SPLs* e o microRNA156.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivos centrais: (1) Gerar plantas transgênicas de tomateiro Micro-Tom superexpressando o miR156 com o intuito de avaliar o papel da via genética miR156/SPL no desenvolvimento do fruto e (2) investigar as vias genéticas e os possíveis genes com expressão modificada decorrente da superexpressão deste microRNA.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MicroRNAs e o desenvolvimento vegetal

MicroRNAs (miRNAs) são uma classe de pequenos RNAs não codantes endógenos (20-22 nt). Sua biossíntese é iniciada pela transcrição dos genes *MIR* via a RNA Polimerase II ou RNA Pol II. O transcrito primário, ou precursor (pri-miRNA), é um RNA longo fita-simples e poliadenilado que forma estrutura secundária do tipo “hairpin” ou grampo. O pri-miRNA é processado via a ação de diferentes enzimas, incluindo a enzima RNase III DICER-LIKE1 (DCL1), e gera o precursor intermediário ou pre-miRNA (VAUCHERET, 2006). O pre-miRNA é clivado novamente pela enzima DCL1, gerando um *duplex* imperfeito de RNA (20-22 nt) que contém tanto o miRNA maduro quanto sua fita complementar (denominado miRNA*). O *duplex* de RNA é metilado pela enzima HEN1 (YANG et al., 2006) e o miRNA maduro é posteriormente incorporado ao complexo protéico denominado RISC que contém a enzima ARGONAUTA1 (AGO1). AGO1, “guiada” pelo miRNA maduro, cliva mRNAs específicos ou promove a repressão da tradução de genes-alvo (VOINNET, 2009)(Figura 1).

Figura 1 - Modelo da Biogênese e ação de microRNAs em plantas

Tanto a clivagem quanto o mecanismo de repressão da tradução requerem uma complementaridade de pares de bases entre o miRNA e o seu mRNA alvo. A inibição traducional é encontrada principalmente em animais, nos quais ocorre um maior número de *mismatches* (não complementaridade entre os nucleotídeos) entre o miRNA e sua sequência alvo. Em plantas, os miRNAs e seus alvos apresentam poucos *mismatches* e a inibição ocorre, de um modo geral, via clivagem do RNA mensageiro. A existência de uma quase perfeita complementaridade entre os miRNAs de plantas e seus mRNAs alvos tem facilitado a identificação de genes-alvo para muitos miRNAs já descritos (RHOADES et al., 2002). Desde que miRNAs foram descritos, primeiro em animais e posteriormente em plantas (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993; LAGOS-QUINTANA et al., 2001; REINHART et al., 2002), vários avanços foram feitos para o melhor entendimento da sua biogênese, modo de ação e efeitos biológicos. Atualmente, é sabido que os dois reinos apresentam maquinaria similar, mas com algumas divergências na biogênese e funcionamento.

MiRNAs são agrupados em famílias gênicas de acordo com a similaridade da sequência madura. Certas famílias possuem um grande número de membros (miR156, miR166, miR169), enquanto outras apenas um ou dois (miR162, miR390). Entretanto, esse número pode variar consideravelmente entre diferentes espécies vegetais (JONES-RHOADES, BARTEL, BARTEL, 2006). Em *arabidopsis*, 291 genes *MIR* foram agrupados em 42 famílias. Dentre essas, pelo menos 37 famílias são conservadas em *Solanum lycopersicum* (miRBase, release 18.0). Algumas famílias são conservadas mesmo em gimnospermas e na alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* (JONES-RHOADES; BARTEL; BARTEL, 2006; MOLNAR et al., 2007). Entretanto, outros miRNAs são conservados apenas em linhagens específicas; alguns exemplos são miR403 identificado somente em eudicotiledôneas (SUNKAR; ZHU, 2004) e o miR444 e miR529 que são específicos de monocotiledôneas (SUNKAR et al., 2005; ZHANG et al., 2005; ZANCA et al., 2010).

MicroRNAs e outros RNAs regulatórios desempenham papel crucial em diversos processos biológicos em plantas, incluindo desenvolvimento CHITWOOD et al., 2007, sinalização via fitohormônios (ACHARD et al., 2004; MALLORY; BARTEL; BARTEL, 2005) e resposta a estresses bióticos e abióticos (LU et al., 2005). Alguns microRNAs foram extensivamente estudados em distintos aspectos do desenvolvimento vegetal. Durante o estabelecimento da dorsoventralidade foliar, por exemplo, miR166 restringe o acúmulo de transcritos dos

genes *HD-ZIPIII* na face superior (adaxial) dos primórdios foliares em desenvolvimento. Essa regulação espacial dos transcritos dos genes *HD-ZIPIII* é um fator-chave para o desenvolvimento da lâmina foliar em milho e arabidopsis (NOGUEIRA et al., 2007; CHITWOOD et al., 2009). Já o miRNA319 atua regulando FTs do tipo TCP (*TEOSINTE BRANCHED1*, *CYCLOIDEA* e *PCF*). A superexpressão deste microRNA e a consequente redução do acúmulo de transcritos de seus genes-alvo controla o número de folíolos a ser produzido, alterando diretamente a complexidade foliar. A perda do sítio de regulação pelo miR319 e o consequente aumento do nível de transcritos de seus alvos *TCP* induz a geração de folhas simples em *Solanum lycopersicum* (ORI et al., 2007), espécie que sabidamente possui folhas compostas. Os membros da família do miR164 regulam FTs do tipo *CUP-SHAPED COTYLEDON* (*CUC*), os quais são necessários para a determinação dos limites entre as regiões meristemáticas e regiões celulares que darão origem aos primórdios foliares e florais em arabidopsis. A superexpressão deste miRNA produz flores com sépalas fusionadas, e, em algumas destas linhagens superexpressoras, pétalas e sépalas não se expandem mostrando sua importância para o correto desenvolvimento floral (LAUFS et al., 2004; SCHWAB et al., 2005).

MiRNAs não atuam independentemente; eles estão imersos em complexas vias que incluem interações com fatores de transcrição (LIU; CHEN, 2009). Isto pode ser constatado pela presença de sítios de ligação para vários FTs nos promotores dos genes *MIR*. Dentre esses FTs, foram identificados fatores de transcrição do tipo *AUXIN RESPONSE FACTOR* (*ARF*) (fatores de resposta ao fitohormônio auxina), *LEAFY* (FT induzido por giberelina que ativa genes homeóticos florais) e *BASIC HELIX-LOOP-HELIX LEU ZIPPER TRANSCRIPTION FACTOR* (*MYC2*) (FT que atua em vias genéticas que incrementam a capacidade de resposta ao estresse hídrico por meio do aumento de sensibilidade ao fitormônio ácido abscísico) (MEGRAW et al., 2006). Além disso, alguns destes fatores de transcrição são regulados por miRNAs, indicando a existência de um complexo de regulação tipo *feedback*, como demonstrado para alguns genes *MIR* em metazoários (MEGRAW et al., 2006). Como exemplo, pode-se destacar os vários genes *ARFs* que são alvos dos microRNAs miR160 e miR167 (CHEN, 2009). Interessantemente, alguns receptores de auxina são também sujeitos a regulação via miRNAs. MiR393 tem como alvo o gene *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1* (*TIR1*) e outros três genes codificando proteínas do tipo F-BOX (NAVARRO et al., 2006).

A superexpressão do microRNA172 promove florescimento precoce e ausência de pétalas na estrutura floral (AUKERMAN;SAKAI, 2003). Posteriormente, foi demonstrado que essa mesma família de microRNAs, conjuntamente com o miR156 e seus genes-alvo, interagem definindo as mudanças de fase do desenvolvimento vegetativo-reprodutivo em *Arabidopsis thaliana* (WU et al.,2009). A família do miRNA156 possui oito membros descritos em *arabidopsis* (*AtMIR156a-h*; miRbase release 18.0 <http://www.mirbase.org/>). Os genes-alvo para o microRNA 156 são membros da família de FTs do tipo *SPLs*, a qual é específica de plantas (KLEIN;SAEDLAR;HUIJSER, 1996; CARDON *et al.*,1999). Em *arabidopsis*, dez dos 16 membros dessa família de FTs são regulados pelo miR156 (SCHWAB *et al.*, 2005),sendo tal regulação bastante conservada em tomateiro visto que dos 15 genes identificados para esta família, 10 apresentam sítio de regulação pelo miR156 (SALINAS et al., 2011). Uma característica comum dos FTs do tipo *SPL* é que estas proteínas possuem um domínio de ligação ao DNA de 79 resíduos de aminoácidos altamente conservados. Este domínio caracteriza-se por possuir um motivo do tipo *zinc finger*, o qual apresenta dois sítios de ligação *zinc*: um possuindo a seqüência de aminoácidos Cys-Cys-His-Cys e o outro a seqüência Cys-Cys-Cys-His (YAMASAKI *et al.*, 2004). Os genes *SPLs* foram primeiramente caracterizados como reguladores da expressão de genes *MADS-box* no florescimento precoce de *Antirrhinum majus* (KLEIN;SAEDLAR;HUIJSER, 1996). Desde então, tais FTs vem sendo identificados em várias espécies vegetais, incluindo algas verdes. Os genes *SPLs* exercem papel fundamental na regulação do florescimento, transição da fase juvenil-adulta (heteroblastia), bem como em outros processos fisiológicos (SCHWAB *et al.*, 2005; CHUCK *et al.*, 2007). O sítio de reconhecimento entre o miR156 e o mRNA dos genes *SPLs* é conservado entre espécies distantes evolutivamente, possibilitando o uso de ferramentas computacionais para a identificação destas seqüências em espécies ainda não estudadas.

Interessantemente, a superexpressão do microRNA 156 em *arabidopsis* promove severa redução na dominância apical, levando a uma maior produção de ramos laterais (SCHWAB *et al.*, 2005). Além disso, ocorre um atraso na mudança de fase de desenvolvimento, fazendo com que essas plantas permaneçam por mais tempo juvenis e conseqüentemente promovendo o atraso do florescimento. O aumento da produção de folhas se deve basicamente ao encurtamento do tempo de *plastochron*, que é o tempo decorrente entre a produção de um primórdio foliar e o

próximo (SCHWAB et al., 2005) (Figura 2). O peso seco de plantas transgênicas superexpressando o miR156 é quatro vezes maior que em plantas selvagens, devido ao aumento substancial no número total de folhas, o que, conseqüentemente, leva ao aumento na biomassa (SCHWAB et al., 2005). Fenótipo similar é observado em arroz (XIE;WU;XIONG, 2006), demonstrando que o controle da brotação lateral via miR156/SPL é conservado em monocotiledôneas e eudicotiledôneas. Fenótipo intermediário entre a superexpressão do miR156 e o tipo selvagem (*Wild Type*-WT) foi observado no duplo mutante de perda de função *spl9 spl15* em arabidopsis, demonstrando a importância dessa família de FTs para a regulação do desenvolvimento vegetal (SCHWARZ et al., 2008) (Figura 2). Outro membro dessa família de FTs, denominado *CNR* em tomateiro, apresenta função diferenciada quando comparada às descritas acima. O mutante *Cnr* demonstrou exercer função no processo de amadurecimento do fruto (MANNING et al., 2006).

Figura 2 - Plantas de mesma idade de *Arabidopsis thaliana* (ecótipo Col-0) selvagem (WT), duplo mutante (*spl9 spl15*) e transgênica (*p35S::AtMIR156b*) crescidas em nosso laboratório sob regime de luz de 16 h. Note o maior número de folhas e o atraso no florescimento do duplo mutante e da linhagem transgênica quando comparadas ao WT

2.2 Cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) e seu uso como planta-modelo em estudos genéticos

O tomateiro é nativo dos Andes, originando-se na região localizada na parte ocidental da América do Sul, embora não tenha sido cultivada entre indígenas andinos. O México é considerado centro de domesticação do tomateiro, onde a planta selvagem passou a ser cultivada e melhorada geneticamente. A espécie cultivada, hoje cosmopolita, é *Solanum lycopersicum* que provavelmente originou-se da espécie silvestre andina *Solanum lycopersicum* variedade cerasiforme, que produz frutos do tipo cereja. O tomateiro é uma planta herbácea, de caule flexível e incapaz de suportar, na posição vertical, o peso combinado da parte vegetativa e dos frutos. Dessa forma, suas cultivares são divididas em dois grandes grupos de acordo com o seu hábito de crescimento. Quando a cultura é destinada a produção de frutos para mesa é conduzida por tutoramento e as plantas apresentam crescimento indeterminado. Ocorre dominância da gema apical sobre as gemas laterais, resultando em menor desenvolvimento destas. O crescimento vegetativo da planta é vigoroso e contínuo, ocorrendo juntamente com a floração e frutificação. Já as cultivares de crescimento determinado são indicadas quando a finalidade é produzir frutos para o processamento e a planta é conduzida em cultura rasteira e a haste termina em um cacho de flores demonstrando a modificação da identidade meristemática de vegetativa para reprodutiva (FILGUEIRA, 2003).

A cultura do tomateiro é uma atividade agrícola praticada nos cinco continentes. No Brasil, foi introduzida por imigrantes europeus no fim do século XIX. Dificilmente haverá no mundo outra hortaliça como o tomate de tão evidente relevância econômica, flexibilidade na utilização como alimento e aceitação por consumidores dos mais diversos tipos. Por tais razões, o consumo, *in natura* ou em forma industrializada, é mais elevado em relação a outras hortaliças, com exceção apenas da batata (FILGUEIRA, 2003). Estima-se que a produção anual brasileira do tomate seja de três milhões de toneladas, dos quais dois milhões de toneladas, ou cerca de 80 por cento da produção no Brasil, seja para seu consumo *in natura*, sendo o restante utilizado para o processamento de sua polpa, normalmente feito a partir de tomates rasteiros (SEADE).

Além de sua importância econômica, o tomateiro tem sido utilizado como planta-modelo em diversos estudos genéticos e moleculares relacionados ao

desenvolvimento vegetal. Atualmente, a cultivar Micro-Tom (MT) tem sido adotado para estudos genéticos em tomateiro. Essa cultivar possui algumas mutações no seu *background* genético que proporcionam o seu pequeno porte e ciclo de vida curto. A presença do alelo *sp* para o locus *SELF PRUNING* (Fator de transcrição da família CELTS) proporciona o crescimento determinado. Já o alelo *d* para o locus *DWARF* (codifica uma proteína P450 da biossíntese de brassinoesteróides) proporciona o hábito anão. Além disso, essa cultivar possui outra mutação produzindo redução no comprimento do entrenó o qual afeta a altura da planta sem alterar os níveis de Giberelina (MARTI et al., 2006). A presença de mutações não é exclusividade da cultivar MT, visto que todas as cultivares de tomateiro apresentam alelos mutantes quando comparado a qualquer outro genótipo, e esta variação genética é exatamente o que define a cultivar como tal (CAMPOS et al., 2010).

O tomateiro miniatura MT é considerado um modelo para estudos de genômica funcional baseado em transformação genética (DAN et al., 2006; SUN et al., 2006). MT possui características comparáveis as de *Arabidopsis thaliana*, como seu pequeno tamanho (15-20 cm, quando cultivado em vasos de 150mL) e curto ciclo de vida (70-90 dias), sendo adequado para experimentos envolvendo mutagenesis em larga escala, cruzamentos com mutantes (MEISSNER et al., 1997; PINO-NUNES et al., 2008) e produção de plantas transgênicas (MEISSNER et al., 1997; MATHEWS et al., 2003).

A espécie selvagem próxima ao tomateiro, *Solanum peruvianum*, apresenta alta capacidade de regeneração *in vitro*. Pelo menos parte desta capacidade é devida a presença do alelo *Rg1* (KOORNNEEF et al., 1993). Diferentemente de mutações induzidas conferindo respostas hormonais alteradas, *Rg1* é uma variação genética natural a qual foi introgridida em *Solanum lycopersicum*. Posteriormente este material foi transferido para o *background* MT produzindo MT-*Rg1* que apresenta alta capacidade regenerativa *in vitro* associada às características de planta modelo apresentada pela cultivar MT (Pino et al., 2010).

Finalmente, o tomateiro pertence à família *Solanaceae*, a qual compreende muitas culturas importantes para a agricultura como batata, tabaco, pimenta e berinjela. Portanto, o conhecimento gerado no modelo de tomateiro MT pode ser estendido para outras culturas agronomicamente relevantes.

2.3 Bases moleculares e genéticas do desenvolvimento de fruto carnosos

Vários genes regulatórios codificantes de FTs tem sido associados a características singulares do desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de tomateiro. Seu hábito de crescimento do tipo simpodial, além da presença de frutos carnosos, requer um controle específico de diversos aspectos do desenvolvimento (LOZANO et al., 2009).

O fruto corresponde ao ovário da planta, protege o desenvolvimento da semente e funciona como veículo para a dispersão de sementes. Frutos de espécies domesticadas, na sua maioria, foram melhorados para aumento do tamanho quando comparado aos seus progenitores selvagens. Além do aumento do tamanho, a domesticação de várias espécies também resultou em uma grande variação no formato do fruto. Os frutos de tomateiros selvagens são praticamente invariáveis quanto a sua forma, enquanto que os cultivados apresentam um amplo espectro de formas, que variam desde comum redondo até o formato de pimentão (TANKSLEY, 2004).

O fruto de tomateiro é classificado como fruto carnosos, sendo composto de tecido epidérmico, pericarpo espesso e tecidos placentários ao redor das sementes. O pericarpo corresponde à parede externa do gineceu, o qual é composto de pelo menos dois carpelos (este número pode ser muito maior em algumas variedades). O pericarpo e conseqüentemente o fruto de tomate, com exceção da epiderme, são derivados da camada L3 (a mais interna das três camadas de células meristemáticas que se divide ao caso).

O desenvolvimento do fruto de tomateiro pode ser dividido em quatro diferentes estágios (Figura 3). **Estágio 1:** Corresponde a duas ou três semanas entre a iniciação floral e a produção da flor madura. Durante esse período, a identidade, o número e a forma dos verticilos florais são determinados. Provavelmente a determinação destes verticilos está sob intensa regulação genética neste ponto do desenvolvimento. **Estágio 2:** Período de intensa divisão celular que começa na antese, ou seja, o ato de abertura da flor e continua por aproximadamente duas semanas após a fertilização. **Estágio 3:** Período de rápida expansão celular que começa com o fim da divisão celular e perpetua-se até uma semana antes do início do amadurecimento. As células podem se expandir em até 20 vezes nesse período. **Estágio 4:** Fase de amadurecimento que se inicia após o crescimento ter cessado e

envolve rápidas modificações químicas, fisiológicas e estruturais que determinam o aroma, cor, textura, sabor entre outras características organolépticas do fruto.

Figura 3 - Desenvolvimento do fruto de tomateiro. A) estágios com escala temporal. B) representação dos três primeiros estágios. C) fruto maduro representando o quarto estágio

Baseando-se nos estudos genéticos e de mapeamento conduzidos até o momento, estima-se que menos de 10 *loci* são responsáveis pela maioria das mudanças em tamanho e forma do fruto associadas com a domesticação do tomateiro. (GRANDILLO; KU; TANKSLEY, 1999). Não se tem, entretanto, uma explicação ao certo para o aumento da variação de formas no fruto. Uma hipótese para explicar tal fenômeno seria de que a seleção para aumento no tamanho do fruto deve ter levado a mudanças na forma do mesmo por efeitos pleiotrópicos (LIPPMAN; TANKSLEY, 2001). Há correlação entre o tamanho e forma dos frutos de tomateiro, embora ainda seja desconhecida sua natureza. Cultivares com frutos maiores apresentam formas mais extremas quando comparadas a outras cultivares de fruto pequeno (VAN DER KNAAP; TANKSLEY, 2003).

Acredita-se que a mutação *fw2.2* foi um dos primeiros passos na domesticação do tomateiro visando aumento do fruto. Variação genética natural neste locus pode aumentar o tamanho do fruto em até 30% (FRARY et al., 2000). Esta mutação ocorre na região promotora do locus e não causa nenhuma modificação no formato do fruto. As mudanças no tamanho do fruto associadas à mutação *fw2.2* são mais evidentes durante os últimos estágios de desenvolvimento (NESBITT; TANKSLEY, 2001; CONG; LIU; TANKSLEY, 2002;

LIU;CONG;TANKSLEY,2003). A clonagem do locus *FW2.2* demonstrou que este codifica para um repressor negativo da divisão celular, o qual apresenta atividade confinada à fase de divisão celular do desenvolvimento do fruto (FRARY et al., 2000; CONG;LIU;TANKSLEY, 2002).

Outro locus atuante no desenvolvimento do fruto é o *OVATE*. Este gene já foi clonado e mostra correspondência a um regulador negativo de crescimento, atuando como um repressor da transcrição e assim diminuindo o comprimento do fruto (LIU et al., 2002; HACKBUSCH et al., 2005; WANG et al., 2007). O gene *OVATE* é expresso desde os primeiros estágios do desenvolvimento floral (menos de 10 dias após a polinização) até duas semanas posteriores a antese (LIU et al., 2002). Mutação neste gene, por meio da geração de um prematuro códon de parada no segundo *exon*, está associada com a mudança do formato de fruto redondo para alongado ou forma de pêra. Essa possível perda de função da proteína *OVATE* é consistente com o comportamento recessivo dos alelos alongados ou em forma de pêra, identificados em estudos genéticos (LIU et al., 2002).

Variações alélicas tanto no locus *OVATE* quanto no locus *SUN* (codifica para proteína que contém o domínio IQ67, XIAO et al., 2008) podem causar alongamento da forma do fruto, mas esses dois *loci* atuam de formas diferentes. A mutação *sun* causa alongamento uniforme, visto que o fruto mutante mantém simetria bilateral ao longo do seu crescimento. Comparativamente, a mutação *ovate* produz uma alongação assimétrica. Além disso, as mudanças no formato envolvendo a mutação *sun* ocorrem após a polinização durante o estágio de divisão celular (VAN DER KNAAP;TANKSLEY, 2001), enquanto que a mutação *ovate* afeta processos que ocorrem durante o Estágio 1 de desenvolvimento do fruto de tomateiro (Figura 3).

O gene *FASCIATED* (membro da família de fatores de transcrição do tipo *YABBY*, CONG; BARRERO; TANKSLEY, 2008) controla o número de carpelos durante o desenvolvimento floral e do fruto. O grande número de lóculos presente nos frutos do mutante *fasciated* é devido à repressão da expressão do gene *FASCIATED*, ou seja, quanto menor a expressão desse fator de transcrição maior será o número de lóculos produzidos no fruto (CONG; BARRERO; TANKSLEY, 2008). Sua repressão é causada por uma grande inserção de aproximadamente 8 Kb no primeiro *intron*. A produção de frutos extremamente grandes (>500g) por algumas variedades requer a presença não apenas da mutação *fasciated*, mas também da mutação *locule-number*. Quando presentes conjuntamente, estas

mutações interagem epistaticamente para produzir frutos com um número muito alto de lóculos e, dessa forma, maiores do que os frutos dos mutantes simples. (LIPPMAN; TANKSLEY, 2001).

A mutação *ripening inhibitor (rin)* afeta o amadurecimento do fruto, além de produzir flores com sépalas maiores e perder a determinação da inflorescência, produzindo desta forma, ramos vegetativos. A clonagem deste locus revelou a presença em tandem de dois genes da família de fatores de transcrição do tipo MADS-BOX (VREBALOV et al., 2002). O padrão de expressão dos dois genes mostrou-se associado aos fenótipos citados, o que sugeriu que ambos são importantes para os fenótipos descritos. Entretanto, experimentos posteriores demonstraram que um dos genes está envolvido com o processo de amadurecimento (*LeMADS-RIN*), enquanto que o outro está associado ao desenvolvimento das sépalas e da inflorescência (*LeMADS-MC*). Genes *MADS-Box* codificam fatores de transcrição, que em plantas, primariamente foram descritos como regulares do desenvolvimento floral. A única mutação descrita para este *locus* capaz de produzir os fenótipos descritos surgiu espontaneamente (VREBALOV et al., 2002). *LeMADS-RIN* foi o primeiro gene dessa família descrito como regulador do amadurecimento do fruto (VREBALOV et al., 2002). Genes regulatórios envolvidos no desenvolvimento floral foram recrutados para novas funções modulando o amadurecimento tanto em frutos secos como em carnosos durante o curso da evolução de angiospermas (LESEBERG et al., 2008).

O gene *COLORLESS NON RIPENING (CNR)* é um dos principais controladores do amadurecimento do fruto de tomateiro. A mutação *Cnr* corresponde a um epialelo metilado na região promotora, o que causa a redução de sua expressão. Os principais fenótipos associados à mutação são a perda de cor do fruto, o qual não amadurece completamente, além da perda substancial de adesão célula a célula (MANNING et al., 2006). Como descrito anteriormente, este gene é um membro da família de FTs *SPL*, provavelmente órtologo ao gene *AtSPL3*. Em arabidopsis, tal gene já foi descrito como regulador positivo dos FTs *MADS-Box APETALA1 (AP1)* e *FRUITFULL (FUL)*. A decisão de formar flores em última instância é controlada pela indução dos fatores de transcrição *LEAFY*, *FUL* e *AP1*. Estes três genes são ativados pelo *AtSPL3* o qual conjuntamente com outros membros desta família regulam o tempo de florescimento (YAMAGUCHI et al., 2009). Os três FTs citados possuem sítios em *cis* funcionais nos quais a proteína

SPL3 de *Arabidopsis* liga-se. Estes dados conjuntamente sugerem que *AtSPL3* atua, pelo menos em parte, em uma via paralela à rota canônica do gene *FLOWERING LOCUS T (FT)*, regulando o tempo de florescimento em *Arabidopsis* (YAMAGUCHI et al., 2009).

O gene *TDR4*, de tomateiro, foi identificado como um gene induzido pelo amadurecimento e apresenta similaridade ao gene *FUL* de *Arabidopsis*, sendo estes provavelmente ortólogos (SEYMOUR et al., 2002). A formação de dímeros entre *TDR4* e *TM29* (gene MADS-BOX da subfamília SEPALLATA) e *TDR4* e *TAG1* (gene MADS-BOX ortólogo a *AGAMOUS* de *Arabidopsis thaliana*) suportam a participação deste gene como elo entre o desenvolvimento floral e do fruto (BUSI et al., 2003). O promotor de *TDR4* provavelmente é alvo do gene *CNR*, uma vez que a expressão de *TDR4* é reprimida no mutante *Cnr* (ERIKSSON et al., 2004).

Numerosos eventos de duplicações ocorreram nos genomas de várias linhagens produzindo as angiospermas atuais. FTs do tipo MADS-box tem despertado particular interesse devido a sua presença em um grande número de eudicotiledôneas e seus papéis desempenhados em vários processos do desenvolvimento vegetal (NG; YANOFSKY, 2000). A duplicação seguida de diversificação de função de genes *MADS box* deve ter exercido papel importante na origem e diversificação das angiospermas (NG; YANOFSKY, 2000; IRISH, 2003; SOLTIS et al., 2007). Uma subfamília de genes *MADS-Box*, *AGAMOUS (AG)*, tem demonstrado possuir uma diversidade de funções no desenvolvimento de flores e frutos em um grande número de angiospermas. Em gimnospermas, genes *AG* são expressos no microsporófilo, megasporófilo e óvulos (TANDRE et al., 1995; RUTLEDGE et al., 1998). Dessa forma, tem sido sugerido que a função ancestral de genes *AG* está na especificação de órgãos reprodutivos masculinos e femininos (THEISSEN, 2001; KRAMER; JAMARILLO; DI STILIO, 2004). Análises funcionais de genes *AG* em diferentes espécies de angiospermas têm revelado exemplos interessantes de conservação e diversificação funcional. Tomateiro possui dois representantes dessa subfamília, *TOMATO AGAMOUS1 (TAG1)* e *TOMATO AGAMOUS-LIKE1 (TAGL1)*, permitindo uma análise da diversificação de função após a sua duplicação (PAN et al., 2010). Por meio da técnica de silenciamento gênico RNAi, foram produzidos transgênicos silenciando cada um dos genes citados individualmente. As linhagens *TAGL1 RNAi* não mostraram defeitos na produção de estames ou identidade do carpelo, mas apresentaram defeitos no amadurecimento

do fruto. Já as linhagens *TAG1* RNAi apresentaram defeitos no desenvolvimento de estames e carpelos. Além disso, nas linhagens *TAG1* RNAi, o fruto amadureceu normalmente, independentemente das modificações estruturais (PAN et al., 2010).

Outra subfamília de genes *MADS-Box* são os genes *SEPALLATA* de *arabidopsis*. Inicialmente foram descritos como necessários para a atividade dos genes das classes B e C para o correto desenvolvimento dos verticilos reprodutivos (PELAZ et al., 2000). O silenciamento de um dos seus ortólogos em tomateiro, o gene *TOMATO MADS 29 (TM29)* produziu flores aberrantes com alterações morfogênicas nos três verticilos internos. Pétalas e estames se tornaram verdes ao invés de amarelas, sugerindo uma parcial conversão para a identidade sepaloide. Estames e ovários se tornaram inférteis e ramos ectópicos com folhas parcialmente desenvolvidas e flores secundárias emergiram do fruto. Além disso, foi possível perceber a modificação na identidade meristemática que foi capaz de produzir ramos vegetativos novamente a partir de células do carpelo do fruto (AMPOMAH-DWAMENA et al., 2002).

Diferentemente dos genes *MADS-Box* que são altamente diversificados, genes *KNOX* compreendem uma pequena família dos genes *HOMEODOMAIN TALE* que são encontrados em todos os vegetais (MUKHERJEE et al., 2009). Estes genes regulam outros genes que controlam a homeostase hormonal no meristema e interagem com outra subclasse de proteínas pertencentes à família *BELL*. A interação com as proteínas *BELL* irá determinar a sublocalização celular dos genes *KNOX* (HAY;TSIANTIS,2010). Estes são divididos em duas subclasses baseando-se na similaridade de sequência dentre os homeodomínios, posição dos *introns*, padrão de expressão e filogenia (MUKHERJEE et al., 2009). A classe I contém os genes similares ao *KNOTTED 1(Kn1)*, primeiro gene *KNOX* descrito em plantas (VOLLBRECHT et al., 1991). Esses genes desempenham função na manutenção meristemática e determinação de folhas e flores em monocotiledôneas e eudicotiledôneas. Já a classe II forma um grupo monofilético sendo distinto do grupo I e possui genes que apresentam diversos padrões de expressão e poucas funções conhecidas (HAY;TSIANTIS, 2010).

O gene *TOMATO KNOTTED 2 (TKn2)*, ortólogo ao gene *SHOOTMERISTEMLESS (STM)* de *arabidopsis*, é expresso tanto em ápices vegetativos e reprodutivos quanto nos primórdios foliares e florais. Folhas de plantas transgênicas superexpressando este gene sob o comando do promotor CaMV 35S

apresentaram aumento na produção de folíolos por folha tornando-a mais complexa, lembrando o fenótipo obtido no mutante natural de tomateiro *Mouse ears* (*Me*). Esta maior complexidade é advinda da produção de meristemas ectópicos (JANSSEN; LUND; SINHA, 1998). Tais meristemas também foram capazes de alterar a estrutura floral e consequentemente produzir frutos com arquitetura alterada.

O mutante *Me* foi gerado por um evento de *splicing* que fundiu transcritos de dois genes intimamente ligados. O produto que é traduzido compreende maior parte da região 5' de uma FOSFOTRANSFERASE seguida do transcrito *TKn2* intacto, o que proporcionou o aumento da sua expressão. Dentre os vários fenótipos observados neste mutante, destaca-se a ampliação da atividade meristemática produzindo folhas mais elaboradas além de modificações na estrutural floral (PARNIS et al., 1997). Tais modificações foram capazes de produzir estruturas vegetativas ectópicas no fruto de forma semelhante ao observado no transgênico superexpressando *TKn2* (JANSSEN; LUND; SINHA, 1998)

O mutante *clausa:shootyleaf* (*clau:shl*) é parcialmente uma fenocópia dos transgênicos superexpressando genes *Knox* classe I. Análise de microscopia eletrônica de varredura revelou que o fruto carrega óvulos ectópicos além de vários primórdios foliares. A inflorescência tem características de caule ocorrendo fusão entre o pedúnculo e o pecíolo. Acredita-se que tal mutação seja a perda de função de algum fator que regule negativamente a expressão de *TKn2*. O padrão de expressão de *TKn2* foi alterado temporalmente nos frutos mutantes. Em frutos de plantas selvagens, a expressão de tal gene no carpelo é restrita ao período pré-antese. Já no mutante *clausa*, acúmulo de transcritos do *TKn2* é evidente em diferentes camadas celulares ao redor do saco embrionário após a antese. Os frutos desse mutante podem ser interpretados como representando o crescimento indeterminado da flor, a qual normalmente termina com a produção do verticilo mais interno (AVIVI et al., 2000).

Embora existam vários trabalhos relatando os genes e vias genéticas implicadas no estágio quatro do desenvolvimento do fruto de tomateiro, pouco se sabe sobre as vias genéticas que afetam os estágios iniciais do desenvolvimento, os quais podem envolver tanto os genes do tipo *MADS-box*, quanto os seus reguladores *upstream*, os genes *SPLs* e o microRNA156. Portanto, o objetivo geral desse trabalho foi avaliar o possível papel da via miR156/SPL e genes *MADS-box* no desenvolvimento de frutos carnosos de tomateiro cultivar MT.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos com enfoque molecular, tais como construção gênica e análise de expressão gênica via RT-qPCR foram desenvolvidos no laboratório de Biologia Molecular e genômica do CEBTEC/Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP, em parceria com a professora Dra. Helaine Carrer. Os experimentos de cultura de tecidos, transformação genética e cultivo de plantas foram desenvolvidos no laboratório de Controle Hormonal do desenvolvimento vegetal em parceria com o professor Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres do Departamento de Ciências Biológicas ESALQ/USP.

3.1 Construção do vetor pGS156 para transformação genética

Inicialmente foi realizada a extração de DNA genômico de folhas de *Arabidopsis thaliana* ecótipo Columbia (Col-0), seguindo o método CTAB descrito por DOYLE; DOYLE, 1987. Tal DNA foi utilizado como molde para amplificação via PCR do precursor do locus *AtMIRNA156b* (Figura 4). Para tanto, foram utilizados os seguintes iniciadores:

At156bF: 5'-GCA **GGATCC**TTTGACAAAACATCATGTCTCTCCA-3' (Tm: 55°C).

At156bR: 5'-GCA **GAGCTC**CTTCAAACCTCAAACGCAAAGACTTT-3' (Tm= 55°C).

pCR®2.1-TOPO®
3.9 kb

Diagram illustrating the structure of the pCR®2.1-TOPO® 3.9 kb plasmid. The plasmid is circular and contains the following elements:

- P_{lac}** (labeled +1) and **lacZ α** : Located at the top of the circle.
- f1 ori**: Located on the right side of the circle.
- Kanamycin** resistance gene: Located on the bottom right of the circle.
- Ampicillin** resistance gene: Located on the bottom left of the circle.
- pUC ori**: Located on the left side of the circle.

Figura 5 - Vetor topo utilizado para sub-clonagem e sequenciamento do *amplicon*

Após a clonagem neste vetor (Figura 5), foi realizada digestão com as enzimas *Bam*HI e *Sac*I, liberando apenas o fragmento de interesse. O inserto liberado foi purificado e clonado no vetor binário pBI121 (Invitrogen) produzindo o vetor pGS156 (Figura 6). A confirmação da clonagem foi realizada via digestão, utilizando-se as mesmas enzimas citadas anteriormente (Figura 7).

Figura 6 - Representação esquemática do vetor pGS156, contendo o gene *AtMIR156b* sob o controle do promotor CaMV35S (35S)

Figura 7 - Confirmação dos clones pBI121 + *AtMIR156b* (pGS156) via digestão com enzimas *Bam*HI e *Sac*I que liberaram o fragmento do tamanho esperado correspondente ao precursor *AtMIR156b* (elipse preta)

Após confirmação por digestão, estes clones foram sequenciados para verificar qualidade da sequência. Posteriormente, foi realizada a extração do DNA plasmidial (miniprep) de apenas um clone. Este miniprep foi utilizado para transformar a cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* por eletroporação.

3.2 Cultivo, transformação e regeneração de plantas transgênicas de tomateiro MT e MT-Rg1

Foram utilizados dois *backgrounds* diferentes para transformação, sendo o primeiro composto apenas por MT e o segundo MT-*Rg1*. A presença do alelo *Rg1* promove maior regeneração *in vitro*, motivo pelo qual este foi adotado no processo de transformação de tomateiro (PINO et al., 2010). Foram utilizados 200 explantes para MT e 280 para MT-*Rg1* sendo estes divididos em 20 por placa de petri. As plantas de *Solanum lycopersicum* foram transformadas usando vetor binário construído com o precursor do *MIR156b* de *Arabidopsis thaliana* (Figura 6), sob o controle do promotor CaMV 35S. A linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* utilizada para transformação genética foi a EHA105.

Tanto o cultivo como a transformação e regeneração de plantas foi realizado com a colaboração do Professor Dr. Lázaro E. P. Peres, do Departamento de Ciências Biológicas ESALQ/USP. O protocolo utilizado foi desenvolvido pelo seu grupo de pesquisa e está descrito em PINO et al., 2010. O uso de tomateiro MT e pré-incubação com *Naphthalene acetic acid* (NAA), seguido da regeneração em 6-Benzilaminopurina (6-BAP), resulta em alta frequência de transformação, próximo de 40%. O procedimento de obtenção das plantas transgênicas levou aproximadamente 60 dias desde a infecção com *Agrobacterium* até a aclimatização das mesmas em casa de vegetação.

3.3 Caracterização genotípica das plantas transgênicas

Após a transformação, as plantas T1 (primeira geração de transformantes) regeneradas *in vitro* foram transferidas para aclimação em casa de vegetação. Foram coletadas folhas de todas as linhagens e realizada extração de DNA genômico seguindo o método CTAB descrito por DOYLE; DOYLE, 1987. A qualidade do DNA extraído foi avaliada realizando PCR com iniciadores referentes ao gene GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*). Foi realizado posteriormente PCR com iniciadores específicos do transgene. O iniciador direto se anela no promotor 35S enquanto que o iniciador reverso no final do locus *AtMIR156b* (Figura 6).

3.4 Caracterização fenotípica das plantas transgênicas contendo o transgene *p35S::AtMIR156b*

Foram avaliadas fenotipicamente 22 eventos independentes, obtidos de ambos os backgrounds MT e MT-*Rg1*, em relação aos fenótipos previamente descritos em *Arabidopsis thaliana* e outras espécies superexpressando miR156, a saber: aumento da brotação lateral, diminuição do *plasthocron* e atraso do tempo de florescimento.

Além disso, com o intuito de caracterizar o padrão de crescimento das plantas transgênicas geradas, foram realizadas medições da inserção do cotilédone até o ápice da planta, inicialmente a cada dois dias e posteriormente a cada quatro dias. Foram avaliadas 15 plantas independentes oriundas de semente tanto de plantas MT-*Rg1* quanto plantas MT-*Rg1* evento no. 19 contendo o transgene *p35S::AtMIR156b*.

3.5 Cortes histológicos de ovários

Para a confecção das lâminas permanentes, ovários pós-antese (Estágio 2, ver Figura 3) foram fixados em solução de karnovsky (KARNOVSK,1965), posteriormente desidratados em serie etílica crescentes (10% a 100%) e infiltrados em resina sintética 2- hidroxietilmetacrilato (Leica HistoResin Embedding Kit) de acordo com as recomendações do fabricante. As secções obtidas com espessura de 5 µm do material foram feitas em micrótomo rotativo e para a coloração utilizou-se o azul de toluidina 0,05% (SAKAI,1973). As lâminas permanentes foram montadas com resina sintética (Entellan®).

3.6 Cruzamento de plantas transgênicas com tomateiro comercial cultivar Santa Clara

As sementes tanto das linhagens transgênicas como da cultivar comercial Santa Clara foram semeadas em vasos de 250 mL contendo uma mistura 1:1 (por volume) de substrato comercial (Plantmax HT Eucatex, Brasil) e vermiculita, suplementada com 1 g/L de NPK 10:10:10 e 4 g/L de calcário. Quando o primeiro par de folhas verdadeiras foi observado, as plântulas foram transplantadas

individualmente para vasos de 150 mL contendo a mesma mistura de substrato. Os genótipos foram cruzados por métodos convencionais (SACKS et al., 1997), sendo as plantas da cultivar Santa Clara doadoras de pólen. Frutos maduros de cinco plantas foram coletados e a polpa juntamente com as sementes foram retiradas e mantidas em fermentação com levedura comercial (Femix, Brasil) durante um dia. Em seguida, as sementes foram lavadas em água corrente e secadas ao ar livre. Todas as sementes oriundas do cruzamento foram plantadas e após 30 dias da semeadura já era possível discernir claramente via fenótipo quais plantas possuíam o transgene. Estas foram transferidas para canteiro e seu desenvolvimento acompanhado até a produção de frutos maduros.

3.7 Isolamento, tratamento com DNase I e quantificação do RNA total

O isolamento de RNA total das diferentes amostras foi feito seguindo-se as recomendações do fabricante do reagente Trizol (Invitrogen). Foi utilizada uma combinação de aproximadamente cinco frutos (Estágio 3) de cada genótipo testado para maceração em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido.

Após a extração do RNA total, tratou-se as amostras com 2 µl de *DNaseI Amplification Grade* (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante para remoção total de DNA genômico das amostras. Para evitar possíveis interferências residuais da DNase I no processo de síntese de cDNA, as amostras de RNA foram purificadas por re-extração com Trizol, mas usando somente ¼ do volume dos reagentes. Em seguida, a integridade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com 0,001% (v/v) de brometo de etídio, 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, utilizando o equipamento Thermo NanoDrop 2000 (Uniscience). Finalmente, a ausência de DNA genômico nas amostras de RNA total foi confirmada por meio da realização de PCR usando iniciadores específicos para um gene endógeno (Tubulina, número de acesso DQ205342.1).

3.8 Síntese de cDNA via *pulsed stem-loop* RT-PCR

RNA total, tratado com enzima *DNase I* tal como descrito anteriormente, foi utilizado para a síntese da primeira fita de cDNA por Pulsed RT-

PCR (Figura 8, VARKONYI-GASIC et al., 2007). Tal metodologia é utilizada com eficiência em tomateiro quando acoplada ao PCR quantitativo para avaliar o acúmulo de microRNAs (FENG et al., 2009). Juntamente com o iniciador específico tanto para o miRNA 156 quanto para o miR172 (iniciador RT), também foi adicionado oligodT para posterior normalização da quantidade de cDNA utilizado em cada reação de PCR. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 2 µg do RNA total purificado usando o Kit Improm-II Reverse Transcriptase (Promega). Ao RNA tratado com DNase foi adicionado 1µl de dNTP 10mM, 1µl de oligodT (500ng/ul), juntamente com o iniciador RT para o miRNA156 e miR172 maduros. As amostras foram incubadas a 70 °C por 10 minutos para desnaturação das estruturas secundárias e depois incubadas a 4 °C por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 5 µl de Improm-II 5x *Reaction Buffer*, 2,4 µl de MgCl₂ 25 mM, 0,6 µl de *RNase out* (invitrogen) e 1 µl da enzima Improm-II *Reverse Transcriptase*. As reações foram incubadas em termociclador a 16°C por 30 minutos, seguidas por transcrição reversa de 60 ciclos de 30°C por 30 segundos, 42°C por 30 segundos e 50°C por 1 segundo. Para inativação da enzima Improm-II *Reverse Transcriptase*, a reação foi incubada a 70 °C durante 15 minutos. Subsequentemente, as reações foram armazenadas a -20°C.

Figura 8 - Esquema do *pulsed stem-loop* RT-PCR retirado de (Varkonyi-Gasic et al., 2007). Iniciadores específicos *stem-loop* anelam na porção 3' das moléculas de miRNA maduro, iniciando sua transcrição reversa. Posteriormente, o miRNA maduro é amplificado utilizando-se iniciador direto específico e um iniciador reverso universal

3.9 Identificação *in silico* de genes de interesse em tomateiro

Inicialmente, sequências dos genes de interesse foram obtidas em outras espécies, como *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*, no banco de dados público NCBI (*National Center For Biotechnology Information*). Com estas sequências, foi realizada uma busca em três bancos de dados público da espécie

Solanum lycopersicum (<http://solgenomics.net/>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> e <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>). Em seguida, foi obtido informações sobre cada provável gene encontrado. Este processo é denominado anotação e baseou-se primeiramente na obtenção do quadro de leitura das sequências, também conhecido como ORF (*Open reading frame*). Após saber o início e fim da sequência codante, foi realizado a tradução desta sequência usando o tradutor do *Expasy* (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>). Posteriormente foi feita uma análise a partir das sequências de aminoácidos obtidas a fim de encontrar domínios conservados relacionados às funções de interesse (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). As sequências de aminoácidos obtidas foram analisadas através do software on-line BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Através desta comparação, foi possível relacionar as sequências de tomateiro a genes já descritos em outras espécies. Especificamente para os genes da família de FTs SPLs regulados pelo miR156/miR157, foi realizada filogenia com o intuito de identificar possíveis ortologias com os genes já descritos de *Arabidopsis thaliana*. Para tanto, foi realizado o alinhamento apenas do domínio SBP pelo programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994) com os parâmetros padrões (*default*), utilizando-se as sequências de nucleotídeos traduzidas em aminoácidos. A árvore filogenética final foi gerada utilizando-se o programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007), com o modelo de comparação *Neighbor-joining* (SAITOU; NEI, 1987), método de distância *p* e supressão *pair-wise*. A robustez dos ramos gerados na árvore pôde ser medida pelo teste probabilístico de bootstrap (SITNIKOVA et al., 1995), originado a partir de 1000 replicatas.

3.10 Avaliação do acúmulo dos transcritos por RT-qPCR

Iniciadores específicos foram desenhados (Tabela 1) baseados nas sequências identificadas (ver item 3.9), levando em consideração características como *T_m* (Temperatura de *melting*), a formação de dímeros (*cross-dimers* e *self-dimers*) e a formação de estruturas secundárias (*hairpins*), analisadas no software *Beacon designer* (<http://www.premierbiosoft.com>). No caso dos genes-alvo, os iniciadores foram localizados flanqueando o sítio de reconhecimento do miR156. Desta forma, garantiu-se que apenas transcritos não clivados fossem amplificados.

Material de plantas MT, MT-*Rg1*, de três eventos transgênicos (MT156-1, MT-*Rg1*156-18 e MT-*Rg1* 156-19), além dos mutantes *Mouse ears* e *clausa* foram avaliados em relação ao acúmulo dos genes selecionados (Tabela 1) por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Utilizou-se tecidos de frutos com diâmetro entre 1,4 e 1,6 cm (Estágio 3 do desenvolvimento do fruto, ver Figura 3) como material vegetal para extração de RNA total e posterior síntese de cDNA pelo método pulsed RT-PCR (ver itens 3.7 e 3.8). Como controles, foram usadas plantas selvagens crescidas nas mesmas condições tanto para o background MT quanto para MT-*Rg1*.

Tabela 1 - Iniciadores específicos utilizados na avaliação do acúmulo dos transcritos por RT-qPCR

Iniciador	Gene	Sequência	Acesso
<i>SlyTub</i> F	<i>Tubulina</i>	AACCTCCATTTCAGGAGATGTTT	DQ205342.1
<i>SlyTub</i> R		TCTGCTGTAGCATCCTGGTATT	
<i>SlySPL2</i> F	<i>SlySPL2</i>	CCCCTTGTCCACTCTAAACCTAC	SGN-U324312
<i>SlySPL2</i> R		GTCTGCATCTCAGTGGTCCCT	
<i>SlySPL2b</i> F	<i>SlySPL2b</i>	TTTAAATCGAGGTGCCAAGG	TC193631
<i>SlySPL2b</i> R		AACACTCTCAGGCTCGGATG	
<i>SlySPL3</i> F	<i>SlySPL3</i>	AAATTTGGGCTGAAGAAGCA	SGN-U317177
<i>SlySPL3</i> R		ATCCGGGAATTGACAGAAGA	
<i>SlySPL3a</i> F	<i>SlySPL3a</i>	CAAGTTGAACGGGCACCTAC	SGN-U319736
<i>SlySPL3a</i> R		TGGCAAATGACAGAAGAGAGAG	
<i>SlySPL6a</i> F	<i>SlySPL6a</i>	CTTCCATTTCAGGGGCTATCA	SGN-U323360
<i>SlySPL6a</i> R		GAGGACCAAGTCCCAGAACA	
<i>SlySPL6c</i> F	<i>SlySPL6c</i>	TCACACTGGTGGGACAACA	dbj AK247958.1
<i>SlySPL6c</i> R		TGTGAGTGGGCTGACAGAAG	
<i>SlySPL9/15</i> F	<i>SlySPL9/15</i>	GGTTCAGCTACCAGGACCAG	SGN-U604745
<i>SlySPL9/15</i> R		TGTGAACTTGGCTGTTGACC	
<i>SlySPL13</i> F	<i>SlySPL13</i>	GGAATTTCTAGCAGCGGACA	dbj AK319368.1
<i>SlySPL13</i> R		TGCACCATGTGACTCAAACC	
MADS-MC F	<i>MADS-MC</i>	CGAGAAAGAACCAACTCATGC	AF448521.1
MADS-MC R		TAGTTTGCTGGTGCCATTCA	
TDR4 F	<i>TDR4</i>	ATTGCAGGAGCAAAACAACC	gb AY098732.1
TDR4 R		CCAAGGTGAGGAGAGTCCAG	
<i>SlyTKN2</i> F	<i>TKN2</i>	GAGGCATTGGAAACCATCAG	AF000141
<i>SlyTKN2</i> R		CATGCACACAAGTAATATGCAA	
miR156 F	miR156	CCTGAGTGACAGAAGAGAGTG	MIMAT0000167
miR156 RT		GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAG	
Reverso universal	miR172	GTATTTCGCACTGGATACGACTGCTCT	MIMAT0000203
miR172 F		GTGCAGGGTCCGAGG	
miR172 RT	miR172	CCTGAGAGAATCTTGATGATG	MIMAT0000203
Reverso universal		GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAG	
		GTATTTCGCACTGGATACGACATGCAG	
		GTGCAGGGTCCGAGG	

As reações de amplificação RT-qPCR foram realizadas em volume final de 25 µl, usando 5 µl de cDNA na diluição 1:80 (v:v), 0,3 µl de cada iniciador na concentração 10mM, 12,5 µl de platinum sybr green qPCR (invitrogen) e 6,9 µl de água milli-Q. A amplificação foi conduzida em termociclador *Step one plus Real Time* (Applied Biosystems). O programa utilizado foi: 50°C por 2 minutos, 95°C por 2

minutos e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. Após a termociclagem, curvas de dissociação foram determinadas para cada produto amplificado (curva de *melting*). Todas as reações foram feitas em duplicatas, incluindo uma amostra controle (NTC) contendo somente água milliQ.

O método escolhido para análise da expressão gênica é considerado relativo, uma vez que a transcrição do gene de interesse não foi expressa em número absoluto de transcritos da amostra, e sim em relação à quantidade relativa de transcritos de outro gene cuja expressão é adotada como constante denominado gene normalizador. O gene codificante para Tubulina (DQ205342.1) em tomateiro foi escolhido como normalizador (MOUNET et al., 2009). O cálculo de expressão relativa foi realizado pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ descrito por LIVAK; SCHMITTGEN, 2001. Este permite a quantificação relativa, baseado na medição do ciclo em que é atingido o limiar da fase exponencial de amplificação, denominado *Cycle Threshold* (C_t). Os valores de C_t são determinados pela identificação do ciclo no qual a emissão da intensidade do marcador fluorescente esta acima de sinais inespecíficos. Todas as análises foram realizadas com duplicatas técnicas e três amostras biológicas independentes (*pool* de cinco frutos em cada) e o valor final obtido é a média de pelo menos duas amostras biológicas com as suas replicatas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção do vetor pGS156

Precusores de miRNAs heterólogos tem sido utilizados eficientemente em diferentes espécies vegetais, devido ao fato do microRNA maduro ser amplamente conservado independentemente do seu precursor (OSSOWSKI;SCHWAB;WEIGEL, 2008). Dessa forma, foi utilizado para a construção do vetor pGS156 o precursor *AtMIR156b* de *Arabidopsis thaliana* que sabidamente é processado de forma eficiente para produzir o microRNA maduro (SCHWAB et al., 2005). Após a amplificação deste gene via PCR (Figura 4B), o fragmento foi clonado no vetor PCR 2.1 – TOPO (Figura 5). Dentre os vários clones obtidos, seis foram avaliados quanto à presença do transgene, sendo todos positivos. Um dos clones foi escolhido para a extração do DNA plasmidial (miniprep) e em seguida realizada digestão com as enzimas *Bam*HI /*Sac*I com o intuito de confirmar novamente a presença do transgene. Posteriormente, este fragmento foi ligado ao vetor binário pBI 121. Foram obtidos vários clones após a transformação de *Escherichia coli* cepa DH10B e destes, oito foram avaliados via PCR sendo todos positivos para a presença do transgene. Três destes clones foram digeridos com *Bam*HI/*Sac*I demonstrando a presença do transgene *AtMIR156b*, como pode ser visualizado na Figura 7. Um dos genes sequenciados apresentou 100% de identidade com a sequência depositada no NCBI correspondente ao gene *MIR156b* de *arabidopsis*, sendo portanto selecionado para as etapas posteriores. O DNA plasmidial do clone selecionado foi inserido em *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA105 via eletroporação. A presença do transgene foi confirmada via PCR e este clone foi utilizado para o co-cultivo com explantes cotiledonares de tomateiro descritos na próxima seção.

4.2 Transformação e regeneração de plantas transgênicas

O processo de transformação foi realizado conforme descrito em (PINO et al., 2010) e a regeneração das plantas transgênicas de tomateiro MT e MT-*Rg1* é mostrado na Figura 9. Ao final do processo de regeneração *in vitro* e transferência para substrato em casa de vegetação, foram obtidas 22 eventos independentes. Destes, 21 eventos de transformação ocorreram no background MT-

Rg1 e apenas um em MT (Figura 9E). A eficiência relativa de formação de plantas transgênicas foi aproximadamente 17 vezes maior em MT-*Rg1*, demonstrando sua grande capacidade de regeneração *in vitro* (PINO et al., 2010).

Figura 9 - Acompanhamento do desenvolvimento de plantas transformadas com a construção pGS156 em dias após co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens*. A) 25 dias; B) 32 dias; C) 44 dias; D) 60 dias; E) 100 dias e F) 190 dias

4.3 Genotipagem dos eventos transgênicos

Na Figura 10 observa-se que todas as linhagens testadas foram positivas para a presença do transgene *p35S::AtMIR156b*. A reação de PCR utilizou iniciador direto capaz de se anelar ao promotor CaM35S (Ver Figura 6) e o reverso na extremidade 3' do gene *MIR156b* de *arabidopsis*. Dessa forma, o produto desta amplificação é de aproximadamente 2.0kb. As linhagens 13, 19, 20, 21 e 24 apresentaram bandas fracas, por isso a reação foi feita novamente (último quadro Figura 10). Mesmo apresentando bandas fracas para o transgene, estes eventos foram considerados positivos, fato esse corroborado posteriormente pelo fenótipo apresentado.

Figura 10 - Análise genotípica dos 25 eventos transgênicos obtidos. A banda de aproximadamente 2000pb corresponde ao *amplicon* gerado pelo iniciador direto posicionado no promotor 35S e o iniciador reverso no final da sequência correspondente a *AtMIR156b*. O último quadro corresponde às linhagens que não foram positivas ao primeiro teste via PCR. C+ corresponde ao vetor PGS156 que foi usado como controle positivo na reação

4.4 Caracterização morfológica e fenotípica

Após a confirmação da presença do transgene nos eventos supracitados, avaliou-se com detalhamento o desenvolvimento das plantas transgênicas com o intuito de encontrar modificações no desenvolvimento quando comparadas aos controles MT e MT-*Rg1*. As principais características advindas da superexpressão do miR156, já descritas em *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Brassica napus* e *Panicum virgatum* (SCHWAB et al., 2005; XIE; WU; XIONG, 2006; CHUCK et al., 2007; WEI et al., 2010; FU et al., 2012) foram visualizadas, tais como: florescimento tardio e o aumento da brotação lateral. A Figura 11 A mostra a comparação entre planta MT-*Rg1* e evento transgênico produzido, com destaque para o aumento da brotação lateral e principalmente às modificações na estrutura do fruto (Figura 11 E). Na Figura 11F está representado o único evento obtido no

background MT o qual é bastante similar fenotipicamente aos outros eventos transgênicos obtidos no *background* MT-*Rg1*. Dessa forma, os dados sugerem que os fenótipos observados nos dois *backgrounds* utilizados são devido à presença do transgene *p35S::AtMIR156b* e não à possíveis diferenças de *background* genético.

Figura 11 - A) Comparação entre MT-*Rg1* (esquerda) e transgênico MT-*Rg1_MIR156-6* (direita). B) e C) estrutura indeterminada formada no ápice dos ramos vegetativos de alguns eventos. D) detalhe da morfologia dos frutos selvagens. E) Detalhe da morfologia dos frutos transgênicos evento MT-*Rg1_MIR156 6*. F) Evento único no *background* MT (MT-*MIR156 1*)

Mesmo no início do desenvolvimento já foi possível visualizar a presença dos fenótipos descritos como resultado da superexpressão do *miR156* (SCHWAB et al., 2005; XIE;WU;XIONG,2006, CHUCK et al., 2007; WEI et al., 2010; FU et al., 2012). Dentre estes, é possível visualizar claramente o encurtamento do *plastochron* no evento 156-19 (Figura 12 B), o qual apresenta maior número de folhas quando comparado ao MT-*Rg1* (Figura 12 A). Tal observação é comprovada numericamente na Figura 13 A. Plantas superexpressando *AtmiR156b* apresentam maior número de folhas no mesmo estágio de desenvolvimento quando comparadas ao controle.

O grau de alterações morfológicas reprodutivas mostrou-se dependente do nível de acúmulo do microRNA156 maduro (Figura 15). Resultado semelhante foi obtido por FU et al., 2012 que superexpressaram o microRNA156 de arroz na espécie *Panicum virgatum* obtendo diferentes classes fenotípicas, as quais apresentaram associação direta com o nível de expressão do transgene. Assim, pode-se perceber que há uma correlação entre a severidade do fenótipo (seja vegetativo ou reprodutivo) e o nível do acúmulo do microRNA156 maduro (FU et al., 2012). Interessantemente, WEI et al., 2010 superexpressaram o precursor *AtMIR156b* de arabidopsis em *Brassica napus* (Canola) obtendo alterações brandas na brotação lateral quando comparado aos controles. Provavelmente devido ao baixo nível de superexpressão, não foram visualizados fenótipos extremos como no presente trabalho.

A regulação exercida pelo miR156 sobre os FTs do tipo SPLs promove várias modificações no desenvolvimento vegetal (CHEN et al., 2010), fazendo com que esta via seja explorada tanto para fins científicos quanto biotecnológicos. FU et al., 2012 demonstraram que pequenos níveis de superexpressão do miR156 foram suficientes para produzir em *Panicum virgatum* aumento de biomassa sem alterar o tempo de florescimento, além do aumento do conteúdo de açúcar solúvel e melhora na digestibilidade para forrageiro. Tais características são desejáveis em programas de melhoramento de plantas como de cana-de-açúcar para produção de bioetanol.

Figura 12 - Comparação morfológica entre evento transgênico e MT-*Rg1* 27 dias após semeadura. A) MT-*Rg1* B) *Rg1* 156-19. C) Da esquerda para direita: 1º par de folhas, 2º par de folhas *Rg1* WT, 1º par de folhas *Rg1* 156-19, 2º par de folhas *Rg1* 156-19

Trinta dias após a semeadura, foi possível perceber o maior número de folhas produzidas no evento MT-*Rg1* 156-19 (7,52 em média) quando comparada ao MT-*Rg1*, o qual apresentou apenas 4,23 folhas em média, no mesmo estágio de desenvolvimento (Figura 13A). Além disso, os transgênicos produzidos apresentaram porte de crescimento reduzido visto que 46 dias após a semeadura tornou-se evidente o menor tamanho do transgênico baseando-se em medições da inserção do cotilédono até o ápice da planta (Figura 13B). Fenótipos semelhantes foram encontrados em todas as espécies superexpressando o microRNA156 (SCHWAB et al., 2005; XIE;WU;XIONG,2006, CHUCK et al., 2007; WEI et al., 2010; FU et al., 2012).

Figura 13 - Avaliação do crescimento de plantas transgênicas MT-*Rg1* 156-19 comparada ao MT-*Rg1*. A) Número de folhas em plantas com 30 dias após a semeadura. B) Medições da inserção dos cotilédones até o ápice vegetal de 10 plantas para cada linhagem

Interessantemente, além dos fenótipos descritos, foram visualizadas modificações no crescimento e desenvolvimento dos frutos nos eventos transgênicos, os quais se tornaram indeterminados. Frutos de praticamente todos os eventos produzidos apresentaram estruturas ectópicas e modificações de diferentes graus de severidade (Figura 14).

Figura 14 - Variação morfológica entre os diferentes eventos transgênicos 35S: AtMIR156b. A) *Rg1* MiR156-1; B) *Rg1* MiR156-2; C) *Rg1* MiR156-3; D) *Rg1* MiR156-4; E) *Rg1* MiR156-5; F) *Rg1* MiR156-6; G) *Rg1* MiR156-7; H) *Rg1* MiR156-8; I) *Rg1* MiR156-9; J) *Rg1* MiR156-10; K) *Rg1* MiR156-11; L) *Rg1* MiR156-12; M) *Rg1* MiR156-13; N) *Rg1* MiR156-15; O) *Rg1* MiR156-16; P) *Rg1* MiR156-18; Q) *Rg1* MiR156-19; R) *Rg1* MiR156-20; S) *Rg1* MiR156-22; T) *Rg1* MiR156-23; U) *Rg1* MiR156-25; V) MT; X) MT-*Rg1*; Z) MT-MiR156-1

As modificações no padrão de crescimento do fruto foram capazes de produzir ectopicamente tanto estruturas vegetativas quanto reprodutivas, sendo possível visualizar a produção de folhas, flores e frutos secundários, estes últimos fusionados em alguns eventos (Figura 14).

Após verificar variação morfológica nos diferentes eventos produzidos, estes foram subdivididos em categorias de acordo com a severidade do fenótipo indeterminado encontrado no fruto. A classe I está representada na Figura 15 pelos eventos 13 e 11 (fraco). A classe II eventos 19 e 23 (moderado). Classe III eventos 12 e 15 (forte) e Classe IV evento MT miR156-1 e evento 6 (extremo). Frutos da classe I apresentam pouca indeterminação, com padrão de crescimento e desenvolvimento comparáveis aos frutos dos controles MT e MT-*Rg1*. Já na classe II, é possível perceber indeterminação do desenvolvimento, além da fusão de frutos. Na classe III ocorre um aumento da indeterminação juntamente com a produção de novas estruturas vegetativas. A classe IV apresenta os fenótipos mais extremos,

com grande aumento da indeterminação, produzindo uma série de estruturas ectópicas a partir do fruto. A fim de associar o grau de severidade do fenótipo com a expressão do transgene em questão, foi avaliado o acúmulo do microRNA miR156 maduro nos frutos de membros representativos das diferentes classes fenotípicas. Para tanto, foi realizado *stem loop* RT-qPCR (ver item 3.8), o que demonstrou uma robusta correlação entre o acúmulo do microRNA156 maduro e a indeterminação do fruto (Figura 15).

Figura 15 - Correlação entre o acúmulo do microRNA156 maduro e o fenótipo indeterminado em oito eventos transgênicos independentes

As características apresentadas nos frutos dos eventos transgênicos assemelham-se principalmente a dois mutantes já descritos em tomateiro. Primeiramente, o mutante *clausa: shootyleaf (clau: shl)*, o qual foi descrito como sendo uma fenocópia parcial de transgênicos superexpressando o gene *Knox* classe I *Tkn2* (AVIVI et al., 2000). Dentre as várias diferenças observadas nesse mutante, a que mais chama atenção é a presença de óvulos ectópicos, o que proporciona a formação de estruturas meristemáticas no lugar dos óvulos, sendo esta a principal característica responsável pela formação de frutos indeterminados. Diferentemente

das plantas selvagens, este mutante apresenta evidente expressão de *Tkn2* ao redor do saco embrionário após a antese. Desta forma, os autores sugerem que os fenótipos descritos são devido à perda de função de algum fator genético, o qual regula negativamente a expressão do gene *Tkn2*. Adicionalmente, nosso grupo de pesquisa, conjuntamente com o prof. Dr. Lázaro Peres, verificou que esta mutação se situa no braço curto do cromossomo quatro de tomateiro (KHUSH; RICK, 1967), mesma região na qual é encontrada uma das SPLs (*SlySPL2*) reguladas negativamente pelo microRNA156. Tais evidências sugeriram que, talvez, a perda de função de um fator de transcrição do tipo SPL seria responsável por alguns fenótipos apresentados pelo mutante *clau: shl* (Figura 16). Após análise do acúmulo do transcrito do gene *SlySPL2* no mutante *clausa*, introgridido no *background* micro-Tom, averiguou-se que tal hipótese não estava correta, visto que não há redução na expressão deste transcrito no fruto (dados não mostrados). É possível que vias genéticas associadas a outras SPLs possam ter sido modificadas no mutante *clau: shl*. Portanto, foi avaliado o acúmulo de transcritos do miR156 e cinco outros genes *SPLs* em frutos de tomateiro MT e do MT- *clau:shl*. Embora o nível de transcritos do miR156 seja maior no mutante quando comparado aos frutos MT (Figura 21), os níveis de transcritos das *SPLs* não foram afetados (dados não mostrados). Portanto, novos experimentos necessitam ser realizados, visto que a expressão gênica foi avaliada em apenas um estágio de desenvolvimento do fruto. É possível que modificações de expressão gênica do miR156 e algumas *SPLs* tenham ocorrido em estágios bem iniciais do desenvolvimento dos frutos (Estágio 1 e 2, por exemplo) do mutante MT-*clau:shl*, os quais não foram ainda avaliados. Tais modificações podem ser o efeito causal do fenótipo similar de indeterminação do desenvolvimento do fruto observado no mutante e nos transgênicos superexpressando o miR156 em tomateiro (Figura 16).

Figura 16 - Comparação morfológica entre fruto do mutante *clau: shl* (a) e evento MT 156-1(b)

Outro mutante apresentando modificações no desenvolvimento do fruto, *fasciated (fas)*, foi caracterizado como uma mutação em um fator de transcrição do tipo *YABBY*, a qual leva ao extremo aumento do tamanho do fruto (CONG; BARRERO; TANKSLEY, 2008). Quanto menor a expressão do transcrito *FASCIATED*, maior é o número de lóculos obtidos no fruto. Transgênicos superexpressando o gene *p35S::AtMIR156b* apresentaram frutos multi-loculares, o que sugere uma possível redução no acúmulo do transcrito *FASCIATED*. Além disso, já existe correlação de regulação genética descrita entre genes *YABBY* e *Knox* (HAY; TSIANTIS, 2010). Estes autores sugerem uma possível regulação negativa exercida por *YABBY* no controle da expressão de genes *Knox*. A hipótese estudada nesse atual estudo corrobora para tal regulação, visto que o menor acúmulo de *FASCIATED* levaria a menor inibição de genes *Knox* o que, por sua vez, pode levar ao fenótipo apresentado pelas plantas transgênicas. No entanto, a avaliação do acúmulo de transcritos do gene *FASCIATED*, no estágio de desenvolvimento avaliado, sugere que não há diferenças entre os frutos transgênicos e controles (dados não mostrados). Entretanto, tal como discutido para o mutante *clau: shl*, novos experimentos serão realizados para avaliar a expressão desse gene em estágios iniciais do desenvolvimento dos frutos.

Durante todo o desenvolvimento das plantas transgênicas, foi possível perceber que os diferentes eventos apresentavam folhas menores quando comparadas ao MT-*Rg1* (Figura 17B). Resultado semelhante foi observado por ZHANG et al., 2010 que superexpressaram em tomateiro cv. *Ailsa Craig* fragmento de 213pb referente ao precursor do microRNA157 (acesso LEFL 1098BH06). Os

microRNAs miR156 e miR157 são agrupados na mesma família gênica, embora apresentem variações na sequência madura do microRNA (miRbase v.18). O anexo 1 mostra alinhamento entre as sequências maduras do miR156 e miR157 de *Arabidopsis* e tomateiro, mostrando que existem diferenças de nucleotídeos nas posições 11 e 14. Tais modificações podem alterar a eficiência de pareamento entre o microRNA e o mRNA-alvo, reduzindo o efeito do silenciamento gênico (VOINNET, 2009).

Interessantemente, ZHANG et al., 2010 não observaram aumento da indeterminação dos frutos em seus eventos transgênicos superexpressando o precursor *MIR157* de tomateiro. Recentemente, foi publicado trabalho mostrando a organização e expressão dos genes *SPLs* em tomateiro, juntamente com os genes dos microRNAs miR156 e miR157 (SALINAS et al., 2011). Esses autores observaram diferenças no acúmulo de transcritos do miR156 e miR157 nos diferentes estágios de desenvolvimento do fruto. Tais diferenças, aliadas as diferenças em dois nucleotídeos entre os microRNAs miR156 e miR157, podem ser responsáveis pela falta do fenótipo nos frutos dos transgênicos em ZHANG et al., 2010. Além disso, os autores não avaliaram quantitativamente o acúmulo de transcritos do miR157 nos frutos transgênicos (ZHANG et al., 2010).

Além de modificações na estrutura vegetativa e nos frutos, foi possível perceber que a estrutural floral foi alterada, modificando tanto o número quanto a forma dos verticilos florais (Figura 17A). De forma semelhante, a superexpressão do gene *Tkn2* sob o controle do promotor CaMV35S em tomateiro produziu, entre vários efeitos no desenvolvimento da planta, flores com estrutura alterada, o que desencadeou a produção de frutos anormais (JANSSEN; LUND; SINHA, 1998). O mutante *Me* (PARNIS et al., 1997) também apresenta modificações semelhantes durante o seu desenvolvimento. Interessante ressaltar que por se tratar de uma mutação natural, os efeitos citados são mais brandos quando comparados ao transgênico *p35S::Tkn2*. Estas semelhanças fenotípicas sugerem que a produção de frutos indeterminados possa ser devido a alterações no padrão de expressão de genes do tipo *Knox* classe I.

Figura 17 - Comparação morfológica de folhas e flores de três eventos transgênicos e o controle MT-*Rg1*. A) flores de estágios de desenvolvimento aproximados. B) Folhas em estágios semelhantes de desenvolvimento. Note o menor tamanho nas folhas dos três eventos transgênicos

Finalmente, em alguns eventos transgênicos, observou-se formação de estruturas indeterminadas nos órgãos vegetativos. Algumas plantas produziram estruturas indeterminadas nos ápices vegetativos, sugerindo a perda da determinação durante o desenvolvimento da planta (Figura 11 B e C). A Figura 11A mostra as diferenças entre MT-*Rg1* e *Rg1* 156-6, com ênfase para o aumento da brotação lateral como já demonstrado para arroz, milho e *arabidopsis*. (XIE; WU; XIONG, 2006; CHUCK et al., 2007; SCHWAB et al., 2005).

As diferentes cultivares de tomateiro apresentam mutações específicas conferindo características peculiares que as definem como tais. A fim de demonstrar que os fenótipos observados, principalmente, aumento da brotação lateral e indeterminação do fruto, não são dependentes do *background* MT ou MT-*Rg1*, foi realizado cruzamento com a cultivar comercial Santa Clara. Esta cultivar não apresenta nenhuma das três mutações descritas para MT que produzem o seu crescimento determinado e pequeno porte. Na Figura 18A está representado um indivíduo F1 do cruzamento entre Santa Clara x MT-*Rg1* 156-19 segregando para o transgene e assim apresentando fenótipo selvagem. Indivíduos F1 resultantes do cruzamento Santa Clara x MT-*Rg1* 156-19 e Santa Clara x MT-*Rg1* 156 -18, respectivamente, mantiveram os fenótipos citados previamente descritos nos *backgrounds* MT e MT-*Rg1* (Figuras 18 B e C). Tais resultados demonstram que o aumento da brotação lateral e indeterminação do desenvolvimento do fruto não apresentam dependência de *background* e são respostas a presença do transgene *AtMIR156b* sob o controle do promotor constitutivo 35S.

Figura 18 - Avaliação fenotípica dos transgênicos superexpressando *AtMIR156b* no *background* Santa Clara. A) segregante selvagem oriundo do cruzamento Santa Clara x *miR156-19*. B) Santa Clara x *miR156-19*. C) Santa Clara x *miR156-18*. Note a manutenção do fenótipo de aumento de brotação lateral e desenvolvimento de frutos secundários indicados pelas setas vermelhas

4.5 Avaliação anatômica dos ovários

Com o intuito de caracterizar detalhadamente o desenvolvimento dos frutos transgênicos produzidos, foram realizados cortes anatômicos de ovários pós-antese de eventos transgênicos, dos mutantes *Me* e *clausa* (por apresentarem indeterminação no desenvolvimento do fruto) além dos controles nos dois *backgrounds* MT e MT-*Rg1*. O controle MT não apresentou nenhuma modificação na estrutura do seu ovário (Figura 19 A), da mesma forma que o *background* MT-*Rg1* (dados não mostrados). Foi possível visualizar a presença de células meristemáticas nos eventos 156-18, 156-19 e nos mutantes *Me* e *clau* as quais provavelmente são responsáveis pela produção das estruturas ectópicas descritas anteriormente (Figura 19 G, H e I). No evento 156-1, foi possível perceber a produção de um grande número de estruturas meristemáticas, as quais foram responsáveis pela completa desestruturação do ovário nesta planta além da produção de estruturas ectópicas

vegetativas como visualizado na Figura 19 C. Flores desse evento foram incapazes de serem fertilizadas e produzir frutos com sementes (Figura 19 C e K). Portanto, este evento foi mantido durante todos os procedimentos via a técnica de estaquia.

Ovários dos mutantes *Me* e *clau* não apresentaram a formação de meristemas ectópicos, embora possuam células do tipo meristemáticas na região de formação dos óvulos (Figura 19 H e I). Tais células foram também visualizadas nos eventos transgênicos MT *Rg1* 156-19 e MT *Rg1* 156-18 (Os cortes anatômicos deste último evento não foram mostrados por apresentarem características bastante semelhantes ao evento 156-19). Interessante ressaltar que no evento MT-*Rg1* 156-9, mesmo com a presença do meristema ectópico, o ovário manteve-se viável produzindo frutos com sementes. A produção de pólen foi severamente afetada, fazendo com que fosse necessário polinizar os ovários com pólen advindo de MT selvagem, para obtenção das próximas gerações.

Figura 19 - Visão anatômica dos ovários e morfológica dos frutos. A) MT B) MT-*Rg1* 156-19 C) MT 156-1 D) *Me*. E) *clausa* F) aumento de 40x MT G) aumento de 20x MT-*Rg1* 156-19 mostrando a presença de células meristemáticas (setas vermelhas) no ovário. H) aumento de 20x *Me* mostrando a presença de células meristemáticas (setas vermelhas) no ovário. I) aumento de 20x *clausa* mostrando a presença de células meristemáticas (setas vermelhas) no ovário. J) Meristema ectópico visualizado no evento MT *Rg1* 156-9. K) Meristema ectópico visualizado no evento MT 156-1. A barra escura representa 2 mm em todas as imagens

4.6 Identificação *in silico* de genes / Filogenia SPLs de tomateiro

Para avaliação da expressão nos frutos transgênicos, foram identificados genes de interesse em *Solanum lycopersicum*. Foram obtidas as sequências referentes a oito genes *SPLs*, três genes MADS-BOX (*TDR4*, *MC*, *TAG1*), o gene *Knox I Tkn2*, gene *YABBY FASCIATED*, dois microRNAs (miR156 e miR172), além do controle endógeno *tubulina*. Todos os genes citados já haviam sido descritos em artigos científicos (ZHANG et al., 2010; SALINAS et al., 2011; ERIKSSON et al., 2004; VREBALOV et al., 2002; PAN et al., 2010; JANSSEN; LUND; SINHA, 1998; CONG; BARRERO; TANKSLEY, 2008; WU et al., 2009; MOUNET et al., 2009). Para os genes *SPLs*, foi construído dendograma de similaridade a fim de propor possíveis ortologias entre os genes de tomateiro e de

arabidopsis. Foi possível identificar oito genes *SPLs* que possuem sítio de regulação para o microRNA156. RHOADES et al., 2002 descrevem que dos 16 membros da família de FTs *SPL* em *Arabidopsis thaliana*, dez são regulados pelo miR156. Os oito membros de tomateiro identificados também foram encontrados em trabalho posterior de SALINAS et al., 2011. Os autores identificaram oito membros extras, totalizando 16, dos quais dez possuem sítio de regulação pelo microRNA 156. Os agrupamentos obtidos na Figura 20 foram semelhantes aos obtidos por SALINAS et al., 2011, corroborando a hipótese de ortologia dos genes *SPLs* entre arabidopsis e tomateiro.

Figura 20 - Dendrograma de similaridade comparando as sequências identificadas em *Solanum lycopersicum* com *Arabidopsis thaliana*. O dendrograma final foi gerado utilizando-se o programa MEGA 4.0, com o modelo de comparação *Neighbor-joining*, método de distância *p* e supressão *pair-wise*. A robustez dos ramos gerados na árvore pôde ser medida pelo teste probabilístico de *bootstrap*, originado a partir de 1000 replicatas

4.7 Análise da expressão de genes via qRT-PCR

A análise do acúmulo dos vários transcritos identificados na sessão anterior, e descritos na Tabela 1, foi realizada dividindo as amostras de acordo com

o *background* genético a qual cada uma pertencia. Dessa forma, os dados foram divididos em dois grupos: controle MT, o evento transgênico MT-156 1 e os mutantes *Me* e *clau* (estes mutantes foram introgrididos no *background* MT e encontram-se isogênicos). O controle MT-*Rg1* juntamente com os dois eventos transgênicos *Rg1* 156-18 e *Rg1* 156-19 formaram o segundo grupo de amostras.

MiR156 regula a expressão de miR172 via a ação da proteína SPL9 em *arabidopsis*, a qual conjuntamente com SPL10, diretamente promove a expressão do gene *MIR172b* (WU et al., 2009). Tanto o miR156 quanto o miR172 são regulados positivamente por seus FTs alvos (WU et al., 2009), sugerindo a existência de *feedback* negativo que contribui para a estabilidade das fases juvenis e adulta (WU et al., 2009). Estudos recentes tem demonstrado que estas duas famílias de microRNAs desempenham papéis cruciais nas mudanças de fase do desenvolvimento, sendo que o miR156 é altamente expresso no início do desenvolvimento e diminui sua expressão com o passar do tempo, enquanto miR172 apresenta o padrão oposto de expressão (WU et al., 2009).

A superexpressão do microRNA miR156 nos eventos avaliados mostrou-se bastante variável podendo ser relacionada ao nível de indeterminação produzido nas plantas avaliadas (Figura 15). No *background* MT-*Rg1* foi obtido superexpressão em torno de 400 vezes (156-19) e 800 vezes (156-18), quando comparados ao controle (Figura 21). Já no *background* MT, foi obtido superexpressão em torno de 4000 vezes no evento MT 156-1, o qual apresenta fenótipo extremo quando comparado aos outros eventos obtidos, corroborando a hipótese de que a severidade do fenótipo é dependente do nível de acúmulo de transcritos do transgene. Interessantemente, frutos dos mutantes *Me* e *clau* apresentaram aumento no acúmulo do transcrito miR156 em torno de 25 e 20 vezes, respectivamente, se comparados ao controle (Figura 21). Até o momento não há registros na literatura de interação de genes *Knox* nas vias reguladas por miR156. Talvez *Tkn2* ou algum outro membro possa atuar promovendo a ação do miR156 e desencadeando, entre outros fenótipos, a manutenção de características juvenis. Tais características estão presentes em todos os órgãos/tecidos do mutante *Me* (PARNIS et al., 1997). Visto que a expressão do miR156 caracteriza a manutenção do estado juvenil com proliferação meristemática e produção de ramos vegetativos (WU et al., 2009), os fenótipos observados no frutos e nas plantas dos três eventos avaliados podem ser interpretados como a manutenção de um estado indeterminado

sugerindo que a via MiR156/ SPL controle a determinação do desenvolvimento de forma global e não apenas em estágios específicos do desenvolvimento. Adicionalmente foi possível perceber que o gene *Tkn2* interage de alguma forma ainda não conhecida com a via miR156/SPL como pode ser visualizado no modelo de controle da determinação proposto (Figura 23).

Diferentemente dos dados observados por WU et al.,2009, não foi observado redução significativa no acúmulo do miR172 nos frutos. É possível que a regulação entre esses dois microRNAs, por meio do gene *SPL9* (*Arabidopsis thaliana*) não seja conservada ou não ocorra durante o estágio de desenvolvimento do fruto em tomateiro avaliado, visto que o provável ortólogo deste gene *SlySPL9/15* apresentou considerável redução do seu acúmulo nos dois *backgrounds* avaliados (Figura 22).

Figura 21 - Acúmulo dos microRNAs maduros miR156 e miR172 em três eventos transgênicos, mutantes *Me* e *clau* além dos controles nos dois *backgrounds* adotados. O nível do transcrito é representado no eixo Y como uma razão (expressão relativa) do valor absoluto da expressão de cada microRNA pelo valor absoluto da expressão do gene normalizador *Tubulina*. No eixo X estão representadas as diferentes amostras avaliadas e as barras verticais representam o desvio padrão de três amostras biológicas

Foram observados diferentes padrões de acúmulo de transcritos entre os membros da família SPL identificados no presente trabalho. Os genes *SlySPL2* e *SlySPL2b* apresentaram silenciamento nos dois *backgrounds*, incluindo o mutante *Me* (Figura 22). Neste último, a diferença foi muito pequena não sendo, talvez, suficiente para produzir os fenótipos já descritos para o ortólogo desse gene em *arabidopsis* *SPL2*, que conjuntamente com *SPL10*, *SPL11* e *SPL3*, regulam a mudança de fase vegetativa para reprodutiva (SHIKATA et al., 2009). Resultado semelhante foi obtido por ZHANG et al., 2010, que em estágios de desenvolvimento compatíveis aos analisados no presente trabalho, obtiveram silenciamento do transcrito referente ao gene *SlySPL2*. O gene *SlySPL3a* apresentou padrão de silenciamento nos dois *backgrounds* avaliados (Figuras 22). *AtSPL3*, seu provável ortólogo em *arabidopsis*, apresentou padrão semelhante nos transgênicos superexpressando miR156 (SCHWAB et al., 2005). Interessantemente já foi

demonstrado que este gene apresenta função crucial no controle do tempo de florescimento, uma vez que ativa diretamente os genes *AP1*, *FUL* e *LFY* (YAMAGUCHI et al., 2009). O atraso no florescimento foi claro nos eventos transgênicos de tomateiro, corroborando a ideia que tal regulação é mantida em *Solanum lycopersicum*. Em *arabidopsis*, *SPL3*, *SPL9* e *SPL15* não apenas promovem o florescimento atuando na rota indutora via fotoperíodo, como também definem uma via separada controladora do florescimento (WANG; CZECH; WEIGEL, 2009). Dessa forma, a diminuição do acúmulo do transcrito *SlySPL9/15* nos dois *backgrounds* (Figura 22) está provavelmente associada ao atraso no florescimento visualizado em todos os eventos transgênicos avaliados.

Diferentemente de *arabidopsis*, em tomateiro o gene *SPL3* apresenta-se duplicado e o novo membro possui função diferenciada relacionada ao amadurecimento do fruto carnoso (MANNING et al., 2006). A cópia extra deste gene é conhecida como *SPL3-CNR* e apresentou-se silenciado nos dois eventos no *background* MT-Rg1. Tanto o evento MT 156-1 quanto o mutante *Me* não apresentaram mudanças no seu padrão de acúmulo (Figura 22). Adicionalmente, MOXON et al., 2008 mostraram via 5' RACE que tanto *SlySPL3a* quanto *CNR* são silenciados via o microRNA miR156. Interessantemente, após avaliar o acúmulo de *CNR* durante o desenvolvimento do fruto, os mesmos autores perceberam que o aumento na expressão de *CNR* em um estágio específico não foi correlacionado a nenhuma mudança no acúmulo do miRNA. É possível que a expressão de miR156/157 e *CNR* se sobrepõem apenas parcialmente e a atuação deste miRNA suprimindo seus alvos possa ser tipo celular específica (MOXON et al., 2008). Ao avaliar expressão de miRNAs e seus genes alvos espera-se que ocorra uma correlação negativa entre o acúmulo do mRNA e o microRNA maduro, mas existem exemplos mostrando que nem sempre ocorre dessa maneira. ACHARD et al., 2004 demonstraram que *MYB33*, possível alvo do miR159, não apresentou correlação negativa no seu acúmulo em relação ao microRNA. LLAVE et al., 2002 reportaram uma correlação positiva entre o miR171 e seus genes alvos.

Já os genes *SlySPL6a* e *SlySPL6c* apresentaram diminuição do seu acúmulo independente do *background* analisado (Figura 22). SALINAS et al., 2011 relatam que o grupo de genes agrupados com *SPL6* são pouco conhecidos em termos de função, mesmo em *arabidopsis*, não possuindo associação a nenhuma mudança de fenótipo já descrita. Neste mesmo trabalho, é mostrado que tais genes apresentam-

se expressos nos órgãos florais, mas não são detectados nos órgãos vegetativos, sugerindo funções no aspecto reprodutivo e talvez no desenvolvimento do fruto. Além disso, o transcrito *SlySPL6c* não apresentou mudança de expressão no mutante *Me* (Figura 22), o qual apresenta pouco ou nenhum fenótipo associado a indeterminação do fruto. Isto sugere que talvez este gene possa estar associado com as modificações extremas visualizadas no desenvolvimento do fruto dos eventos transgênicos produzidos.

A produção de plântulas transgênicas contendo *AtSPL13* resistente ao miR156 levou a um atraso na emergência das folhas verdadeiras (MARTIN et al., 2010). Independentemente do processo de emergência citado, é possível que o seu homólogo em tomateiro (*SlySPL13*) não apresente função associada ao desenvolvimento do fruto. O papel do gene *SlySPL13* não está claro no desenvolvimento pois parece ser dependente do genótipo avaliado, visto que foi reprimido apenas nos transgênicos MT-*Rg1* (Figura 22).

Entre os oito genes *SPLs* avaliados, cinco foram testados no trabalho de ZHANG et al., 2010 apresentando resultados semelhantes quanto ao silenciamento. Interessante ressaltar que, mesmo apresentando diminuição drástica no acúmulo de transcritos *CNR*, os frutos das plantas produzidas por ZHANG et al., (2010) não apresentaram fenótipo relativo a modificações no amadurecimento relatadas no mutante *Cnr* (MANNING et al., 2006). Como a mutação no mutante *Cnr* é de carácter epigenético, via metilação de DNA, as modificações de expressão no gene *CNR* podem ser célula e estágio de desenvolvimento específico, os quais não foram modificados nas nossas plantas transgênicas.

Figura 22 - RT-qPCR mostrando o acúmulo de oito SPLs diferentes em dois *backgrounds* diferentes. A) *background* MT B) *background* MT-Rg1. O nível do transcrito é representado no eixo Y como uma razão (expressão relativa) do valor absoluto da expressão de cada SPL pelo valor absoluto da expressão do gene normalizador *Tubulina*. No eixo X estão representadas as diferentes amostras avaliadas e as barras verticais representam o desvio padrão de três amostras biológicas

Interessantemente, os níveis de transcritos de alguns genes *SPLs* são reduzidos nos frutos de plantas mutantes *Me* (Figura 22). Esses dados, aliados ao aumento do acúmulo de transcritos do miR156, sugerem que o gene *Tkn2*, direta ou indiretamente, afeta a via genética miR156/SPL (Figura 23). O promotor responsável pela expressão do transcrito *Tkn2* no mutante *Me* é do gene *6-FOSFATO FRUTOSE FOSFOTRANSFERASE* (PARNIS et al.,1997), o qual não apresenta expressão constitutiva e pode sofrer regulação por vários outros genes devido a presença de elementos regulatórios na sua sequência. Talvez esta diferença no controle da expressão seja responsável pela repressão seletiva apenas de algumas *SPLs* e não de todas no fruto do mutante *Me*. É importante ressaltar que mesmo tendo um transcrito fusionado, a proteína Tkn2 é funcional nas plantas mutantes *Me*

(PARNIS et al., 1997). Portanto, é possível que o fator de transcrição *Tkn2* regule transcricionalmente fatores que afetam a via miR156/SPL. Tal regulação será investigada em experimentos futuros, não somente nos tecidos de frutos, mas também em tecidos foliares.

Figura 23 - Modelo do controle da determinação do desenvolvimento envolvendo o microRNA miR156 e os genes *SPLs*, *MADS-Box* e *TKn2*

Com o intuito de avaliar qual a relação do gene *TKn2* e a via genética miR156/SPL, transcritos desse gene foram quantificados nos frutos das plantas transgênicas. Não houve mudança significativa no acúmulo de transcritos do *TKn2* nos frutos dos eventos transgênicos avaliados (Figura 24). O mutante *Me* foi utilizado como controle para o acúmulo do transcrito *TKn2* nesta análise (PARNIS et al., 1997). AVIVI et al., 2000 mostraram que no mutante *clausa:shootyleaf*, o qual é capaz de produzir frutos secundários, a diferença na expressão de *Tkn2* é temporal e não quantitativa. Em frutos das plantas controle, a expressão de tal gene no carpelo é confinada ao período pré-antese enquanto que no mutante, a presença de seus transcritos é evidente em diferentes camadas celulares ao redor do saco embrionário após a antese (AVIVI et al., 2000). É possível que modificações na expressão do gene *TKn2* nos eventos transgênicos tenham sido espaço-temporal e não quantitativa. Tal hipótese será testada posteriormente com a avaliação do acúmulo do transcrito *Tkn2* em dois diferentes estágios de desenvolvimento do ovário além da análise espacial de sua expressão nos ovários via hibridização *in situ*.

Figura 24 - Acúmulo do gene *Knox* classe I *Tkn2* via RT-qPCR em frutos estágio três de desenvolvimento. O nível do transcrito é representado no eixo Y como uma razão (expressão relativa) do valor absoluto da expressão de *Tkn2* pelo valor absoluto da expressão do gene normalizador *Tubulina*. No eixo X estão representadas as diferentes amostras avaliadas e as barras verticais representam o desvio padrão de três amostras biológicas

Em *arabidopsis* já foi demonstrado que a proteína SPL3 se liga diretamente a três outros fatores de transcrição (*LFY*, *AP1* e *FUL*), regulando o tempo de florescimento (YAMAGUCHI et al., 2009). Portanto, a manutenção de tal regulação gênica foi avaliada em frutos de tomateiro. O gene *TDR4* foi reprimido nos eventos MT-*Rg1* 156-18 e MT-*Rg1* 156-19. Nos frutos de fenótipo indeterminado mais extremo (MT 156-1), a modificação de expressão do *TDR4* não foi conclusiva (Figura 25).

Diferentemente do observado para o gene *TDR4*, os níveis de transcritos do gene *MC* foram consistentemente reduzidos nos frutos dos transgênicos, independentemente do *background* avaliado (Figura 25). Além disso, a expressão do gene *MC* não foi alterada nos frutos do mutante *Me* (Figura 25), os quais não produzem estruturas ectópicas aparentes. Conjuntamente, esses dados sugerem que o gene *MC*, ou fatores controlados pelo mesmo, são importantes para a manutenção da determinação do desenvolvimento do fruto de tomateiro, podendo, portanto, reprimir a formação de estruturas ectópicas. A estrutura do locus codificante para *MC* foi avaliada a fim de encontrar possíveis sítios de regulação em *cis* para proteínas SPL. De forma comparativa ao ortólogo de *arabidopsis* *AP1*, este gene apresentou vários prováveis sítios em *cis* de ligação para SPLs (Anexo 2). LOHMANN; WEIGEL, 2002 descrevem que, na ausência dos genes *LFY* e *AP1* em

arabidopsis, as flores são repostas por ramos vegetativos ou flores com características vegetativas. Comparativamente, a diminuição de expressão do gene *MC* nos frutos transgênicos pode ter levado a produção de estruturas vegetativas ectópicas, como observado, por exemplo, no evento MT-*Rg1* 156-6 (Figura 15).

Outro gene MADS-Box, o *TAG1*, ao ser silenciado apresentou indeterminação do desenvolvimento do fruto sendo capaz de produzir frutos secundários (PAN et al., 2010). Dessa forma, decidiu-se avaliar a expressão deste gene como um possível efector do fenótipo indeterminado observado em nossos eventos transgênicos. Interessante ressaltar que, nas plantas transgênicas silenciando o gene *TAG1*, ocorreu a indeterminação do quarto verticilo sem reversão da identidade meristemática, ou seja, apenas outros frutos foram produzidos sem a presença de estruturas ectópicas vegetativas. O padrão de expressão de *TAG1* foi avaliado em frutos estágio três nos transgênicos superexpressando *AtMIR156b*, não apresentando modificações no seu padrão de expressão quando comparado ao controle MT-*Rg1* (Anexo 3). Como os nossos transgênicos apresentam reversão na identidade meristemática, possivelmente outros genes do tipo MADS-Box tenham sido afetados, tal como o *TM29* (AMPOMAH-DWAMENA et al., 2002).

Figura 25 - Acúmulo dos genes MADS-Box *MACROCALYX* (MC) e *TDR4* via RT-qPCR em frutos estágio três de desenvolvimento. O nível do transcrito é representado no eixo Y como uma razão (expressão relativa) do valor absoluto da expressão de cada gene pelo valor absoluto da expressão do gene normalizador *Tubulina*. No eixo X estão representadas as diferentes amostras avaliadas e as barras verticais representam o desvio padrão de três amostras biológicas

Avaliando as novas funções assumidas por genes SPLs em tomateiro, pode-se especular que talvez tenha ocorrido diversificação de função do FT SPL3 de *Arabidopsis thaliana* na linhagem na qual *Solanum lycopersicum* pertence. Já foi demonstrado para outros grupos gênicos como para o gene *AGAMOUS* de *Arabidopsis*, que em tomateiro é duplicado (*TAG1* e *TAGL1*), assumiu novas funções relacionadas ao amadurecimento do fruto. Da mesma forma, é possível que *SPL3(CNR)* e *SlySPL3a* assumiram funções diferenciadas, sendo a primeira associada ao processo de amadurecimento enquanto que *SPL3a* é regulada pelo miR156 e controla a determinação do desenvolvimento do fruto. Entretanto, experimentos com plantas transgênicas superexpressando isoforma do gene *SPL3a* resistente ao miR156 são necessários para realmente validar tal hipótese.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com base nos resultados apresentados conclui-se que:

- Dentre os 22 eventos produzidos foi possível estabelecer uma correlação robusta entre o aumento do acúmulo do microRNA156 maduro e aumento da indeterminação no fruto.
- A produção de estruturas ectópicas no fruto ocorreu devido à presença de estruturas e células meristemáticas no interior do quarto verticilo floral.
- Os principais fenótipos encontrados nos transgênicos, incluindo a indeterminação dos frutos, mostraram-se não ser dependente do *background* genético em que o transgene foi inserido.
- Dentre os oito genes *SPLs* avaliados, todos se mostraram silenciados nas plantas transgênicas superexpressando o microRNA miR156.
- Não houve aumento considerável do transcrito *Tkn2* demonstrando que provavelmente tenha havido uma modificação espaço-temporal e não quantitativa deste transcrito no ovário e consequentemente no desenvolvimento inicial do fruto.
- A redução da expressão, em torno de 20 vezes, nos três eventos transgênicos avaliados sugere atuação do gene *MADS-MC* no controle da determinação do desenvolvimento do fruto.
- Aumento no nível de expressão do microRNA156, bem como redução dos transcritos de pelo menos três *SPLs* avaliados foram detectados nos frutos do mutante *Mouse-ears*.

Com o intuito de produzir dados mais robustos capazes de descrever o que realmente está acontecendo no desenvolvimento do fruto destas plantas transgênicas, será avaliada a expressão de todos os genes citados em dois estágios do desenvolvimento do ovário sendo um pré e o outro pós-antese. Em todos estes tecidos, além dos genes descritos acima, será avaliado o acúmulo de transcritos do gene *TM29*, o qual parece estar relacionado ao processo de determinação do desenvolvimento do fruto (AMPOMAH-DWAMENA et al., 2002). Também será avaliado o padrão de expressão dos transcritos *SlySPL3a*, *SlySPL6a*, *MADS-MC* e

Tkn2 via hibridização *in situ* no desenvolvimento dos ovários das plantas transgênicas, mutante *Me* e plantas MT.

REFERÊNCIAS

- ACHARD, P. HERR, A.; BAULCOMBE, D. C.; HARBERD, N. P. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. **Development**, Cambridge, v. 131, n. 14, p. 3357-3365, Jul 2004.
- AMPOMAH-DWAMENA, C.; MORRIS, B.A.; SUTHERLAND, P.; VEIT, B.; YAO, J. L. Down-regulation of TM29, a tomato SEPALLATA homolog, causes parthenocarpic fruit development and floral reversion. **Plant Physiology**, Washington, v. 130, n. 2, p. 605-617, Oct 2002.
- AUKERMAN, M.J.; SAKAI, H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 11, p. 2730-2741, Nov 2003.
- AVIVI, Y. LEV-YADUN, S.; MOROZOVA, N.; LIBS, L.; WILLIAMS, L.; ZHAO, J.; VARGHESE, G.; GRAFI, G.. Clausa, a tomato mutant with a wide range of phenotypic perturbations, displays a cell type-dependent expression of the homeobox gene LeT6/TKn2. **Plant Physiology**, Washington, v. 124, n. 2, p. 541-551, Oct 2000.
- BUSI, M.V.; BUSTAMANTE, C.; D'ANGELO, C.; HIDALGO-CUEVAS, M.; BOGGIO, S.B.; VALLE, E.M.; ZABALETA, E. MADS-box genes expressed during tomato seed and fruit development. **Plant Molecular Biology**, Dordrech v. 52, n. 4, p. 801-815, 2003.
- CAMPOS, M.L.; CARVALHO, R.F.; BENEDITO, V.A.; PERES, L.E.P.. Small and remarkable: the Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 5, n. 3, p. 267, 2010.
- CARDON, G.; HOHMANN, S.; KLEIN, J.; NETTESHEIM, K.; SAEDLER, H.; HUIJSER, P. Molecular characterisation of the Arabidopsis SBP-box genes. **Gene**, Amsterdam, v. 237, n. 1, p. 91-104, Sep 3 1999.
- CHEN, X. Small RNAs and Their Roles in Plant Development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 25, p. 21-44, 2009
- CHEN, X. ZHANG, Z.; LIU, D.; ZHANG, K.; LI, A.; MAO, L. SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like Transcription Factors: Star Players for Plant Growth and Development. **Journal of Integrative Plant Biology**, Oxford, v. 52, n. 11, p. 946-951, Nov 2010.
- CHITWOOD, D.H. GUO, M.; NOGUEIRA, F.T.S.; TIMMERMAN, M.C.P. Establishing leaf polarity: the role of small RNAs and positional signals in the shoot apex. **Development**, Cambridge, v. 134, n. 5, p. 813-823, Mar 1 2007.

CHITWOOD, D.H.; NOGUEIRA, F.T.S.; HOWELL, M.D.; MONTGOMERY, T.A.; CARRINGTON, J.C.; TIMMERMAN, M.C.P. Pattern formation via small RNA mobility. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 23, n. 5, p. 549-554, Mar 1 2009.

CHUCK, G.; CIGAN, A.M.; SAETERN, K.; HAKE, S. The heterochronic maize mutant Corngrass1 results from overexpression of a tandem microRNA. **Nature Genetics**, New York, v. 39, n. 4, p. 544-549, Apr 2007.

CONG, B.; BARRERO, L.S.; TANKSLEY, S.D. Regulatory change in YABBY-like transcription factor led to evolution of extreme fruit size during tomato domestication. **Nature Genetics**, New York, v. 40, n. 6, p. 800-804, Jun 2008.

CONG, B.; LIU, J.P.; TANKSLEY, S.D. Natural alleles at a tomato fruit size quantitative trait locus differ by heterochronic regulatory mutations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 21, p. 13606-13611, Oct 15 2002.

DAN, Y.H.; YAN, H.; MUNYIKWA, T.; DONG, J.; ZHANG, Y.L.; ARMSTRONG, C.L. MicroTom-a high-throughput model transformation system for functional genomics. **Plant Cell Reports**, New York, v. 25, n. 5, p. 432-441, May 2006.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical bulletin**, London, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.

ERIKSSON, E.M.; BOVY, A.; MANNING, K.; HARRISON, L.; ANDREWS, J.; DE SILVA, J.; TUCKER, G.A.; SEYMOUR, G.B. Effect of the Colorless non-ripening mutation on cell wall biochemistry and gene expression during tomato fruit development and ripening. **Plant Physiology**, Washington, v. 136, n. 4, p. 4184-4197, Dec 2004.

FENG, J.; WANG, K.; LIU, X.; CHEN, S.; CHEN, J. The quantification of tomato microRNAs response to viral infection by stem-loop real-time RT-PCR. **Gene**, Amsterdam, v. 437, n. 1/2, p. 14-21, May 15 2009.

FILGUEIRA, F.A.R. **Solanáceas**: Agrotecnologia moderna na produção de tomate, batata, pimentão, pimenta, berinjela e jiló. Lavras: UFLA, 2003. 331p.

FRARY, A.; NESBITT, T.C.; GRANDILLO, S.; VAN DER KNAAP, E.; CONG, B.; LIU, J.P.; MELLER, J.; ELBER, R.; ALPERT, K.B.; TANKSLEY, S.D. fw2.2: A quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. **Science**, Washington, v. 289, n. 5476, p. 85-88, Jul 7 2000.

FU, C.; SUNKAR, R.; ZHOU, C.; SHEN, H.; ZHANG, J.Y.; MATTS, J.; WOLF, J.; MANN, D.G.J.; STEWART JR, C.N.; TANG, Y. Overexpression of miR156 in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) results in various morphological alterations and leads to improved biomass production. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 10, i.2, p. 1-10, 2012.

GIOVANNONI, J. Molecular biology of fruit maturation and ripening. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 725-749, 2001

GOU, J.Y.; FELIPPES, F. F.; LIU, C.J.; WEIGEL, D.; WANG, J.W. Negative Regulation of Anthocyanin Biosynthesis in Arabidopsis by a miR156-Targeted SPL Transcription Factor. **Plant Cell**, Rockville, v. 23, n. 4, p. 1512-1522, Apr 2011.

GRANDILLO, S.; KU, H.M.; TANKSLEY, S.D. Identifying the loci responsible for natural variation in fruit size and shape in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, Austin, v. 99, n. 6, p. 978-987, Oct 1999.

HACKBUSCH, J. ;RICHTER, K.; MULLER, J.; SALAMINI, F.; UHRIG, J.F. A central role of Arabidopsis thaliana ovate family proteins in networking and subcellular localization of 3-aa loop extension homeodomain proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 13, p. 4908-4912, Mar 29 2005.

HAY, A.; TSIANTIS, M. KNOX genes: versatile regulators of plant development and diversity. **Development**, Cambridge, v. 137, n. 19, p. 3153-3165, Oct 1 2010

IRISH, V.F. Diversification of floral homeotic gene function. **Hortscience**, Alexandria, v. 38, n. 7, p. 1328-1330, Dec 2003.

JANSSEN, B.J.; LUND, L.; SINHA, N. Overexpression of a homeobox gene, LeT6, reveals indeterminate features in the tomato compound leaf. **Plant Physiology**, Washington, v. 117, n. 3, p. 771-786, Jul 1998.

JONES-RHOADES, M.W.; BARTEL, D.P.; BARTEL, B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 19-53, 2006

KARNOVSK.MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, n. 2, p. A137-&, 1965

KHUSH, G.S.; RICK, C.M. Studies on the linkage map of chromosome 4 of the tomato and on the transmission of induced deficiencies. **Genetica**, Dordrecht, v. 38, n. 1, p. 74-94, 1967.

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. **Molecular & General Genetics**, New York, v. 250, n. 1, p. 7-16, Jan 15 1996.

KOORNEEF, M.; BADE, J.; HANHART, C.; HORSMAN, K.; SCHEL, J.; SOPPE, W.; VERKERK, R.; ZABEL, P. Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato. **Plant Journal**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 131-141, Jan 1993.

KRAMER, E.M.; JARAMILLO, M.A.; DI STILIO, V.S. Patterns of gene duplication and functional evolution during the diversification of the AGAMOUS subfamily of MADS box genes in angiosperms. **Genetics**, Austin, v. 166, n. 2, p. 1011-1023, Feb 2004.

LAGOS-QUINTANA, M.; RAUHUT, R.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T.. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science**, Washington, v. 294, n. 5543, p. 853-858, Oct 26 2001.

LAUFS, P.; PEAUCELLE, A.; MORIN, H.; TRAAS, J. MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems. **Development**, Cambridge, v. 131, n. 17, p. 4311-4322, Sep 2004.

LEE, R.C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The c-elegans heterochronic gene lin-4 encodes small rnas with antisense complementarity to lin-14. **Cell**, Cambridge, v. 75, n. 5, p. 843-854, Dec 3 1993.

LESEBERG, C.H. EISSLER, C.L.; WANG, X.; JOHNS, M.A.; DUVALL, M.R.; MAO, L. Interaction study of MADS-domain proteins in tomato. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 8, p. 2253-2265, May 2008.

LIPPMAN, Z.; TANKSLEY, S.D. Dissecting the genetic pathway to extreme fruit size in tomato using a cross between the small-fruited wild species *Lycopersicon pimpinellifolium* and *L-esculentum* var. giant heirloom. **Genetics**, Austin, v. 158, n. 1, p. 413-422, May 2001.

LIU, J.P.; CONG, B.; TANKSLEY, S.D. Generation and analysis of an artificial gene dosage series in tomato to study the mechanisms by which the cloned quantitative trait locus fw2.2 controls fruit size. **Plant Physiology**, Washington, v. 132, n. 1, p. 292-299, May 2003.

LIU, J. P. VAN ECK, J.; CONG, B.; TANKSLEY, S. D.. A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 20, p. 13302-13306, Oct 1 2002.

LIU, Q.; CHEN, Y.-Q. Insights into the mechanism of plant development: Interactions of miRNAs pathway with phytohormone response. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Guangzhou, v. 384, n. 1, p. 1-5, Jun 19 2009.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. **Methods**, New York, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001.

LLAVE, C.; XIE, Z.X.; KASSCHAU, K.D.; CARRINGTON, J.C. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. **Science**, Washington, v. 297, n. 5589, p. 2053-2056, Sep 20 2002.

LOHMANN, J.U.; WEIGEL, D. Building beauty: The genetic control of floral patterning. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 2, n. 2, p. 135-142, Feb 2002.

LOZANO, R.; GIMENEZ, E.; CARA, B.; CAPEL, J.; ANGOSTO, T. Genetic analysis of reproductive development in tomato. **International Journal of Developmental Biology**, Washington, v. 53, n. 8-10, p. 1635-1648, 2009

LU, S.F.; SUN, Y.H.; SHI, R.; CLARK, C.; LI, L.G.; CHIANG, V.L. Novel and mechanical stress-responsive microRNAs in *Populus trichocarpa* that are absent from *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 8, p. 2186-2203, Aug 2005.

MALLORY, A.C.; BARTEL, D.P.; BARTEL, B. MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* auxin response factor17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. **Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 5, p. 1360-1375, May 2005.

MANNING, K.; TOR, M.; POOLE, M.; HONG, Y.; THOMPSON, A.J.; KING, G.J.; GIOVANNONI, J.J.; SEYMOUR, G.B. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. **Nature Genetics**, New York, v. 38, n. 8, p. 948-952, Aug 2006

MARTI, E.; GISBERT, C.; BISHOP, G.J.; DIXON, M.S.; GARCIA-MARTINEZ, J.L. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 9, p. 2037-2047, Jun 2006.

MARTIN, R.C.; ASAHINA, M.; LIU, P.P.; KRISTOF, J.R.; COPPERSMITH, J.L.; PLUSKOTA, W.E.; BASSEL, G.W.; GOLOVIZNINA, N.A.; NGUYEN, T.T.; MARTÍNEZ-ANDÚJAR, C. The regulation of post-germinative transition from the cotyledon-to vegetative-leaf stages by microRNA-targeted SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN LIKE13 in *Arabidopsis*. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 20, n. 2, p. 89-96, 2010.

MATHEWS, H.; CLENDENNEN, S.K.; CALDWELL, C.G.; LIU, X.L.; CONNORS, K.; MATHEIS, N.; SCHUSTER, D.K.; MENASCO, D.J.; WAGONER, W.; LIGHTNER, J.; WAGNER, D.R. Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 8, p. 1689-1703, Aug 2003.

MEGRAW, M.; BAEV, V.; RUSINOV, V.; JENSEN, S.T.; KALANTIDIS, K.; HATZIGEORGIOU, A.G. MicroRNA promoter element discovery in *Arabidopsis*. **Rna-a Publication of the Rna Society**, Pennsylvania, v. 12, n. 9, p. 1612-1619, Sep 2006.

MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYATUV, S.; SHALEV, G.; ASHRI, A.; ELKIND, Y.; LEVY, A. A new model system for tomato genetics. **Plant Journal**, Oxford, v. 12, n. 6, p. 1465-1472, Dec 1997.

MOHORIANU, I. SCHWACH, F.; JING, R.; LOPEZ-GOMOLLON, S.; MOXON, S.; SZITTYA, G.; SOREFAN, K.; MOULTON, V.; DALMAY, T. Profiling of short RNAs during fleshy fruit development reveals stage-specific sRNAome expression patterns. **Plant Journal**, Oxford, v. 67, n. 2, p. 232-246, Jul 2011

MOLNAR, A.; SCHWACH, F.; STUDHOLME, D.J.; THUENEMANN, E.C.; BAULCOMBE, D.C. miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Nature**, London, v. 447, n. 7148, p. 1126-U15, Jun 28 2007.

MOUNET, F.; MOING, A.; GARCIA, V.; PETIT, J.; MAUCOURT, M.; DEBORDE, C.; BERNILLON, S.; LE GALL, G.; COLQUHOUN, I.; DEFERNEZ, M.; GIRAUDÉL, J.L.; ROLIN, D.; ROTHAN, C.; LEMAIRE-CHAMLEY, M.L. Gene and Metabolite Regulatory Network Analysis of Early Developing Fruit Tissues Highlights New Candidate Genes for the Control of Tomato Fruit Composition and Development. **Plant Physiology**, Washington, v. 149, n. 3, p. 1505-1528, Mar 2009

MOXON, S. JING, R.; SZITTYA, G.; SCHWACH, F.; PILCHER, R.L.R.; MOULTON, V.; DALMAY, T. Deep sequencing of tomato short RNAs identifies microRNAs targeting genes involved in fruit ripening. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 18, n. 10, p. 1602-1609, Oct 2008.

MUKHERJEE, K.; BROCCIERI, L.; BURGLIN, T.R. A Comprehensive Classification and Evolutionary Analysis of Plant Homeobox Genes. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 26, n. 12, p. 2775-2794, Dec 2009.

NAVARRO, L. DUNOYER, P.; JAY, F.; ARNOLD, B.; DHARMASIRI, N.; ESTELLE, M.; VOINET, O.; JONES, J. D. G. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. **Science**, Washington, v. 312, n. 5772, p. 436-439, Apr 21 2006.

NESBITT, T.C.; TANKSLEY, S.D. fw2.2 directly affects the size of developing tomato fruit, with secondary effects on fruit number and photosynthate distribution. **Plant Physiology**, Washington, v. 127, n. 2, p. 575-583, Oct 2001.

NG, M.; YANOFSKY, M.F. Three ways to learn the ABCs. **Current Opinion in Plant Biology**, New York, v. 3, n. 1, p. 47-52, Feb 2000.

NOGUEIRA, F.T.S. MADI, S.; CHITWOOD, D.H.; JUAREZ, M.T.; TIMMERMANS, M.C.P. Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 21, n. 7, p. 750-755, Apr 1 2007.

ORI, N.; COHEN, A.R.; ETZIONI, A.; BRAND, A.; YANAI, O.; SHLEIZER, S.; MENDA, N.; AMSELLEM, Z.; EFRONI, I.; PEKKER, I.; ALVAREZ, J.P.; BLUM, E.; ZAMIR, D.; ESHED, Y. Regulation of LANCEOLATE by miR319 is required for compound-leaf development in tomato. **Nature Genetics**, New York, v. 39, n. 6, p. 787-791, Jun 2007.

OSSOWSKI, S.; SCHWAB, R.; WEIGEL, D. Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. **The Plant Journal**, Oxford, v. 53, n. 4, p. 674-690, 2008.

PAN, I.L. MCQUINN, R.; GIOVANNONI, J.J.; IRISH, V. F. Functional diversification of AGAMOUS lineage genes in regulating tomato flower and fruit development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 6, p. 1795-1806, Apr 2010.

PARNIS, A. COHEN, O.; GUTFINGER, T.; HAREVEN, D.; ZAMIR, D.; LIFSCHITZ, E. The dominant developmental mutants of tomato, Mouse-ear and Curl, are associated with distinct modes of abnormal transcriptional regulation of a knotted gene. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 12, p. 2143-2158, Dec 1997.

PELAZ, S.; DITTA, G.S.; BAUMANN, E.; WISMAN, E.; YANOFSKY, M.F.B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. **Nature**, London, v. 405, n. 6783, p. 200-203, May 11 2000.

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**, New York, v. 6, Oct 7 2010.

PINO-NUNES, L.; FIGUEIRA, A.V.; TULMANN NETO, A.; 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'. 2008. **Acta Horticulturae**, The Hague, p.63-72.

REINHART, B.J.; WEINSTEIN, E.G.; RHOADES, M.W.; BARTEL, B.; BARTEL, D.P. MicroRNAs in plants (vol 16, pg 1616, 2002). **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 16, n. 17, p. 2313-2313, Sep 1 2002.

RHOADES, M.W.; REINHART, B.J.; LIM, L.P.; BURGE, C.B.; BARTEL, B.; BARTEL, D.P. Prediction of plant microRNA targets. **Cell**, Cambridge, v. 110, n. 4, p. 513-520, Aug 23 2002.

RUTLEDGE, R.; REGAN, S.; NICOLAS, O.; FOBERT, P.; COTE, C.; BOSNICH, W.; KAUFFELDT, C.; SUNOHARA, G.; nSEGUIN, A.; STEWART, D. Characterization of an AGAMOUS homologue from the conifer black spruce (*Picea mariana*) that produces floral homeotic conversions when expressed in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 625-634, Sep 1998.

SACKS, E.J.; GERHARDT, L.M.; GRAHAM, E.B.; JACOBS, J.; THORRUP, T.A.; STCLAIR, D.A. Variation among 41 genotypes of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) for crossability to *L. peruvianum* (L.) Mill. **Annals of Botany**, London, v. 80, n. 4, p. 469-477, Oct 1997.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method - a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, n. 4, p. 406-425, Jul 1987.

SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue o. **Stain Technology**, Baltimore, v. 48, n. 5, p. 247-249, 1973 1973.

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**, Berlin, p. 1-14, 2011. [

SCHWAB, R.; PALATNIK, J.F.; RIESTER, M.; SCHOMMER, C.; SCHMID, M.; WEIGEL, D. Specific effects of MicroRNAs on the plant transcriptome. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 8, n. 4, p. 517-527, Apr 2005.

SCHWARZ, S.; GRANDE, A.V.; BUJDOSO, N.; SAEDLER, H.; HUIJSER, P. The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in Arabidopsis. **Plant Molecular Biology**, Dordrech, v. 67, n. 1/2, p. 183-195, May 2008.

SEADE. Disponível em: < <http://www.seade.gov.br/> Acesso em: 10 Fev. 2012.

SEYMOUR, G.B.; MANNING, K.; ERIKSSON, E.M.; POPOVICH, A.H.; KING, G.J. Genetic identification and genomic organization of factors affecting fruit texture. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 377, p. 2065-2071, Oct 2002.

SHIKATA, M. ;KOYAMA, T.; MITSUDA, N.; OHME-TAKAGI, M. Arabidopsis SBP-Box Genes SPL10, SPL11 and SPL2 Control Morphological Change in Association with Shoot Maturation in the Reproductive Phase. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 50, n. 12, p. 2133-2145, Dec 2009.

SITNIKOVA, T.; RZHETSKY, A.; NEI, M. Interior-branch and bootstrap tests of phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, Chicago, v. 12, n. 2, p. 319-333, 1995.

SOLTIS, D.E. MA, H.; FROHLICH, M.W.; SOLTIS, P.S.; ALBERT, V.A.; OPPENHEIMER, D.G.; ALTMAN, N.S.; DEPAMPHILIS, C.; LEEBENS-MACK, J. The floral genome: an evolutionary history of gene duplication and shifting patterns of gene expression. **Trends in Plant Science**, London, v. 12, n. 8, p. 358-367, Aug 2007.

SUN, H.J.; UCHII, S.; WATANABE, S.; EZURA, H. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 47, n. 3, p. 426-431, Mar 2006.

SUNKAR, R.; GIRKE, T.; JAIN, P.K.; ZHU, J.K. Cloning and characterization of MicroRNAs from rice. **Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 5, p. 1397-1411, May 2005.

SUNKAR, R.; ZHU, J.K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 8, p. 2001-2019, Aug 2004.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, Aug 2007.

TANDRE, K.; ALBERT, V.A.; SUNDAS, A.; ENGSTROM, P. Conifer homologs to genes that control floral development in angiosperms. **Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 27, n. 1, p. 69-78, Jan 1995.

TANKSLEY, S.D. The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. **Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. S181-S189, 2004

THEISSEN, G. Development of floral organ identity: stories from the MADS house. **Current Opinion in Plant Biology**, Albany, v. 4, n. 1, p. 75-85, Feb 2001.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL-W - Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, Nov 11 1994. I

USDA. Disponível em: <<http://www.ers.usda.gov/Briefing/Vegetables/tomatoes.htm>>. Acesso em: 06 Fev. 2012.

VAN DER KNAAP, E.; TANKSLEY, S.D. Identification and characterization of a novel locus controlling early fruit development in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, Austin, v. 103, n. 2-3, p. 353-358, Aug 2001.

VAN DER KNAAP, E.; TANKSLEY, S.D. The making of a bell pepper-shaped tomato fruit: identification of loci controlling fruit morphology in Yellow Stuffer tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, Austin, v. 107, n. 1, p. 139-147, Jun 2003.

VARKONYI-GASIC, E.; WU, R.; WOOD, M.; WALTON, E.F.; HELLENS, R.P. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. **Plant Methods**, New York, v. 3, n. 12, p. 1-12, 2007

VAUCHERET, H. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 20, n. 7, p. 759-771, Apr 1 2006.

VOINNET, O. Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. **Cell**, Cambridge, v. 136, n. 4, p. 669-687, Feb 20 2009.

VOLLBRECHT, E.; VEIT, B.; SINHA, N.; HAKE, S. The developmental gene knotted-1 is a member of a maize homeobox gene family. **Nature**, London, v. 350, n. 6315, p. 241-243, Mar 21 1991.

VREBALOV, J.; RUEZINSKY, D.; PADMANABHAN, V.; WHITE, R.; MEDRANO, D.; DRAKE, R.; SCHUCH, W.; GIOVANNONI, J. A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (Rin) locus. **Science**, Washington, v. 296, n. 5566, p. 343-346, Apr 12 2002.

WANG, J.-W.; CZECH, B.; WEIGEL, D. miR156-Regulated SPL Transcription Factors Define an Endogenous Flowering Pathway in *Arabidopsis thaliana*. **Cell**, Cambridge, v. 138, n. 4, p. 738-749, Aug 21 2009.

WANG, S.; CHANG, Y.; GUO, J.; CHEN, J. Arabidopsis Ovate Family Protein 1 is a transcriptional repressor that suppresses cell elongation. **Plant Journal**, Oxford, v. 50, n. 5, p. 858-872, Jun 2007.

WEI, S. YU, B.; GRUBER, M.Y.; KHACHATOURIANS, G.G.; HEGEDUS, D.D.; HANNOUFA, A. Enhanced Seed Carotenoid Levels and Branching in Transgenic *Brassica napus* Expressing the Arabidopsis miR156b Gene. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 17, p. 9572-9578, Sep 8 2010.

WU, G. ;PARK, M.Y.; CONWAY, S.R.; WANG, J.; WEIGEL, D.; POETHIG, R.S. The Sequential Action of miR156 and miR172 Regulates Developmental Timing in Arabidopsis. **Cell**, Cambridge, v. 138, n. 4, p. 750-759, Aug 21 2009.

XIAO, H. JIANG, N.; SCHAFFNER, E.; STOCKINGER, E.J.; VAN DER KNAAP, E. A retrotransposon-mediated gene duplication underlies morphological variation of tomato fruit. **Science**, Washington, v. 319, n. 5869, p. 1527-1530, Mar 14 2008.

XIE, K.; WU, C.; XIONG, L. Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice. **Plant Physiology**, Washington, v. 142, n. 1, p. 280-293, Sep 2006.

YAMAGUCHI, A.; WU, M.F.; YANG, L.; WU, G.; POETHIG, R.S.; WAGNER, D. The MicroRNA-Regulated SBP-Box Transcription Factor SPL3 Is a Direct Upstream Activator of LEAFY, FRUITFULL, and APETALA1. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 17, n. 2, p. 268-278, Aug 18 2009.

YAMASAKI, K.; KIGAWA, T.; INOUE, M.; TATENO, M.; YAMASAKI, T.; YABUKI, T.; AOKI, M.; SEKI, E.; MATSUDA, T.; NUNOKAWA, E. A novel zinc-binding motif revealed by solution structures of DNA-binding domains of Arabidopsis SBP-family transcription factors. **Journal of molecular biology**, London, v. 337, n. 1, p. 49-63, 2004.

YANG, Z.Y.; EBRIGHT, Y.W.; YU, B.; CHEN, X M. HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 667-675, 2006

YU, N.; CAI, W.J.; WANG, S.; SHAN, C.M.; WANG, L.J.; CHEN, X.Y. Temporal Control of Trichome Distribution by MicroRNA156-Targeted SPL Genes in Arabidopsis thaliana. **Plant Cell**, Rockville, v. 22, n. 7, p. 2322-2335, Jul 2010.

ZANCA, A.S.; VICENTINI, R.; ORTIZ-MOREA, F.A.; DEL BEM, L.E.V.; DA SILVA, M.J.; VINCENTZ, M.; NOGUEIRA, F.T.S. Identification and expression analysis of microRNAs and targets in the biofuel crop sugarcane. **BMC Plant Biology**, Michigan, v. 10, n. 1, p. 260-269 Nov 24 2010.

ZHANG, B.H.; PAN, X.P.; WANG, Q.L.; COBB, G.P.; ANDERSON, T.A. Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. **Cell Research**, New York, v. 15, n. 5, p. 336-360, May 2005.

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**, Amsterdam, ;585(2):435-9. v.585,n. 2, p. 435-439, 2010.

Anexos

Anexo 1 - Comparação entre as sequências maduras dos microRNAs usadas em Zhang et al., 2010 (1) e no presente trabalho (2). Note que a sequência adotada pelo grupo chinês é, na verdade, correspondente a miR157 e não miR156 devido a mudança de nucleotídeos nas posições 11 e 14.

AtmiR157c	UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC	21
AtmiR157d	-UGACAGAAGAUAGAGAGCAC	20
AtmiR157b	UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC	21
AtmiR157a	UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC	21
(1) LEFL1098BH06	UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC	21
SlymiR156c	UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC	21
SlymiR156b	UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC	21
SlymiR156a	UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC	21
AtmiR156h	-UGACAGAAGAAAGAGAGCAC	20
SlymiR156/157	-UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	20
AtmiR156a	-UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	20
(2) AtmiR156b	-UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	20
AtmiR156c	-UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	20
AtmiR156d	-UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	20
AtmiR156e	-UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	20
AtmiR156f	-UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	20
AtmiR156g	-CGACAGAAGAGAGUGAGCAC	20
***** ** *****		

Anexo 2 - Comparação entre estrutura do locus do gene *AP1* de *Arabidopsis thaliana* e seu ortólogo em tomateiro *MADS-MC*. A estrutura dos dois genes apresentam algumas semelhanças principalmente quanto ao posicionamento dos putativos sítios de ligação em *cis* para proteínas SPL. Asteriscos vermelhos representam sítios identificados *in silico*. Já a reta vermelha representa sítios que foram comprovados experimentalmente como ocupados pela proteína SPL3 de arabidopsis (Yamaguchi et al., 2009)

Anexo 3 - Padrão de expressão do gene MADS-Box *TOMATO AGAMOUS 1* (*TAG1*) em frutos estágio três de desenvolvimento. O nível do transcrito é representado no eixo Y como uma razão (expressão relativa) do valor absoluto da expressão do gene *TAG1* pelo valor absoluto da expressão do gene normalizador *Tubulina*. No eixo X estão representadas as diferentes amostras avaliadas e as barras verticais representam o desvio padrão de três amostras biológicas