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

Alterações hormonais no mutante *ovate* de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) e seu impacto na morfologia, qualidade do fruto, produtividade e partenocarpia

João Pedro Bernardes Faria

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

**Piracicaba
2014**

João Pedro Bernardes Faria
Bacharel em Agronomia

**Alterações hormonais no mutante *ovate* de tomateiro (*Solanum lycopersicum*
L. cv Micro-Tom) e seu impacto na morfologia, qualidade do fruto,
produtividade e partenocarpia**

Orientador:
Prof. Dr. **LÁZARO EUSTÁQUIO PEREIRA PERES**

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

Piracicaba
2014

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

Faria, João Pedro Bernardes

Alterações hormonais no mutante *ovate* de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) e seu impacto na morfologia, qualidade do fruto, produtividade e partenocarpia / João Pedro Bernardes Faria. - - Piracicaba, 2014.

68 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.
Bibliografia.

1. Micro-Tom 2. Ovate 3. Auxina 4. Citocinina 5. Formato de fruto 6. Frutificação
7. Ovário 8. Tomate 9. Produtividade I. Título

CDD 635.642
F224a

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

A minha mãe, Valdenice, pelo amor
A meus avós, Dorvalino e Ivanildes, pelos cuidados

Dedico.

A minha amada companheira
de todas as horas, Daiane, pela
compreensão e incentivo,

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar a força necessária para superar os obstáculos que se apresentaram durante essa jornada, e por preencher minha vida com pessoas iluminadas.

A minha mãe, por ter sempre tanto amor para dar e por se doar tanto. Sua forma de viver é o meu maior exemplo de vida. A minha irmã Ana, por gostar de mim tanto assim e aos meus avós, por cuidarem sempre de mim e a quem devo agradecer simplesmente por tudo!

A minha namorada, amiga e companheira Dai, pelo amor, paciência e apoio, além de várias ajudas na casa de vegetação, laboratório, dissertação... ah, já agradeço pela paciência?

Ao meu orientador, professor Dr. Lázaro, por me ensinar a ter paixão pela ciência e por estar sempre presente.

Ao Sr. Tite e a Dona Neusa, por serem meus pais quando a minha família não estava por perto e por me acolherem com tanto carinho.

A CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro durante a execução deste projeto.

A todos os integrantes do Laboratório do Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal pela ajuda e companhia. Gostaria de agradecer especialmente aos queridos Mateus e Fred, pelas intermináveis conversas e discussões científicas e filosóficas e pelo ombro amigo nos momentos difíceis, a Elô e Ivan pela amizade, a Mariana, pela ajuda nos primeiros contatos com o laboratório e a Marcela, Maísa, Lucas, Stevan, Ninfim e Ariadne pelos momentos divertidos e pela disposição em me ajudar.

Ao Agustim, pelo auxílio durante a redação da dissertação.

A Cássia pela ajuda, eficiência e carinho e por me ensinar que os anjos usam jaleco.

A Alice, pelo bom dia!

A Solizete, pela inigualável eficiência e boa vontade.

Aos professores do Programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas pelos ensinamentos.

Ao Vitti, pela manutenção da ordem na casa de vegetação.

Aos professores do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais, em especial ao professor Dr. Luciano Donizete, pela minha formação.

A todos os amigos e familiares que, perto ou longe, contribuíram para a minha construção.

Obrigado mesmo!

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Frutificação	15
2.2 Os hormônios e o desenvolvimento vegetal	17
2.3 Os hormônios e o processo de frutificação.....	19
2.4 Genes responsáveis pela alteração no formato do fruto em tomateiro.....	21
2.5 OVATE	23
2.6 Partenocarpia	24
2.7 Micro-Tom como modelo genético e fisiológico	27
3 OBJETIVOS GERAIS	29
4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
5 MATERIAL E MÉTODOS	33
5.1 Condições de cultivo.....	33
5.2 Material vegetal	33
5.3 Obtenção dos genótipos.....	34
5.4 Peso, teor de sólidos solúveis, número de lóculos e produtividade média...35	
5.5 Avaliação da perda de água dos frutos	36
5.6 Avaliação do tempo de prateleira	36
5.7 Avaliação da matéria seca.....	36
5.8 Caracterização da antese em MT.....	37
5.9 Medição de ovário e frutos e ensaio histoquímico	37
5.10 Teste de partenocarpia.....	37
5.11 Avaliação do peso das sementes	38
5.12 Análises estatísticas	38
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6.1 Introgessão de <i>ovate</i> no background MT	39
6.2 Caracterização fenotípica de <i>ovate</i>	41
6.2.1 Determinação do diâmetro da cicatriz peduncular, variação do número de lóculos e teor de matéria seca.....	42

6.2.2	Determinação do peso médio de 100 sementes	44
6.3	Caracterização do desenvolvimento do ovário	45
6.3.1	Caracterização dos estágios florais de MT	45
6.3.2	Medições dos ovários e frutos em MT e <i>ovate</i>	47
6.3.3	Ensaio histoquímico.....	50
6.4	Caracterização agronômica de <i>ovate</i>	53
6.4.1	Determinação da produtividade e do teor de sólidos solúveis.....	54
6.4.2	Medição da perda de peso e determinação do tempo de prateleira	55
6.4.3	Partenocarpia, peso médio e taxa de pagamento dos frutos.....	57
7	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	61

RESUMO

Alterações hormonais no mutante *ovate* de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) e seu impacto na morfologia, qualidade do fruto, produtividade e partenocarpia

Os frutos do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) apresentam elevada diversidade fenotípica, grande parte da qual deve-se a mutações em cinco genes, *SUN* (*SUN*), *OVATE* (*O*), *LOCULE NUMBER* (*LC*), *FRUIT SHAPE 8.1* (*FS8.1*) e *FASCIATED* (*FAS*). Enquanto mutações em *LC*, *O* e *FAS* são responsáveis pela alteração no número de lóculos no fruto, mutações em *FS8.1*, *SUN* e *O* resultam em frutos mais alongados, sendo a última mutação o foco de estudo do presente trabalho. Apesar de *ovate* ser uma mutação importante tanto do ponto de vista agrônomo quanto biológico, não é conhecido ainda o efeito exato da nova classe de gene regulatório codificado por esse locus. Por promover a drástica alteração no formato do fruto, característica esta que pode influenciar a preferência do consumidor, essa mutação é de grande interesse agrônomo. Sob o ponto de vista biológico, o maior conhecimento da função desse gene resultaria em um maior entendimento do processo de frutificação. A análise de duplos mutantes *ovate DR5::GUS* e *ovate ARR5::GUS* mostrou que essa mutação altera o padrão de resposta a auxina e citocinina, respectivamente, durante o desenvolvimento do fruto. Além disso, foram realizados estudos que mostraram seu impacto no teor de sólidos solúveis, produtividade, tempo de prateleira, teor de matéria seca, peso das sementes e partenocarpia. Tais resultados não somente contribuíram para um melhor entendimento do efeito gênico da nova classe de genes regulatórios codificado por *OVATE*, como também fornecem importantes implicações agrônomicas, já que a mutação *ovate* vem sendo utilizada na obtenção de variedades e híbridos do tipo “grape”.

Palavras-chave: Micro-Tom; Ovate; Auxina; Citocinina; Formato de fruto; Frutificação; Ovário; Tomate; Produtividade

ABSTRACT

Hormonal alternations in tomato mutant ovate (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) and their impact on morphology, fruit quality, productivity and parthenocarpy

The fruits of tomato (*Solanum lycopersicum*) present a high phenotypic diversity, most of which can be attributed to mutations in five genes: *SUN* (*SUN*), *OVATE* (*O*), *LOCULE NUMBER* (*LC*), *FRUIT SHAPE 8.1* (*FS8.1*) and *FASCIATED* (*FAS*). Whereas mutations in *LC*, *O* and *FAS* alter fruit locule number, mutations in *FS8.1*, *SUN* and *O* result in elongated fruits. The latter is the focus of the present work. *ovate* is a biologically and agronomically relevant mutation, however, the exact effect of the new class of regulatory gene it represents is unknown. The drastic alteration in fruit shape produced by the mutation can influence consumer preference, thus rendering it agronomically important. Biologically, a thorough characterization of its gene function would result in deeper understanding of fruit formation. Crosses to the marker lines *DR5::GUS* and *ARR5::GUS* showed that *ovate* alters the response pattern of auxin and cytokinin, respectively, during fruit development. Furthermore, studies are described showing its effect on total soluble solids content, yield, shelf life, dry mass rate, seed weight and parthenocarpy. The results contribute not only to a better understanding of the effect of the new class of regulatory genes encoded by *OVATE*, but also have important agronomic implications, given that the *ovate* mutation has been used in the obtention of 'grape/plum' tomato varieties and hybrids.

Keywords: Micro-Tom; Ovate; Auxin; Cytokinin; Fruit shape; Fruit set; Ovary; Tomato; Yield

1 INTRODUÇÃO

A frutificação é um processo de suma importância para a sobrevivência das angiospermas. Apesar de garantir a propagação e continuidade das espécies, tal processo não teve ainda suas bases fisiológicas completamente desvendadas. O entendimento das bases fisiológicas e moleculares da frutificação é importante não só do ponto de vista biológico, como também agrônomo, visto a importância dos frutos na agricultura e na alimentação humana.

Há muito se sabe sobre a importância dos hormônios vegetais no processo de frutificação, porém seus mecanismos de atuação vêm sendo desvendados aos poucos, já que as bases moleculares das vias de transdução hormonal somente começaram a ser desvendadas em meados da década de 1990, com o uso de mutantes e plantas transgênicas. Há ainda muito a ser descoberto nesta área, e aspectos importantes da ação hormonal, como a interação entre hormônios e sua relação em processos essenciais do desenvolvimento, são áreas ainda obscuras que necessitam de estudos mais aprofundados.

O conhecimento dos genes envolvidos no processo de frutificação, sua relação com os hormônios vegetais e seu impacto em características de interesse agrônomo são de significativa importância para o entendimento da frutificação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Frutificação

Como é implícito em seu nome, as angiospermas (do grego “sementes dentro de um recipiente”) foram originalmente definidas pela natureza da sua estrutura reprodutiva onde as sementes são enclausuradas dentro de um ovário. Essa divisão do Reino Vegetal é o grupo dominante das plantas terrestres e de longe as plantas mais importantes para a utilização humana (GASSER; ROBINSON-BEERS, 1993).

O desenvolvimento embrionário em muitas angiospermas ocorre concomitantemente à transformação do ovário em fruto, um órgão especializado que, como observado por Darwin, fornece um ambiente ideal para a maturação da semente e frequentemente para a sua dispersão (GILLASPY et al., 1993). A função biológica do fruto consiste, portanto, na proteção dos embriões e sementes durante o desenvolvimento e na facilitação da dispersão das sementes após sua maturação (PANDOLFINI, 2009). O desenvolvimento do fruto é um processo complexo e altamente regulado, passando o fruto por fases de divisão celular e expansão, seguidas por numerosas alterações metabólicas que levam ao amadurecimento (SRIVASTAVA; HANDA, 2005).

A morfologia única das estruturas reprodutivas femininas das angiospermas tem facilitado a evolução de mecanismos altamente diversificados, e por vezes complexos, para garantir a polinização adequada (GASSER; ROBINSON-BEERS, 1993). Durante o desenvolvimento inicial do fruto, diversas vias de comunicação entre o esporófito e o gametófito são estabelecidas, sendo considerado que a decisão de desenvolvimento ou não do ovário em fruto é dependente da conclusão bem sucedida de polinização e fertilização, processos estes responsáveis pelo aumento do nível de hormônios vegetais no ovário (VAROQUAUX et al., 2000; ROTINO et al., 1997). A polinização e a fecundação são responsáveis por desencadear o programa de desenvolvimento do fruto através das vias de sinalização de auxina e giberelina, embora o papel exato desses dois hormônios é ainda pouco compreendido (De JONG et al., 2009). O acúmulo destes hormônios estimula a divisão celular levando à frutificação (GORGUET et al., 2008), que pode ser definida como a transição do ovário quiescente para um fruto jovem em rápido

crescimento, o qual é um importante processo na reprodução sexual das angiospermas (De JONG et al., 2009).

A maioria dos estudos fisiológicos em frutos é focada principalmente no amadurecimento, o último estágio do desenvolvimento em frutos carnosos. Como consequência, pouco se sabe sobre os mecanismos regulatórios que governam os estágios iniciais pelos quais vários órgãos florais se diferenciam em fruto (JOUBÈS et al., 1999).

Gillaspy et al. (1993) dividem o processo de frutificação em três fases. A primeira fase compreende os processos de polinização e fertilização, que são fundamentais para que o fruto se desenvolva, sendo que a não ocorrência de qualquer um deles acarreta o abortamento da flor. A segunda fase está relacionada ao processo de divisão celular e ocorre logo após a fertilização. A terceira fase se inicia com o fim da divisão celular e se caracteriza pela expansão das células. Durante essa última fase, o fruto alcança o seu tamanho final. As fases de crescimento são seguidas pelo amadurecimento e senescência (PASCUAL et al., 2009).

Apesar de Joubès et al. (1999) dividirem o processo de frutificação em dois, excluindo a primeira fase descrita por Gillaspy et al. (1993), ambos descrevem a frutificação de forma semelhante. Durante a primeira fase, que dura cerca de 7 a 10 dias após a fertilização, um período de divisão celular verdadeiramente ativo ocorre dentro do ovário. O pericarpo se desenvolve com muitas camadas de espessura, onde células de parede pouco espessa encerram muitos espaços intracelulares. Durante a segunda fase, o tecido parenquimatoso da placenta se desenvolve ao redor do funículo até englobar totalmente as sementes em desenvolvimento. No final do desenvolvimento, as células desse parênquima, que são gigantes e apresentam parede celular pouco espessa, formam um tecido que se assemelha a uma geléia (JOUBÈS et al., 1999). É necessário, contudo, ressaltar que tanto Gillaspy et al. (1993) quanto Joubès et al. (1999) descreveram o processo de frutificação como uma série de eventos que ocorrem a partir da antese. No entanto, importantes eventos necessários à formação do ovário ocorrem antes da antese. Desse modo, antes da antese ocorrem: i) a definição do número de carpelos, os quais fixam o número de lóculos no fruto, e ii) os processos de divisão e expansão celular que influenciarão o tamanho do ovário até a antese e, conseqüentemente, o tamanho final do fruto.

Dentre as várias ordens e famílias de angiospermas, a família Solanaceae possui uma grande representação entre as espécies que foram domesticadas para o consumo de seus frutos carnosos. Fazem parte desta família o pimentão e as pimentas (*Capsicum* spp), o tomatillo (*Physalis philadelphica*), a lanterna chinesa (*Physalis peruviana*), o tomate de árvore (*Cyphomandra* spp), a berinjela (*Solanum melongena*), o jiló (*Solanum gilo*) e o tomate (*Solanum lycopersicum*). O tomateiro é uma planta de florescimento praticamente insensível ao fotoperíodo, que apresenta um crescimento simpodial onde, após produzir de oito a dez folhas, tem o seu meristema vegetativo transformado em meristema floral (BRUKHIN et al., 2003). Essa transformação deve-se a uma alteração no balanço entre os genes *SINGLE FLOWER TRUSS* (*SFT*), o precursor do florígeno e *SELF PRUNING* (*SP*), repressor do florescimento (SHALIT et al., 2009). Após a indução floral, a formação dos diversos verticilos florais, incluindo o ovário, se dá pela ação de vários genes regulatórios, sendo boa parte deles da família dos MADboxes (WEIGEL & MEYEROWITZ, 1994). Em tomateiro, os MADboxes *RIPENING INHIBITOR* (*RIN*) e *JOINTLESS* (*J*) assumiram também o controle do amadurecimento do fruto (VREBALOV et al., 2002) e sua dispersão (MAO et al., 2000), respectivamente.

2.2 Os hormônios e o desenvolvimento vegetal

Por serem organismos sésseis, as plantas devem se ajustar a numerosos estímulos ambientais, coordenando seu crescimento e demais etapas do desenvolvimento em resposta a fatores tanto bióticos quanto abióticos (SANTNER; ESTELLE, 2009). No século XIX, estudos pioneiros realizados por Julius Von Sachs e Charles Darwin demonstraram que vários processos de crescimento vegetal são regulados por “substâncias” que se movem de uma parte da planta à outra (SANTNER et al., 2009). Os hormônios vegetais são um grupo de moléculas, não inter-relacionadas estruturalmente, que são centrais na integração entre os diversos fatores ambientais e o programa genético vegetal (SANTNER; ESTELLE, 2009). Os hormônios “clássicos” identificados durante a primeira metade do século XX são auxina, ácido abscísico, citocinina, giberelina e etileno. Mais recentemente, muitos compostos têm sido reconhecidos como hormônios, incluindo brassinosteróides, jasmonato, ácido salicílico, óxido nítrico e estrigolactonas (SANTNER; ESTELLE,

2009). Neste tópico será dada ênfase ao papel dos hormônios “clássicos” no desenvolvimento vegetal.

As giberelinas controlam diversos aspectos do desenvolvimento vegetal, incluindo a germinação em sementes, alongamento do caule, expansão da folha e desenvolvimento da flor e da semente (YAMAGUCHI, 2008). O papel da giberelina na determinação da estatura da planta teve um grande impacto na agricultura na década de 1960, e o desenvolvimento de variedades semi-anãs que apresentavam alteração nas respostas à giberelina contribuiu para um aumento enorme na produtividade de grãos durante a Revolução Verde (DAVIÈRE; ACHARD, 2013).

A auxina influencia praticamente todos os aspectos do desenvolvimento vegetal (WOODWARD; BARTEL, 2005). O ácido indol-3-acético (AIA) é a auxina predominante em plantas e está envolvida no desenvolvimento embrionário e pós – embrionário, tropismo, nas respostas à luz e à gravidade, influenciando aspectos da divisão, expansão polar e diferenciação celular (TEALE et al., 2006).

As citocininas são uma importante classe de hormônios envolvidos em vários aspectos do desenvolvimento vegetal, desde a formação de órgãos e dominância apical até a senescência das folhas (EL-SHOWK et al., 2013). A citocinina, identificada como um promotor da divisão celular em cultura de tecidos em 1955, exerce um papel fundamental na regulação da proliferação e diferenciação das células vegetais (MILLER et al., 1955; SAKAKIBARA, 2006).

A biossíntese e o transporte de auxina mediam a resposta local a esse hormônio, além de definir a distribuição espacial das citocininas (CHENG et al., 2013). A interação entre auxinas e citocininas controla muitos processos centrais do desenvolvimento vegetal, particularmente a dominância apical e o desenvolvimento de raízes e caule (NORDSTRÖM et al., 2004). O padrão específico do controle da distribuição de citocinina pela auxina determina o destino de células pluripotentes durante a formação do meristema apical caulinar (CHENG et al., 2013).

O etileno é um hormônio gasoso que regula uma grande variedade de processos fisiológicos, como a germinação de sementes e a senescência de órgãos vegetais, além de influenciar o crescimento vegetal, agir nas respostas a condições de estresse biótico e abiótico e induzir o amadurecimento em frutos, particularmente os climatéricos, como tomate, banana, maçã e melão (BLEECKER; KENDE, 2000).

Por fim, o ácido abscísico é o hormônio vegetal responsável pela dormência nas sementes, além de controlar o desenvolvimento da plântula e estar envolvido na tolerância a estresse, incluindo seca (HAUSER et al., 2011).

Triagens genéticas resultaram na identificação de muitas das proteínas envolvidas na sinalização hormonal e a análise dessas proteínas tem contribuído significativamente para o estabelecimento dos atuais modelos de ação hormonal (SANTNER; ESTELLE, 2009). A percepção e a transdução de sinal para auxina, giberelina e jasmonato são semelhantes e envolvem a degradação dos seus reguladores negativos através do complexo proteossomo SCF-26S. Por outro lado, citocinina, brassinosteróides e ácido abscísico são percebidos por seus receptores, localizados na membrana ou no citoplasma, sendo o sinal transmitido através de fosforilação reversível aos fatores de transcrição no núcleo (SHAN et al., 2012). O etileno tem a sua sinalização regulada negativamente pelo seu receptor, ETHYLENE RESPONSE1 (ETR1). Na ausência de etileno, o qual regula negativamente seu receptor, ETR1 ativa uma quinase chamada Constitutive Triple Response (CTR1). CTR1 regula negativamente uma segunda proteína chamada Ethylene Insensitive 2 (EIN2), que ativa membros de uma pequena família de fatores de transcrição, levando-a a degradação através do complexo SCF (SANTNER et al., 2009). Na presença de etileno, esses fatores de transcrição são liberados, já que etileno inibe ETR1, o qual deixa de ativar o regulador negativo CTR1.

2.3 Os hormônios e o processo de frutificação

Os principais hormônios envolvidos no processo de frutificação são auxina e giberelina. Como mencionado anteriormente, a auxina regula a maioria dos processos de desenvolvimento das plantas, incluindo a formação do fruto (PANDOLFINI, 2009; LOKERSE; WEIJERS, 2009). As famílias de fatores de transcrição auxina/ácido indol-3-acético (Aux/IAA) e fatores de resposta à auxina (ARF) têm demonstrado ser um instrumento de regulação transcricional dependente da auxina (WANG et al., 2005). Um dos membros da família Aux/IAA, o Aux/IAA9 (IAA9) é um regulador negativo de resposta à auxina (WANG et al., 2009). Proteínas ARF8 e Aux/IAA9 formam um complexo regulador que pode bloquear diretamente a transcrição de genes alvo envolvidos na iniciação do fruto, ou podem agir

indiretamente evitando que o ARF8 funcione como um ativador da transcrição (GOETZ et al., 2007). A baixa expressão de IAA9 em plantas transgênicas de tomateiro resulta em uma drástica alteração no desenvolvimento inicial do fruto, resultando na frutificação independente de fertilização (WANG et al., 2005). Adicionalmente, o mutante de tomateiro *entire* representa a perda de função do gene IAA9, o que lhe confere uma resposta constitutiva à auxina (WANG et al., 2005). Plantas com esta mutação apresentam partenocarpia, além de alterações pleiotrópicas na arquitetura foliar e pouco vigor. Ao contrário de ARF8, o ARF7 é um regulador negativo da sinalização de auxina no ovário, sendo que a inativação desse gene pode levar à partenocarpia (De JONG et al., 2009b).

As giberelinas (GAs) são o segundo grupo de hormônios que exercem um proeminente papel na formação do fruto (PANDOLFINI, 2009). As GAs estão envolvidas na germinação das sementes, no crescimento vegetativo, na indução da iniciação floral e na regulação do desenvolvimento de flores, frutos e sementes (SUN, 2011). Os fatores de transcrição do tipo KNOX regulam a arquitetura das folhas do tomateiro diminuindo a biossíntese e incrementando a inativação de GA (HAY et al., 2002). Desse modo, tanto mutações em genes KNOX quanto mutações afetando GA podem alterar a arquitetura foliar de tomateiro, sendo que altos níveis de GA resultam em um formato mais arredondado das folhas.

A sinalização de GA opera como um sistema que atua na desrepressão de fatores de transcrição que respondem a GA, como GAMYB. A repressão é feita por proteínas de domínio DELLA (FLEET; SUN, 2008). As proteínas DELLA atuam restringindo o crescimento da planta devido a uma reprogramação transcricional (SUN, 2011). Mutantes *procera* (*pro*) possuem resposta constitutiva a GA por apresentarem perda de função do gene *PRO*, que codifica *SIGAI* (*Solanum lycopersicum* GA insensitive), um repressor de crescimento do tipo DELLA (JASINSKI et al., 2008).

Análises de transcriptomas sugerem a participação de etileno e ABA na regulação da formação do fruto. Durante a transição da antese à pós-antese, dentre os genes relacionados a hormônios, genes relacionados ao etileno, juntamente com os relacionados à auxina, são responsáveis pela maioria das alterações, o que indica que o etileno deve exercer um papel ativo, porém ainda não compreendido, na frutificação (RUAN et al., 2012).

A clássica figura elaborada por Gillaspay et al. (1993) mostra as prováveis alterações nos níveis hormonais durante o desenvolvimento do fruto de tomateiro (Figura 1). No entanto, nem todas as alterações hormonais propostas por Gillaspay et al. (1993) foram confirmadas experimentalmente. Além disso, como mencionado anteriormente, importantes alterações hormonais que devem ocorrer antes da antese não foram levadas em conta por esses autores. É importante ressaltar que é antes da antese que se dá a definição do número de carpelos do ovário, o que exerce profundo impacto no número de lóculos, no formato e no tamanho do fruto.

Figura 1 - Alterações hormonais durante o desenvolvimento do fruto. Adaptado de Gillaspay et al. (1993). Destaca-se a participação dos hormônios auxina, giberelina e citocinina nos estágios anteriores à frutificação, porém as alterações nos níveis hormonais nos estágios pré-antese não foram abordadas

2.4 Genes responsáveis pela alteração no formato do fruto em tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma espécie originária da região andina, que engloba Chile, Bolívia, Equador, Colômbia e Perú, sendo duas espécies (*S. cheesmaniae* e *S. galapagense*) endêmicas das Ilhas Galápagos, na costa do Equador (BAI; LINDHOUT, 2007; RODRÍGUEZ et al., 2011; MUÑOS et al., 2011). O tomateiro cultivado tem como provável ancestral *Solanum lycopersicum* var.

Cerasiforme, que por sua vez apresenta o México como possível centro de domesticação (JENKINS, 1948). No início do século XVI o tomate foi levado à Europa e a outras partes do mundo através dos conquistadores espanhóis (VAN DER KNAAP; PARAN, 2007). Assim como ocorre normalmente com outras espécies domesticadas, que frequentemente apresentam frutos de tamanho bem maior do que normalmente encontrado nas espécies progenitoras selvagens, o fruto do tomateiro cultivado é maior do que o fruto da variedade Cerasiforme, que apresenta somente dois lóculos e pesa poucas gramas (TANKSLEY, 2004).

Desde o século XX, o homem tem criado uma grande diversidade de cultivares morfológicamente diferentes através do melhoramento de plantas (BAI; LINDHOUT, 2007). Essa diversidade fenotípica é evidente particularmente no que toca ao tamanho e ao formato do fruto (RODRÍGUEZ et al., 2011), sendo essas duas características intimamente ligadas ao número de lóculos. Quase todas as espécies selvagens de *Solanum* seção *Lycopersicum*, bem como uma quantidade de tomateiros cultivados de fruto pequeno, produzem frutos com número de lóculos variando de 2 a 4. No entanto, a maioria das cultivares modernas consumidas hoje em dia produz frutos com oito ou mais lóculos (CONG et al., 2008). Tanksley (2004) destaca que, além do incremento no tamanho do fruto, a domesticação de espécies frutíferas resultou frequentemente em uma grande variação de formato, sendo importante destacar que as formas selvagens e semi-selvagens do fruto do tomateiro são invariavelmente redondas. Portanto, uma característica morfológica que permite distinguir muitas variedades cultivadas de acessos não domesticados é o formato alongado do fruto (GONZALO et al., 2008).

Quatro genes que controlam o formato do fruto em tomateiro já foram clonados, sendo *SUN* e *OVATE* responsáveis por controlar o alongamento do fruto, enquanto *FASCIATED* (*FAS*) e *LOCULE NUMBER* (*LC*) controlam o número de lóculos do fruto e seu formato achatado (RODRÍGUEZ et al., 2011).

A maioria dos frutos desenvolve-se a partir do gineceu, que possui um ou mais carpelos (GILLASPY et al., 1993). O número de carpelos em uma flor de tomateiro determina o número final de lóculos (ou compartimentos) em um fruto maduro (CONG et al., 2008). O número de lóculos afeta o formato e o tamanho do fruto e é controlado por vários QTLs (*Quantitative Trait Loci*) (MUÑOS et al., 2011). O desenvolvimento de um tamanho de fruto extremo vem sendo associado principalmente a dois QTLs, *locule number* (cromossomo 2) e *fasciated*

(cromossomo 11), os quais afetam diretamente o número de carpelos e indiretamente o tamanho final do fruto, com destaque ao locus *fasciated*, que possui o maior efeito (CONG et al., 2008).

Esse aumento no número de lóculos tem demonstrado causar mais de 50% do aumento do tamanho do fruto e acredita-se que representa o último passo no aumento acentuado do peso do fruto do tomateiro durante a domesticação (CONG et al., 2008). *FAS* codifica um fator de transcrição do tipo YABBY que é expresso no início do desenvolvimento do estame e dos carpelos (MUÑOS et al., 2011). O aumento do número de lóculos em LC deve-se a dois polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP) localizados próximos ao stop códon do gene que codifica uma proteína de homeodomínio WUSCHEL (*WUS*) (MUÑOS et al., 2011; RODRÍGUEZ et al., 2011). Em *Arabidopsis*, *WUS* é expresso em uma camada de células da zona central meristemática do caule, com baixa atividade mitótica, denominada centro organizador. A expressão de *WUS* no centro organizador é responsável pela formação de células meristemáticas iniciais (“stem cells”), as quais se situam sobrejacentes ao centro organizador e constituem a matéria prima para formação de células meristemáticas derivadas destinadas à diferenciação e formação de tecidos especializados do caule (REINHARDT, 2003). Esses dois QTLs (*FAS* e *LC*) fazem do tomateiro um excelente modelo no estudo do meristema floral e do desenvolvimento de frutos carnosos (MUÑOS et al., 2011).

A mutação *sun* deve-se a um evento de duplicação de um gene que codifica uma proteína de domínio IQ67 pelo retrotransponon *RIDER*, o que resultou em um novo contexto gênico onde houve um aumento na expressão de *SUN*, culminando em um formato de fruto extremamente alongado (XIAO et al., 2008). *OVATE* é expresso no início do desenvolvimento da flor e do fruto e codifica uma proteína hidrofílica pertencente a uma classe de proteínas regulatórias completamente nova, exclusiva de plantas e ainda não caracterizada, cuja perda de função deve-se à ocorrência de um stop códon prematuro (LIU et al., 2002).

2.5 OVATE

Ovate é um importante locus de característica quantitativa que controla a transição do formato arredondado para o formato “pera” ou alongado. A proteína por

ele codificada possui um domínio C-terminal de 70 aminoácidos conservados em tomateiro, *Arabidopsis* e arroz (LIU et al., 2002). Estima-se que há 18 genes que codificam proteínas que possuem o domínio OVATE distribuídos em todos os 5 cromossomos de *Arabidopsis* (WANG et al., 2011). É provável que os genes *OVATE* controlem o alongamento do fruto também em outras plantas (RODRÍGUEZ et al., 2013).

Em *Arabidopsis thaliana*, um gene que contém o domínio OVATE (*Arabidopsis thaliana Ovate Family Protein – AtOFP1*) mostrou ser um repressor de transcrição que exerce um papel negativo na expansão polar da célula. Tal efeito deve-se, em parte, à atuação direta de *AtOFP1* reduzindo a expressão de *AtGA20ox1*, um gene que codifica uma enzima chave na biossíntese de giberelina (WANG et al., 2007). Esses resultados indicam que a mutação *ovate* em tomateiro é a perda de função de um repressor de crescimento, o que sugere que seu efeito no alongamento do fruto deve ser mais atribuído à promoção do crescimento longitudinal do que à repressão do crescimento radial dos carpelos. WANG et al. (2011) concluíram que todas as proteínas da família OVATE em *Arabidopsis* (AtOFP) podem funcionar como repressores transcricionais, o que indica que AtOFP podem representar uma nova família de repressores de transcrição.

Rodríguez et al. (2013) mapearam dois loci responsáveis pela supressão da mutação *ovate* em tomateiro, localizados nos cromossomos 10 e 11. Esses autores apontam a importância da identificação de genes que controlam tal supressão, o que poderia levar a um maior entendimento de como o formato do fruto é controlado por esse gene e o papel da família de proteínas OVATE no desenvolvimento vegetal.

2.6 Partenocarpia

A formação do fruto sem a ocorrência da fecundação é um fenômeno denominado partenocarpia (GORQUET et al., 2008). Frutos partenocárpicos geralmente não possuem sementes e podem ser obtidos através da aplicação de hormônios (auxina e/ou giberelina) no ovário. Nos últimos anos, o processo de desenvolvimento do fruto vem sendo objeto de muitos estudos que investigam fatores bioquímicos e genéticos que controlam a frutificação e maturação (PANDOLFINI, 2009). Grande parte desses estudos vem sendo realizada em

tomateiro, por ser considerado um modelo no estudo do desenvolvimento de frutos carnosos (PANDOLFINI, 2009). Campos et al. (2010) destacam a importância do tomateiro como modelo genético por ser uma espécie de elevado interesse econômico, capaz de unir as ciências básicas e aplicadas. Como um membro das Solanáceas, o tomateiro tem uma relação próxima com a batata (*Solanum tuberosum*), a pimenta (*Capsicum annuum* e outras espécies), a berinjela (*Solanum melogena*), o tabaco (*Nicotina tabacum*) e a petúnia (*Petunia hybrida*) (NEVINS; RICHARD, 1987). A grande variabilidade genética do tomateiro deu origem a grandes bancos de germoplasma contendo mutantes e espécies selvagens que são importantes ferramentas para o entendimento das bases bioquímicas e fisiológicas de diversos eventos, incluindo a frutificação (NEVINS; RICHARD, 1987).

O conhecimento fisiológico da partenocarpia no tomateiro pode ser estendido para outras culturas que apresentam problemas com pegamento de frutos. No desenvolvimento normal, a decisão do pegamento é dependente do sucesso de uma completa polinização e fertilização. A fertilização após a polinização requer a germinação do grão de pólen, a penetração e o crescimento do tubo polínico até o óvulo, para que ocorra a fusão com a célula ovo (NITSCH, 1970).

Fontes naturais de partenocarpia vêm sendo estudadas devido às perspectivas de aplicação prática na produção de frutos sem sementes em tomateiro (GORGUET et al., 2008). A partenocarpia natural é o resultado de causas genéticas, podendo ser obrigatória (resultado de esterilidade genética, o que requer propagação vegetativa) ou facultativa (a expressão de partenocarpia é dependente de condições ambientais) (ATHERTON; RUDICH, 1986). A existência de mutantes sem sementes é relatada em muitas espécies, as quais não são exploradas comercialmente como cultivares, devido ao fato de mutações de frutos partenocárpicos serem muitas vezes pleiotrópicas, sendo associadas a características desfavoráveis para programas de melhoramento, como a esterilidade masculina ou feminina.

A obtenção de frutos partenocárpicos de tomateiro é de interesse industrial para a confecção de molhos e ketchups, uma vez que não é necessária a retirada de sementes durante o processamento do fruto, o que torna o processo mais ágil e menos oneroso (HAZRA; DUTTA, 2010). Outro aspecto comercial importante é o consumo *in natura* do tomate, sendo que a ausência de sementes pode incrementar a aceitação do fruto pelo consumidor (ROTINO et al., 1997). Além disso, as

sementes podem produzir substâncias que aceleram a deterioração do fruto, como já conhecido em melão e berinjela (PANDOLFINI, 2009).

A independência do desenvolvimento do fruto quanto à fertilização é vantajosa para a horticultura quando a taxa de frutificação é baixa (PANDOLFINI, 2009). Do ponto de vista agrônomo, a partenocarpia pode ser uma solução interessante para os problemas de baixa viabilidade e baixa produção de pólen, ocasionados por diversos fatores ambientais como baixa luminosidade ou temperaturas extremas, afetando tanto cultivos em campo aberto quanto em casas de vegetação (HAZRA; DUTTA, 2010). Tais fatores ambientais desfavoráveis podem afetar tanto a maturação do pólen quanto a fertilização (PANDOLFINI, 2009). Sendo assim, a fertilização e a frutificação podem ser interrompidas por condições ambientais adversas, resultando em uma queda de produtividade. Neste caso, a frutificação pode ser frequentemente alcançada através da indução à partenocarpia (ATHERTON; RUDICH, 1986).

Segundo Gorguet et al. (2008), a produção normal de pólen é restrita a uma faixa de temperatura específica, sendo por vezes necessárias vibrações mecânicas das flores, realizadas manualmente ou por abelhas, para garantir a liberação do pólen. Em casas de vegetação, a entomofilia muitas vezes não é eficiente, uma vez que o material utilizado para a cobertura das estufas apresenta filtros contra raios ultra-violetas, essenciais para orientação dos insetos e conseqüente busca de pólen.

Em tomateiro, a partenocarpia é considerada como uma ferramenta atrativa para solucionar problemas de frutificação em condições desfavoráveis (GORGUET et al., 2008). Segundo Atherton e Rudich (1986), há diferentes caminhos para a obtenção da partenocarpia genética em tomateiro, sendo a hibridização interespecífica uma potencial fonte. Gorguet et al. (2008) apontam cultivares oriundas de cruzamentos entre *S. lycopersicum* (espécie comercial) e espécies selvagens, como *Solanum habrochaites* e *Solanum peruvianum* que apresentam partenocarpia. Em comparação com cultivares modernas, variedades selvagens, conhecidas como “crioulas”, são altamente heterogêneas (FERNIE et al., 2006) e apresentam um grande valor potencial devido à diversidade de germoplasma que oferecem (RICK, 1978). As espécies selvagens abrangem uma vasta quantidade de variações genéticas naturais, podendo ser utilizadas como fonte de resistência a doenças e insetos e tolerância a estresse (RICK, 1986).

Mutações responsáveis por alterações no formato de frutos podem estar ligadas ao desenvolvimento do fruto sem a ocorrência de fecundação. Segundo Wu *et al.*, (2011), a superexpressão do gene *SUN* leva ao desenvolvimento de frutos partenocárpicos, o que pode ser causado por uma possível alteração dos níveis de auxina ou sua distribuição no fruto (XIAO *et al.*, 2008).

Assim como *SUN*, a alteração na expressão de *OVATE* induz a uma alteração no formato do fruto. Tal gene é apontado por Liu *et al.* (2002) como responsável pela conversão do fruto do tomate de arredondado para formato semelhante a uma pêra. As diferenças morfológicas entre os frutos podem ser atribuídas, no que se refere ao mutante *ovate*, a uma bem definida modulação na proliferação e diferenciação celular no fruto (LIU *et al.*, 2002).

2.7 Micro-Tom como modelo genético e fisiológico

Apesar das consideráveis vantagens da *Arabidopsis* como modelo genético, o conhecimento adquirido nesta espécie não pode ser aplicado a todas as outras espécies vegetais. Por possuir um fruto do tipo seco, *Arabidopsis* não é um modelo adequado para o estudo de frutos carnosos (MEISSNER *et al.*, 1997). Além de não possuir frutos carnosos e climatéricos, a ausência de algumas outras características, tais como folhas compostas e tricomas multicelulares, sugere a necessidade da utilização de modelos vegetais alternativos para o estudo de diferentes eventos de desenvolvimento (CAMPOS *et al.*, 2010).

O tomateiro oferece um bom modelo para espécies cujos frutos também são carnosos (MEISSNER *et al.*, 1997). É o sistema modelo favorito tanto para estudos genéticos clássicos quanto para estudos moleculares. Essa preferência é justificada por diversas características, tais como o fato de ser um diplóide simples, ter seu genoma repleto de marcadores convencionais e moleculares e possuir uma arquitetura de planta que facilita a detecção de uma enorme quantidade de variações hereditárias. Como resultado, o tomateiro possui uma grande quantidade de germoplasma disponível abrangendo espécies selvagens que se cruzam com o tomateiro cultivado. Vantagens adicionais do tomateiro como modelo são a simplicidade na sua manipulação devida ao fato de ser autógamo e de fácil cultivo,

ter sua cultura de tecidos já estabelecida e manter o status de cultura de grande importância econômica (RICK; YODER, 1988).

Utilizando-se do mesmo raciocínio que faz o sucesso da *Arabidopsis*, ou seja, o pequeno tamanho, o ciclo de vida curto e a fácil transformação genética, foi desenvolvido um tomateiro-modelo capaz de contribuir para o estudo de genética e isolamento de genes importantes. Esse sistema é baseado em uma cultivar miniatura com hábito de crescimento determinado, denominada Micro-Tom (MEISSNER et al., 1997). A cultivar Micro-Tom (MT) torna possível a combinação dos benefícios diretos de se estudar uma cultura de interesse agrônomo com o ciclo de vida curto e o pequeno porte desejáveis em um modelo biológico (CAMPOS et al., 2010).

Outro fator que contribui para o fortalecimento de MT como um modelo genético e fisiológico é o grande número de mutações introgridas nesse background. Desse ponto de vista, mutantes de tomateiro constituem não somente uma fonte essencial de material vegetal para melhoristas como também uma ferramenta valiosa no isolamento de importantes genes que regulam padrões de desenvolvimento em tomateiro, cujos papéis funcionais estão agora sendo elucidados (LOZANO et al., 2009).

3 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o impacto da mutação em formato de fruto *ovate* em eventos do desenvolvimento com importância agronômica, bem como estabelecer o papel de tal mutação em alterações hormonais durante o desenvolvimento do fruto.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter material quase isogênico à cv Micro-Tom contendo a mutação *ovate*, para que comparações acuradas pudessem ser realizadas.
- Caracterizar a mutação *ovate* quanto às alterações morfológicas desde a formação do ovário nos primeiros botões florais até o crescimento do fruto após antese.
- Verificar o impacto da mutação *ovate* no teor de sólidos solúveis do fruto, bem como na alteração no número de lóculos, peso dos frutos, matéria seca, peso das sementes e diâmetro da cicatriz peduncular.
- Quantificar a perda de água dos frutos de MT e *ovate* durante o armazenamento e analisar o impacto da mutação na qualidade pós-colheita.
- Estabelecer, por meio de análises histoquímicas, o papel da mutação *ovate* em alterações hormonais.
- Analisar a influência da mutação *ovate* na formação de frutos partenocárpicos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Condições de cultivo

Os experimentos foram realizados na casa de vegetação do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal, localizada no Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ/USP, a qual possui sistema de irrigação automático (4 vezes ao dia), temperatura média anual de 28 °C, fotoperíodo de 11h/13h (inverno/verão), e radiação de 250-350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Os genótipos foram semeados em vasos de 350 mL (20 sementes por vaso) e, após a formação da primeira folha verdadeira, transplantados individualmente para vasos de 350 mL (plantas onde foram analisadas partenocarpia, número de lóculos, teor de sólidos solúveis, peso do fruto e diâmetro da cicatriz peduncular) ou floreiras de 8 L (plantas que tiveram seus frutos expostos a ensaio GUS, teor de matéria seca, perda de peso do fruto e tempo de prateleira). Tanto o substrato de semeadura quanto o de transplântio contém uma mistura do substrato comercial Basaplant® e vermiculita, na concentração de 1:1. Foram adicionados 1g do fertilizante formulado NPK (10-10-10) e 4g de calcário por litro de substrato de semeadura. O substrato utilizado para o transplântio das mudas se diferencia do substrato utilizado para semeadura somente na concentração de fertilizante, sofrendo a adição de 4 g/L de NPK 10-10-10. O mesmo fertilizante foi utilizado como cobertura no início da floração e no início da frutificação, sendo aplicados 0,5 g por vaso. Foram realizadas aplicações foliares semanais com o fertilizante Peters® (2g/L).

5.2 Material vegetal

A mutação *ovate*, introgridida no background genético Micro-Tom durante a realização do projeto, está descrita na Tabela 1, que conta também com a descrição dos genótipos *DR5::GUS* e *ARR5::GUS*, que já se encontravam no background MT

e foram utilizados durante o trabalho para a obtenção dos duplos-mutantes *ovate DR5::GUS* e *ovate ARR5::GUS*.

Tabela 1 - Descrição dos genótipos utilizados no estudo

Mutantes	Função gênica	Característica morfológica	Ref.
<i>ovate (o)</i>	Regulador negativo da expansão celular	Frutos alongados (pear-shaped).	LIU <i>et al.</i> , 2002
<i>DR5::GUS</i>	Promotor responsivo sintético para auxina (TGTCTC) fundido com o gene repórter <i>gusA</i>	Plantas apresentam atividade GUS em locais onde há acúmulo de auxina	DOBBSS <i>et al.</i> , 2010 MARTÍ <i>et al.</i> , 2010
<i>ARR5::GUS</i>	Promotor responsivo de citocinina de <i>Arabidopsis</i> fundido com o gene repórter <i>gusA</i>	Plantas apresentam atividade GUS em locais de acúmulo endógeno de citocinina ou que respondem à aplicação do hormônio.	D'AGOSTINO <i>et al.</i> , 2000

5.3 Obtenção dos genótipos

As plantas transgênicas *DR5::GUS* e *ARR5::GUS* já faziam parte da coleção de genótipos do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal (www.esalq.usp.br/tomato). A mutação *ovate*, oriunda de uma cultivar local, foi introgridida na cultivar MT durante o presente trabalho. A introgressão consistiu em seis retrocruzamentos, onde a cultivar MT sempre foi utilizada como receptora de pólen. A triagem foi realizada com base no formato do fruto, sendo importante lembrar que a mutação *ovate*, por ser recessiva, é visualizada somente quando em homozigose.

Os duplos mutantes *ovate DR5::GUS* e *ovate ARR5::GUS* foram obtidos através do cruzamento entre os materiais transgênicos *DR5::GUS* e *ARR5::GUS* e o mutante em formato de fruto *ovate*. Os duplos-mutantes foram triados com canamicina na geração F3, selecionando-se plantas resistentes ao antibiótico (presença do marcador *nptII* que co-segrega com os transgenes DR5 e ARR5). Anteriormente, em F2, o mesmo genótipo havia sido triado para formato de fruto,

onde foram selecionadas plantas que apresentavam *ovate* em homozigose, como exemplificado na obtenção do duplo-mutante *ovate DR5::GUS* (Figura 2).

Figura 2 - Obtenção do duplo-mutante *ovate DR5::GUS*. As triagens para a obtenção do material vegetal desejado ocorreram em F2 (seleção para *ovate*) e F3 (seleção para *DR5::GUS* e *ARR5::GUS*)

5.4 Peso, teor de sólidos solúveis, número de lóculos e produtividade média

Os frutos oriundos das plantas que compuseram os controles polinizados de MT e *ovate*, no experimento de partenocarpia, foram avaliados em relação ao número de lóculos, teor de sólidos solúveis e peso. Para isso, após pesados em balança analítica, os frutos foram cortados ao meio para a contagem do número de lóculos e avaliação do teor de sólidos solúveis por meio de um refratômetro (Atago PR-101, Bellevue, WA). A pesagem dos frutos possibilitou o cálculo da produtividade média de cada genótipo, obtida dividindo-se o peso total dos frutos pelo número total de plantas avaliadas.

Os frutos tiveram ainda a área da cicatriz peduncular extirpada do restante do fruto. Tal área foi fotografada em lupa e foram realizadas medições do diâmetro da cicatriz peduncular através do programa Leica Application Suite - LAS.

5.5 Avaliação da perda de água dos frutos

Tal experimento foi realizado com intuito de avaliar o impacto da alteração no diâmetro da cicatriz peduncular em *ovate* na perda de água do fruto. Os frutos dos genótipos MT e *ovate* foram selecionados no mesmo estágio (completamente maduros) e acondicionados em recipientes plásticos que permitiam trocas gasosas com o ambiente externo. 10 frutos de MT e 8 frutos de *ovate* foram pesados em balança analítica a cada três dias até os 21 dias pós colheita.

5.6 Avaliação do tempo de prateleira

Os mesmos frutos utilizados na avaliação de perda de água foram classificados em apropriados e inapropriados para o consumo aos 21 dias após a colheita. Foram considerados inapropriados os frutos que apresentaram perda de firmeza na polpa, podridão e/ou dano externo que impossibilitaria a comercialização do produto.

5.7 Avaliação da matéria seca

Este experimento contou com 2 tratamentos (MT e *ovate*) e 10 repetições. Após pesados, os frutos foram deixados em estufa a 60 °C. Ao fim de 5 dias foram retirados e pesados novamente. O teor de matéria seca foi calculado em relação ao peso fresco através da seguinte equação: $MS(\%) = PS/PF \times 100$, onde MS= matéria seca; PS= peso seco e PF= peso fresco.

5.8 Caracterização da antese em MT

Foram marcadas 5 flores de cada medida (2,3,4,5,6,7,8 e 9 mm) e contatos o número de dias que tais flores levavam para ter suas pétalas totalmente abertas. As medidas foram aferidas por meio de paquímetro digital.

5.9 Medição de ovário e frutos e ensaio histoquímico

Para o acompanhamento do desenvolvimento floral dos genótipos MT e *ovate* foram utilizados os genótipos MT *DR5::GUS*, MT *ARR5::GUS* e os duplo-mutantes *ovate DR5::GUS* e *ovate ARR5::GUS*.

Foram medidos, cortados e expostos ao teste histoquímico com 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-gluc), ovários e frutos representativos de 6 estágios de desenvolvimento: menor botão floral passível de emasculação; flor que apresenta sépalas proeminentes; antese; fruto após a queda das pétalas; fruto despontando cujas sépalas apresentam-se totalmente abertas; fruto onde as sépalas encontram-se em curvatura contrária ao mesmo. As medidas dos ovários e dos frutos até 5 dias após a antese foram aferidas através do programa Leica Application Suite – LAS. Os frutos de 11 e 16 dias após a antese foram fotografados por câmera fotográfica e tiveram suas medidas aferidas com o auxílio do programa ImageJ (disponível em: <http://rsbweb.nih.gov/ij>).

Após fotografados e medidas as dimensões de frutos e ovários, os mesmos foram cortados e colocados em solução de X-gluc, conforme Jefferson et al., (1987), por 24 horas, sendo posteriormente colocados em álcool 70. Após a descoloração proporcionada pelo álcool, o material foi fotografado em lupa.

5.10 Teste de partenocarpia

Para se avaliar a partenocarpia de MT e *ovate*, foram utilizadas 30 plantas de cada genótipo. Destas 30 plantas, 20 foram emasculadas e 10 utilizadas como controle, sendo para isso manualmente polinizadas após a emasculação. A

polinização de todo o controle foi realizada com pólen do genótipo MT. A emasculação consiste na retirada de todos os estames da flor, visando o impedimento do acesso dos grãos de pólen ao estigma de uma mesma flor (autofecundação).

Foram emasculadas em cada planta 3 flores da primeira inflorescência e 3 flores da segunda, totalizando 6 flores emasculadas por planta. Em cada planta foram avaliados o tamanho e peso dos frutos, bem como a taxa de frutificação (n° de frutos estabelecidos $\times$ 100/ n° de flores emasculadas). Os frutos foram colhidos, pesados e medidos no início do processo de maturação, quando visualizada a primeira alteração na coloração. Para a obtenção de tais dados, foram utilizadas uma balança de precisão e um paquímetro digital.

5.11 Avaliação do peso das sementes

O peso médio de 100 sementes foi obtido para os genótipos MT e *ovate*. O experimento contou com 10 repetições (lotes de 100 sementes), que foram pesadas em uma balança de precisão (quatro casas decimais).

5.12 Análises estatísticas

Os dados obtidos nos experimentos foram analisados através do programa estatístico R, versão 3.0.2 (2013). Após serem expostos ao teste de normalidade, os dados tiveram sua variância analisada. Os dados que apresentaram distribuição normal tiveram suas médias comparadas pelo teste de Student. Os dados que não apresentaram distribuição normal tiveram suas médias comparadas através do teste de Wilcoxon. Todos os experimentos contidos nesse trabalho foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Introgessão de *ovate* no background MT

A introgessão visa à obtenção de uma linhagem quase isogênica, onde qualquer alteração fenotípica verificada no genótipo pode ser atribuída à mutação em somente um gene. A utilização de linhas quase isogênicas permite que caracteres possam ser estudados e comparações na ação de um gene ou efeito de seu alelo possam ser realizadas sem que haja interferência ou distúrbios resultantes da diferença de backgrounds (SMITH; RITCHIE, 1983). A realização da introgessão do alelo mutado *ovate* no background MT (Figura 3) possibilitou a obtenção de duplos mutantes com o objetivo de monitorar a distribuição espacial dos hormônios vegetais auxina e citocinina, uma vez que os transgênicos *DR5::GUS* e *ARR5::GUS* também se encontravam no background MT. Duplos mutantes são ferramentas interessantes no estudo de funções gênicas bastante utilizadas no Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal (CAMPOS et al., 2009). A

Figura 4 ilustra algumas alterações fenotípicas que podem ser atribuídas à mutação em *ovate*, como número de lóculos, formato e diâmetro da cicatriz peduncular do fruto.

Figura 4 - Alterações fenotípicas no fruto oriundas da introgressão do alelo mutado *ovate* (B, D e F) e o controle MT (A, C e E). (A e B) Redução no número de lóculos no mutante em relação à MT. (C e D) Alteração no formato do fruto, que se mostra mais alongado em relação ao controle. (E e F) Redução no diâmetro da cicatriz peduncular em *ovate*. Escala = 1cm (figuras A, B, C e D) e 4 mm (figuras E e F)

6.2 Caracterização fenotípica de *ovate*

Apesar de já clonado (LIU et al., 2002), pouco se sabe a respeito das proteínas que contém o domínio OVATE em plantas, sendo seus mecanismos moleculares e função desconhecidos (WANG et al., 2007). A caracterização do efeito de *ovate* em tomateiro, realizada por Liu et al. (2002) abordou somente as alterações no formato do fruto, sendo a caracterização mais abrangente realizada em *Arabidopsis* (WANG et al., 2007). Portanto, pode-se dizer que pouco se sabe sobre *ovate*, tanto sua função molecular quanto seus efeitos gênicos necessitam ainda de caracterização. O efeito de um gene pode ser inferido através da observação de fenótipos associados a variações alélicas, sendo que a análise de genótipos que estão no mesmo background genético pode fornecer resultados valiosos.

Por promover alterações no fruto, é interessante, do ponto de vista fisiológico, que seja desvendada a relação entre *ovate* e os hormônios vegetais intimamente ligados ao processo de frutificação do tomateiro. Por estar presente em diversas cultivares, torna-se importante a caracterização do impacto dessa mutação em características de interesse agrônomo.

6.2.1 Determinação do diâmetro da cicatriz peduncular, variação do número de lóculos e teor de matéria seca

Nossa hipótese de trabalho é de que a mutação em *ovate* é responsável por muitas alterações fenotípicas no fruto, além do seu formato. Utilizando linhagens quase isogênicas, no presente trabalho, foi demonstrado inequivocamente que a mutação *ovate* é responsável pela redução no diâmetro da cicatriz peduncular, bem como no teor de matéria seca e número de lóculos do fruto (Figura 5).

É chamada cicatriz peduncular a marcação resultante do destacamento do fruto de seu pedúnculo (Figura 4E-F). A redução do diâmetro da cicatriz poderia resultar em uma menor chegada de carboidratos aos frutos, o que sugere uma redução no teor de sólidos solúveis em *ovate*, como será abordado no item 6.4.1. A cicatriz peduncular é uma estrutura que está relacionada à perda de água pelo fruto após sua colheita, fator este intimamente ligado à qualidade do fruto e a ao tempo que o mesmo ficará disponível ao consumidor no mercado, como será abordado no item 6.4.2.

O melhoramento genético resultou em cultivares com uma maior quantidade de número de lóculos (CONG et al., 2008) o que indiretamente proporciona um aumento no peso do fruto. A diminuição no número de lóculos em *ovate*, por resultar em uma potencial redução de peso, seria um aspecto indesejável do ponto de vista do melhoramento causado pela referida mutação. Porém, a diminuição do número de lóculos pode estar relacionada ao aumento do teor de matéria seca apresentado pelo mutante, esta sim uma característica desejável, pela possibilidade de estar relacionada a um incremento nutricional ou a melhorias organolépticas no fruto.

O mutante *ovate* normalmente também apresenta uma proeminência na porção estilar do fruto (dados não mostrados), a qual não é preenchida pelo tecido locular, mas sim por um tecido que aparenta ter menor teor de água. Tal característica, somada à diminuição do número de lóculos, pode ser responsável pelo aumento nos teores de matéria seca nos frutos de *ovate*.

Figura 5 - Características fenotípicas do fruto alteradas pela mutação *ovate*. (A) Diâmetro da cicatriz peduncular. (B) Teor de matéria seca. (C) Número médio de lóculos. * e *** significam $P < 0,05$ e $P < 0,001$, respectivamente, de acordo com o teste-t de Wilcoxon

6.2.2 Determinação do peso médio de 100 sementes

O desenvolvimento da semente consiste em três estágios: divisão celular, diferenciação celular e maturação (DOGANLAR et al., 2000). Durante a primeira fase, a morfogênese, é definida a polaridade do corpo vegetal, com a especificação dos ápices caulinar e radicular e a formação do tecido embrionário. Durante a segunda fase, ocorre a maturação do embrião, caracterizada pelo acúmulo de reservas armazenadas. Na fase final, o embrião se prepara para a dessecação, entrando em um período de repressão do desenvolvimento (WEST; HARADA, 1993). As relações entre transições no desenvolvimento, ação dos hormônios e a fisiologia do desenvolvimento da semente ainda não são bem compreendidas (CASTRO; HILHORST, 2006).

Cultivares “grape”, onde a mutação *ovate* frequentemente se encontra (RODRÍGUEZ et al., 2011), apresentam geralmente sementes menores, portanto mais leves, do que as apresentadas por outras cultivares convencionais. No presente trabalho, constatou-se que a mutação *ovate* diminui o peso das sementes (Figura 6), indicando que essa mutação é um dos componentes que contribui para o diminuto tamanho de semente característico das cultivares “grape”. As alterações nos níveis hormonais do ovário durante o desenvolvimento do fruto (ver item 6.3.3) podem ser responsáveis pela redução do peso médio das sementes de *ovate*. Alternativamente, pode haver alteração na dinâmica hormonal da própria semente durante o seu desenvolvimento.

Os altos níveis de auxina característico do desenvolvimento inicial do fruto (ver Figura 1) sugerem que processos regulados pela auxina podem ser importantes nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário, auxiliando talvez no sustento da rápida taxa de divisão celular requerida para a construção do embrião no estágio globular (MICHALCZUK et al., 1992). A redução no tamanho da semente de *ovate* sugere que durante as primeiras fases do desenvolvimento do ovário possa haver uma diminuição nos níveis hormonais em relação ao controle MT, particularmente nos níveis de citocinina, a qual é importante tanto para manter as taxas de divisão celular no embrião em formação quanto para estabelecer drenos para acumular reservas no endosperma.

Figura 6 - Peso médio de 100 sementes. *** significa $P < 0,001$, de acordo com o teste-t de Student

6.3 Caracterização do desenvolvimento do ovário

Apesar de muitos trabalhos (LINDSTROM, 1927; HOUGHTALING, 1935; TANKSLEY, 2004; BREWER et al., 2007; GONZALO; VAN DER KNAAP, 2008; RODRÍGUEZ et al., 2011, 2013) englobarem, em certo nível, a caracterização fenotípica de ovários e frutos de genótipos que apresentam alelos mutados *ovate*, nenhum deles utilizou linhagens quase isogênicas ou abordou alterações fenotípicas ao longo do desenvolvimento do fruto. Normalmente, tais trabalhos utilizam-se de cultivares de uso agrônomo que carregam a mutação *ovate* e limitam suas análises ao índice de formato (shape index), valor alcançado dividindo-se o diâmetro equatorial do fruto por seu diâmetro polar.

Entender as alterações ocorridas pela mutação em OVATE e em qual fase do desenvolvimento do ovário elas ocorrem é fundamental para a compreensão do papel desse gene no processo de frutificação. Para tal fim, a caracterização do desenvolvimento floral do próprio MT mostrou-se necessária.

6.3.1 Caracterização dos estágios florais de MT

Para se proceder às análises previstas no projeto, tornou-se necessária a realização de um experimento visando caracterizar os estágios da floração em MT,

culminando com a antese. Para isso, foram marcadas flores de diferentes tamanhos e contados os dias que as mesmas levavam para chegar à antese. Tal dado nos permitiu estimar o número de dias antes da antese de uma flor com relação ao seu tamanho e o acompanhamento do desenvolvimento do ovário. É importante destacar que experimentos prévios nos mostraram a extrema variação da relação tamanho/dias antes da antese, e que tal relação é provavelmente muito dependente de fatores ambientais. Os dados obtidos, retratados na tabela 2, deram origem à Figura 7, onde as imagens correspondem às medidas utilizadas na tabela. Mais do que fornecer uma ligação entre comprimento da flor e dias que faltam para a antese, tal experimento contribuiu para a definição dos estágios mais marcantes do desenvolvimento floral de MT, tendo como base somente a morfologia externa da flor e do ovário. O acompanhamento completo do desenvolvimento floral de tomateiro pode ser verificado no trabalho de Brukhin et al. (2003), onde os autores separam a ontogenia do tomateiro em 20 estágios com base no desenvolvimento do carpelo e do estame e fazem a ligação entre tais estágios e o respectivo comprimento da flor.

Tabela 2 - Comprimento da flor (mm) e estimativa da quantidade de dias que faltam para a antese em Micro-Tom

Comprimento da flor (mm)	Dias antes da antese
2	12
3	10
4	8
5	7
6	4
7	3
8	2
9	1

Figura 7 - Desenvolvimento floral do modelo Micro-Tom e os dias correspondentes para a antese. O estágio classificado como pré-antese pode ocorrer tanto um dia antes da antese quanto no mesmo dia da abertura total da flor

6.3.2 Medições dos ovários e frutos em MT e *ovate*

O acompanhamento do desenvolvimento floral permitiu a escolha dos estágios mais marcantes em MT, a serem também acompanhados em *ovate*. O acompanhamento do desenvolvimento dos ovários e frutos originou a Figura 8, onde o desenvolvimento floral e a frutificação de MT e *ovate* podem ser observados e comparados.

Figura 8 - Desenvolvimento da flor, ovário e fruto de Micro-Tom (MT) e *ovate*. A escala presente nas imagens de fundo azulado corresponde a 2 mm, enquanto nas imagens de fundo preto corresponde a 1 cm. Pode-se notar que as alterações fenotípicas no ovário se expressam já no início do desenvolvimento, antes mesmo da antese (-Xd) culminando com uma dramática alteração no formato do fruto aos 16 dias após antese (+Xd)

Foram tomadas as medidas dos ovários e frutos de MT e *ovate* nos sentidos transversal (largura) e longitudinal (comprimento) nos 6 estágios retratados na Figura 9. Desde o início do desenvolvimento, o ovário de *ovate* apresenta um aumento de tamanho no sentido longitudinal em relação à MT (Figura 9A). Tal diferença de tamanho tende a ser maior à medida que o fruto se desenvolve. O inverso acontece quando se compara as medidas transversais dos genótipos (Figura 9B). Durante todo o seu desenvolvimento, o ovário de *ovate* apresenta uma redução em sua medida transversal quando comparado à MT. A formação do fruto resulta da relação entre divisão e expansão celular, sendo que o controle desses dois fenômenos do desenvolvimento determina de forma crucial o formato e o tamanho

final do fruto (JOURBÈS et al., 2000). Portanto, a diferenciação fenotípica apresentada pelos frutos do mutante pode estar ligada a uma alteração nos padrões de divisão ou expansão celular nos ovários.

Como foi dito anteriormente, sabe-se que as proteínas codificadas pelos genes da família *ovate* são repressores do crescimento, podendo influenciar tanto a biossíntese de giberelina e expansão celular quanto a formação da parede celular secundária (WANG et al., 2007, 2011; LI et al., 2011). Como a mutação utilizada no trabalho é uma perda de função de OVATE (LIU et al., 2002), seria esperado que tal mutação acarretasse frutos maiores, o que corresponde ao fenótipo apresentado por *ovate* no sentido longitudinal. Porém a perda de função de um repressor do crescimento dificilmente explicaria a redução nas dimensões do fruto de *ovate* no sentido transversal. Tal fato pode ser explicado pela redução no número de lóculos (Figura 4 A e B) ou alterações hormonais (ver item 6.3.3) apresentados pelo mutante.

Figura 9 - Medidas dos ovários e frutos de Micro-Tom (MT) e *ovate*. Dias antes da antese = - Xd; dias após antese = + Xd. * e *** significam $P < 0,05$ e $P < 0,001$, respectivamente, de acordo com o teste-t de Student ou de Wilcoxon

6.3.3 Ensaio histoquímico

A região promotora sintética *DR5*, contém 9 repetições invertidas de sequências contendo o elemento de resposta à auxina (AuxRE) TGTCTC e um promotor mínimo *CaMV35S*. Quando na presença de auxina, esse promotor permite a transcrição do gene reporter *gusA* que, reagindo com o substrato 5-bromo-4-

chloro-3-indolyl glucuronide (x-gluc), resulta em um produto de coloração azul (ULMASOV et al., 1997). Tal construção permite a visualização dos locais onde a auxina está presente. O *ARR5* é a região promotora de um gene de resposta a citocinina isolado em *Arabidopsis* fusionado ao gene *gusA*. De modo análogo a *DR5::GUS*, o *ARR5::GUS* pode ser utilizada no exame da distribuição espacial de citocinina (D'AGOSTINO et al., 2000).

Através do ensaio histoquímico, pode-se visualizar as áreas onde estão concentrados os hormônios auxina e citocinina (Figura 10). Podemos notar que o mutante *ovate* apresenta menores concentrações hormonais, tanto de auxina quanto de citocinina, nos estágios iniciais do desenvolvimento. Esta menor concentração, mais notavelmente de citocinina, poderia resultar em uma menor divisão celular no sentido transversal. A menor proliferação celular no sentido transversal em *ovate* poderia explicar a diferença apresentada entre os genótipos em suas dimensões. Este cenário se inverte nos estágios subseqüentes, onde a concentração de auxina e citocinina se sobressaem em *ovate* em relação à MT. Neste estágio, o ovário de *ovate* é maior no sentido longitudinal, enquanto sua largura, embora sempre menor, tende a se aproximar à de MT (Figura 9). É importante ressaltar que *OVATE* é expresso no início do desenvolvimento floral, apesar de seus transcritos poderem ser detectados duas semanas após a antese, coincidindo com a etapa de formação do fruto (LOZANO et al., 2009).

Embora as alterações na distribuição hormonal em *ovate* verificadas nos experimentos sejam capazes de explicar a alteração fenotípica apresentada por seu fruto, há ainda a hipótese de que o fenótipo *ovate* se dê independentemente de alterações nos hormônios auxina e citocinina. Sabe-se que, em *Arabidopsis*, o complexo KNOX-OVATE está envolvido na repressão da formação da parede secundária (LI et al., 2011). Ou ainda, tal fenótipo poderia ser relacionado com um aumento nas concentrações de giberelina, outro hormônio importante para a formação de frutos. Nesse sentido, Wang et al. (2007) estudaram um mutante de *Arabidopsis* que apresenta elevada expressão de uma proteína da família OVATE (AtOFP1) e concluíram que tal proteína é um repressor transcricional da expansão polar da célula, sendo que tal proteína regula negativamente o gene *AtGA20ox1*, importante na biossíntese de giberelina. A alteração nos níveis de giberelina no fruto poderão ser confirmadas através do ensaio histoquímico com o duplo mutante *ovate GARE::GUS*. A construção *GARE::GUS* (ROGERS et al., 1994) já se encontra no

Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal e necessita ainda ser introduzida na cultivar MT, quando, através de cruzamento com o mutante *ovate* poderá originar o duplo-mutante.

Wang et al. (2013), em análise de transcriptoma do tecido do pedicelo de tomateiro, concluíram que proteínas da família OVATE são reguladas negativamente na camada de abscisão durante a abscisão do fruto. Infelizmente, nossos ensaios histoquímicos não foram conduzidos até o amadurecimento e abscisão do fruto, impossibilitando a análise da distribuição hormonal no pedicelo durante essa fase do desenvolvimento. Podemos, porém, notar um maior acúmulo de citocinina na camada de abscisão em *ovate*, especificamente durante a antese e aos 5 dias pós antese. Apesar da citocinina não ser apontada como um hormônio chave no controle da abscisão do fruto, um ensaio histoquímico mais abrangente, englobando as fases de amadurecimento até a abscisão do fruto, poderia esclarecer se o envolvimento de OVATE no controle da abscisão se dá através da modulação da distribuição de citocinina no pedicelo.

Figura 10 - A coloração azul indica as áreas onde os hormônios auxina (DR5) e citocinina (ARR5) estão concentrados nos ovários e frutos de MT e *ovate*. Dias antes da antese = - Xd; dias após antese = + Xd. A barra de escala indica = 500 μ em -12d; 2 mm em -3d, antese e +5d; 1 cm em +11d e +16d

6.4 Caracterização agrônômica de *ovate*

Neste tópico serão abordados impactos oriundos da mutação em *OVATE* em caracteres de interesse agrônômico. Tal mutação está presente em várias cultivares comerciais e é de importância fundamental para a obtenção de tomates de formato ovalado. A preferência por determinado tipo de formato depende do tipo de produto a que se destina o tomate, configurando-se as cultivares com frutos do tipo periforme e oblongo as preferidas para produção de frutos pelados inteiros e também para produção de tomate em cubos (SILVA et al., 2003).

6.4.1 Determinação da produtividade e do teor de sólidos solúveis

A produtividade é uma questão central na manutenção de qualquer atividade agrícola. A busca por cultivares mais produtivas vem norteando programas de melhoramento genético em várias culturas. Se, para o produtor, a produtividade é uma questão de fundamental importância, para o consumidor o sabor é um dos quesitos que ocupa o primeiro plano na escolha de um alimento. O sabor de frutas e dos vegetais depende do gosto (balanço entre doçura e azedume, ou acidez) e aroma (concentrações de compostos voláteis) (MALUNDO et al., 1995; KADER, 2008). A doçura é determinada pela concentração dos açúcares predominantes e o azedume ou acidez é determinado pela concentração de ácidos orgânicos (KADER, 2008). O teor de sólidos solúveis é um índice de refração que indica a proporção (%) de sólidos dissolvidos em uma solução (BECKLES, 2012). A avaliação dos sólidos solúveis por refratômetro inclui açúcares, ácidos orgânicos, pectinas solúveis, ácido ascórbico, antocianinas e outros compostos fenólicos (KADER, 2008). O teor de sólidos solúveis é diretamente proporcional ao rendimento industrial, sendo que quanto maior o teor de sólidos solúveis (ou °Brix), menor será o gasto de energia no processo de concentração da polpa. Em termos práticos, para cada aumento de um grau Brix na matéria-prima, há um incremento de 20% no rendimento industrial (SILVA et al., 2003).

Por fazer parte de muitas cultivares “grapes” ou “cherry” (Rodríguez et al., 2011), é importante o entendimento do impacto da mutação *ovate* na produtividade e no teor de sólidos solúveis do fruto. Espera-se que mutações que estejam presentes em cultivares que passaram por um amplo processo de melhoramento genético tenham impactos positivos no desempenho agrônomo das mesmas. No entanto, o que foi verificado no genótipo *ovate*, no que se refere à produtividade e teor de sólidos solúveis, não respeita esse raciocínio. Através da observação da Figura 11, pode-se perceber que a mutação *ovate* é responsável pela diminuição da produtividade e do teor de sólidos solúveis, quando comparada ao controle MT. É importante salientar que produtividade e teor de sólidos solúveis são parâmetros de suma importância agrônoma, sendo ambos foco de muitos programas de melhoramento.

Figura 11 - Produtividade média e teor médio de sólidos solúveis (°Brix) apresentados pelos genótipos MT e *ovate*. *** significa $P < 0,001$, de acordo com o teste-t de Student (A) e Wilcoxon (B)

6.4.2 Medição da perda de peso e determinação do tempo de prateleira

A redução da perda de água durante o período de pós-colheita é crítica para a manutenção da qualidade dos vegetais. Após a colheita, o suprimento de água pelas raízes é encerrado e a habilidade para resistir à perda de água é dependente, entre outros fatores, da resistência da superfície ao movimento do vapor de água quando os estômatos estão fechados (SHEWFELT; BRUCKNER, 2000). Em frutos de tomateiro a perda de peso está diretamente relacionada à perda de água, decorrente

da alta taxa de respiração através da cicatriz peduncular (ANDRADE JÚNIOR et al., 2005).

Os genótipos MT e *ovate* foram testados quanto à variação na perda de peso ao longo do tempo. As amostras foram pesadas a cada 3 dias durante 21 dias. Pode-se notar que a dinâmica da perda de peso ao longo do tempo foi semelhante em MT e *ovate* (Figura 12A). No entanto, o mutante apresentou uma menor diminuição em seu peso ao final da avaliação, como pode ser verificado na Figura 12B. A Figura 12C mostra a porcentagem de peso perdida pelos genótipos ao longo do tempo.

O tempo de prateleira é um parâmetro utilizado para se estimar o tempo em que o fruto manterá um bom aspecto visual após sua colheita, estando apto para a comercialização. O tempo de prateleira mantém uma relação inversamente proporcional à perda de água pelo fruto, dimensionada indiretamente pela aferição do seu peso. Pode-se notar que o genótipo que perdeu menos peso (*ovate*) manteve uma maior porcentagem de frutos comercializáveis após 24 dias contados a partir da sua colheita (Figura 12D). Pode-se então, através da análise dos dados de perda de peso (Figura 12A, B e C), e por ultimo, do tempo de prateleira, inferir que ambas as variáveis estão relacionadas, mantendo também relação com o diâmetro da cicatriz peduncular (Figura 5A), que apresenta menores dimensões em *ovate*.

Figura 12 - Diferença entre os genótipos MT e *ovate* em relação à perda de água e comportamento pós-colheita. (A) Redução do peso ao longo de 21 dias. (B) Redução do peso (em %) em relação ao peso inicial após 21 dias. (C) Porcentagem de peso perdida ao longo de 21 dias. (D) Porcentagem de frutos apropriados para consumo 24 dias após a colheita. *** significa $P < 0,001$, de acordo com o teste-t de Student

6.4.3 Partenocarpia, peso médio e taxa de pegamento dos frutos

Por ser responsável pela alteração no formato do fruto, pensou-se que a mutação *ovate* poderia estar relacionada à formação de frutos partenocárpicos. Tal hipótese foi refutada, como pode ser verificado na Figura 13. A observação de uma menor porcentagem de frutos partenocárpicos em relação à MT corrobora as observações realizadas com base no ensaio histoquímico (Figura 10), pois, uma vez em que há menores concentrações de auxina e citocinina em *ovate* durante os estágios iniciais, pode-se inferir que a taxa de partenocarpia seja menor que em MT.

É interessante observar a diferença apresentada por *ovate* em comparação à MT em relação ao peso médio dos frutos (Figura 13A) e taxa de pegamento dos frutos (Figura 13B) entre os controles polinizados. Fica claro que a mutação *ovate*,

além de reduzir o peso médio dos frutos, também é responsável pela diminuição da taxa de pegamento dos mesmos.

Figura 13 - Peso médio (A) e taxa de pegamento dos frutos (B) de MT e *ovate* polinizados e não polinizados. * significa $P < 0,05$, de acordo com o teste-t de Student ou de Wilcoxon

7 CONCLUSÃO

Através da realização de ensaios histoquímicos e medições em ovários e frutos, foi possível concluir que OVATE, um suposto regulador negativo do crescimento vegetal, está envolvido nos estágios iniciais do desenvolvimento floral através da modulação da distribuição e concentração hormonal. Pode-se inferir que a mutação *ovate* altera a dinâmica hormonal no fruto, fazendo com que o mesmo tenha uma menor quantidade (ou sensibilidade) de hormônios no início do seu desenvolvimento. No entanto, não está claro como essas alterações hormonais poderiam contribuir para a promoção do crescimento longitudinal e/ou inibição do crescimento radial, culminando com o fenótipo de fruto alongado. A protuberância verificada na porção estilar do fruto, provavelmente oriunda do acúmulo local de auxina, e a diminuição no número de lóculos podem influenciar no maior teor de matéria seca apresentado pelo genótipo *ovate*. A mutação é também responsável pela diminuição do teor de sólidos solúveis, peso médio dos frutos e sementes, pegamento dos frutos e produtividade. Por ser responsável por alguns efeitos deletérios do ponto de vista do melhoramento genético, é intrigante o fato da mutação estar presente em cultivares altamente expostas ao processo de melhoramento. Talvez o motivo da presença de *ovate* em várias cultivares comerciais, especialmente nas de maior valor econômico, deva-se ao seu maior teor de matéria seca, que pode resultar em uma melhoria organoléptica do fruto, o que faria de *ovate* um “mal necessário” em tais cultivares.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE JÚNIOR, V.C. de; MALUF, W.R.; FARIA, M.V.; BENITES, F.R.G.; SANTOS JÚNIOR, A.M. dos. Produção e qualidade de frutos de tomateiros portadores de alelos mutantes de amadurecimento e coloração. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 6, p. 555–561, jun 2005.
- ATHERTON, J.G.; RUDICH, J. **The tomato crop: a scientific basis for improvement**. London: Chapman and Hall, 1986. 661 p.
- BAI, Y.; LINDHOUT, P. Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? **Annals of Botany**, London, v. 100, n. 5, p. 1085–1094, Nov. 2007.
- BECKLES, D.M. Factors affecting the postharvest soluble solids and sugar content of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 63, n. 1, p. 129–140, Jan. 2012.
- BLEECKER, A.B.; KENDE, H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 16, p. 1–18, Jan. 2000.
- BREWER, M.T.; MOYSEENKO, J.B.; MONFORTE, A.J.; KNAAP, E. van der. Morphological variation in tomato: a comprehensive study of quantitative trait loci controlling fruit shape and development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 6, p. 1339–1349, Jan. 2007.
- BRUKHIN, V.; HERNOULD, M.; GONZALEZ, N.; CHEVALIER, C. Flower development schedule in tomato *Lycopersicon esculentum* cv. sweet cherry. **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v. 15, p. 311–320, 2003.
- CAMPOS, M.L.; CARVALHO, R.F.; BENEDITO, V.A.; PERES, L.E.P. Small and remarkable. **Plant Signaling e Behavior**, Georgetown, v. 5, n. 3, p. 267–270, 2010.
- CAMPOS, M.L.; ALMEIDA, M. de; ROSSI, M. L.; CAMPOS, M.L.; ALMEIDA, M. de; ROSSI, M.L.; MARTINELLI, A.P.; LITHOLDO JUNIOR, C.G.; FIGUEIRA, A.; RAMPELOTTI-FERREIRA, F.T.; VENDRAMIM, J.D.; BENEDITO, V.A.; PERES, L.E.P. Brassinosteroids interact negatively with jasmonates in the formation of anti-herbivory traits in tomato. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 15, p. 4347–4361, Jan. 2009.
- CASTRO, R.D. de; HILHORST, H.W.M. Hormonal control of seed development in GA- and ABA-deficient tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Moneymaker) mutants. **Plant Science**, Limerick, v. 170, n. 3, p. 462–470, Mar. 2006.
- CHENG, Z.L.; WANG, L.; SUN, W.; ZHANG, Y.; ZHOU, C.; SU, Y.H.; LI, W.; SUN, T.T.; ZHAO, X.Y.; LI, X.G.; CHENG, Y.; ZHAO, Y.; XIE, Q.; ZHANG, X.S. Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by auxin response factor3. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 161, n. 1, p. 240–251, Jan. 2013.

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, June 2008.

D'AGOSTINO, I.B.; DERUE, J.; KIEBER, J.J. Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin 1. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 124, p. 1706–1717, Dec. 2000.

DAVIÈRE, J.-M.; ACHARD, P. Gibberellin signaling in plants. **Development**, Washington, v. 140, n. 6, p. 1147–1151, Mar. 2013.

DOBBSS, L.B.; PASQUALOTO, L.C.; LOPES, F.O.; OLIVEIRA, N.A.; PERES, L.E.P.; AZEVEDO, M.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A.; FAÇANHA, A.R. Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 6, p. 3681–3688, Mar. 2010.

DOGANLAR, S.; FRARY, A.; TANKSLEY, S.D. The genetic basis of seed-weight variation: tomato as a model system. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 8, p. 1267–1273, June 2000.

EL-SHOWK, S.; RUONALA, R.; HELARIUTTA, Y. Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. **Development**, Washington, v. 140, n. 7, p. 1373–1383, Apr. 2013.

FERNIE, A.R.; TADMOR, Y.; ZAMIR, D. Natural genetic variation for improving crop quality. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 9, n. 2, p. 196–202, Apr. 2006.

FLEET, C.M.; SUN, T. A DELLAcate balance : the role of gibberellin in plant morphogenesis. **Plant Biology**, Berlin, v. 8, n. 1, p. 77–85, 2008.

GASSER, C.S.; ROBINSON-BEERS, K. Pist il development. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 5, p. 1231–1239, Oct. 1993.

GILLASPY, G.; BEN-DAVID, H.; GRUISSEM, W. Fruits: a developmental perspective. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 5, n. 10, p. 1439–1451, Oct. 1993.

GOETZ, M.; HOOPER, L. C.; JOHNSON, S. D.; RODRIGUES, J. C. M.; VIVIAN-SMITH, A.; KOLTUNOW, A. M. Expression of aberrant forms of auxin response factor8 stimulates parthenocarp in *Arabidopsis* and tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 145, n. 2, p. 351–366, Oct. 2007.

GONZALO, M.J.; KNAAP, E. van der. A comparative analysis into the genetic bases of morphology in tomato varieties exhibiting elongated fruit shape. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 116, n. 5, p. 647–656, Mar. 2008.

GORGUET, B.; EGGINK, P.M.; OCAÑA, J.; TIWARI, A.; SCHIPPER, D.; FINKERS, R.; VISSER, R.G.F.; VAN HEUSDEN, A.W. Mapping and characterization of novel parthenocarp QTLs in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 116, n. 6, p. 755–767, Apr. 2008.

HAUSER, F.; WAADT, R.; SCHROEDER, J.I. Evolution of abscisic acid synthesis and signaling mechanisms. **Current Biology**, London, v. 21, n. 9, p. 346–355, May 2011.

HAY, A.; KAUR, H.; PHILLIPS, A.; HEDDEN, P.; HAKE, S.; TSIANTIS, M. The gibberellin pathway mediates KNOTTED1-type homeobox function in plants with different body plans. **Current Biology**, London, v. 12, n. 2, p. 1557–1565, 2002.

HAZRA, P.; DUTTA, A.K. Inheritance of parthenocarp in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its association with two marker characters. **Plant Science**, Limerick, v. 1, n. 6, p. 144–149, 2010.

HOUGHTALING, H.B. A developmental analysis of size and shape fruits in tomato. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, New York, v. 62, n. 5, p. 243–252, 1935.

JASINSKI, S.; TATTERSALL, A.; PIAZZA, P.; HAY, A.; GARCIA-MARTINEZ, J. F.; SCHMITZ, G.; THERES, K.; MCCORMICK, S.; TSIANTIS, M. PROCERA encodes a DELLA protein that mediates control of dissected leaf form in tomato. **The Plant Journal**, Oxford, v. 56, n. 4, p. 603–612, Nov. 2008.

JEFFERSON, R.A.; KAVANAGH, T.A.; BEVAN, M.W. GUS fusions: B-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**, Oxford, v. 6, n. 13, p. 3901–3907, 1987.

JENKINS, J.A. The origin of the cultivated tomato. **Economic Botany**, New York, v. 1, p. 379–392, 1948.

JONG, M. de; MARIANI, C.; VRIEZEN, W.H. The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 5, p. 1523–1532, Jan. 2009.

JONG, M. de; WOLTERS-ARTS, M.; FERON, R.; MARIANI, C.; VRIEZEN, W.H. The *Solanum lycopersicum* auxin response factor 7 (SlARF7) regulates auxin signaling during tomato fruit set and development. **The Plant Journal**, Oxford, v. 57, n. 1, p. 160–70, Jan. 2009.

JOUBÈS, J.; WALSH, D.; RAYMOND, P.; CHEVALIER, C. Molecular characterization of the expression of distinct classes of cyclins during the early development of tomato fruit. **Planta**, New York, v. 211, n. 3, p. 430–439, Aug. 2000.

JOUBÈS, J.; PHAN, T.-H.; JUST, D.; ROTHAN, C.; BERGOUNIOUX, C.; RAYMOND, P.; CHEVALIER, C. Molecular and biochemical characterization of the involvement of cyclin-dependent kinase a during the early development of tomato fruit. **Plant Physiology**, Oxford, v. 121, n. 3, p. 857–869, Nov. 1999.

KADER, A.A. Flavor quality of fruits and vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 88, p. 1863–1868, 2008.

LI, E.; WANG, S.; LIU, Y.; CHEN, J.-G.; DOUGLAS, C.J. Ovate family protein4 (OFP4) interaction with KNAT7 regulates secondary cell wall formation in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 67, n. 2, p. 328–341, July 2011.

LINDSTROM, E.W. The inheritance of ovate and related shapes of tomato fruits. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 34, n. 10, p. 961–986, 1927.

LIU, J.; ECK, J. van; 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. 2002.

LOKERSE, A.S.; WEIJERS, D. Auxin enters the matrix:-assembly of response machineries for specific outputs. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 12, n. 5, p. 520–526, Oct. 2009.

LOZANO, R.; GIMÉNEZ, E.; CARA, B.; CAPEL, J.; ANGOSTO, T. Genetic analysis of reproductive development in tomato. **The International Journal of Developmental Biology**, Ikenobe, v. 53, n. 8/10, p. 1635–1648, Jan. 2009.

MALUNDO, T.M.M.; SHEWFELT, T.L.; SCOTT, J.W. Flavor quality of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as affected by sugar and acid levels. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 6, p. 103–110, 1995.

MARTÍ, E.; CARRERA, E.; RUIZ-RIVERO, O.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.L. Hormonal regulation of tomato gibberellin 20-oxidase1 expressed in *Arabidopsis*. **Journal of Plant Physiology**, Oxford, v. 167, n. 14, p. 1188–1196, Sept. 2010.

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

MICHALCZUK, L.; COOKE, T.J.; COHEN, J.D. Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. **Phytochemistry**, New York, v. 31, n. 4, p. 1097–1103, 1992.

MILLER, C.O.; SKOOG, F.; SALTZA, M.H. von; STRONG, F.M. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 77, n. 4, p. 1392, 1955.

MUÑOS, S.; RANC, N.; BOTTON, E.; BÉRARD, A.; ROLLAND, S.; DUFFÉ, P.; CARRETERO, Y.; LE PASLIER, M.C.; DELALANDE, C.; BOUZAYEN, M.; BRUNEL, D.; CAUSSE, M. Increase in tomato locule number is controlled by two single-nucleotide polymorphisms located near WUSCHEL. **Plant Physiology**, Oxford, v. 156, n. 4, p. 2244–2254, Aug. 2011.

NEVINS, D.J.; RICHARD, J. **Tomato biotechnology**. New York: Alan R. Liss, 1987. 339 p.

NITSCH, J. Hormonal factors in growth and development. In: HULME, A. C. (Ed.). **The biochemistry of fruits and their products**. New York: Academic Press, 1970. p. 427–472.

NORDSTRÖM, A.; TARKOWSKI, P.; TARKOWSKA, D.; NORBAEK, R.; ASTOT, C.; DOLEZAL, K.; SANDBERG, G. Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 21, p. 8039–8044, May 2004.

PANDOLFINI, T. Seedless fruit production by hormonal regulation of fruit set. **Nutrients**, Basel, v. 1, n. 2, p. 168–177, Nov. 2009.

PARAN, I.; KNAAP, E. van der. Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 14, p. 3841–3852, Jan. 2007.

PASCUAL, L.; BLANCA, J. M.; CAÑIZARES, J.; NUEZ, F. Transcriptomic analysis of tomato carpel development reveals alterations in ethylene and gibberellin synthesis during pat3/pat4 parthenocarpic fruit set. **BMC Plant Biology**, London, v. 9, p. 67, Jan. 2009.

R CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2013. Disponível em: <www.R-project.org/>. Acesso em: 08 fev. 2014.

REINHARDT, D. Microsurgical and laser ablation analysis of interactions between the zones and layers of the tomato shoot apical meristem. **Development**, Cambridge, v. 130, n. 17, p. 4073–4083, Sept. 2003.

RICK, C.M. The tomato. **Scientific American**, New York, v. 239, p. 66–75, 1978.

Genetic resources in *Lycopersicon*. In: NEVINS, D.J.; JONES, R.A. (Ed.). **Tomato biotechnology**. New York: Alan R. Liss, 1986. p. 17–26.

RICK, C. M.; YODER, J.I. Classical and molecular genetics of tomato. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 22, p. 281–300, 1988.

RODRÍGUEZ, G.R.; KIM, H.J.; KNAAP, E. van der. Mapping of two suppressors of OVATE (sov) loci in tomato. **Heredity**, London, v. 111, n. 3, p. 1–9, May 2013.

RODRÍGUEZ, G.R.; MUÑOS, S.; ANDERSON, C.; SIM, S.C.; MICHEL, A.; CAUSSE, M.; GARDENER, B.B.M.; FRANCIS, D.; VAN DER KNAAP, E. Distribution of SUN, OVATE, LC, and FAS in the tomato germplasm and the relationship to fruit shape diversity. **Plant Physiology**, Oxford, v. 156, n. 1, p. 275–285, May 2011.

ROGERS, J.C.; LANAHAN, M.B.; ROGERS, S.W. The cis-acting gibberellin response complex in high-pl α -amylase gene promoters. **Plant Physiology**, Oxford, v. 105, p. 151–158, 1994.

ROTINO, G.L.; PERRI, E.; ZOTTINI, M.; SOMMER, H.; SPENA, A. Genetic engineering of parthenocarpic plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 15, p. 1398-1401, 1997.

RUAN, Y.-L.; PATRICK, J.W.; BOUZAYEN, M.; OSORIO, S.; FERNIE, A.R. Molecular regulation of seed and fruit set. **Trends in Plant Science**, London, v. 17, n. 11, p. 656–665, Nov. 2012.

SAKAKIBARA, H. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 431–449, Jan. 2006.

SANTNER, A.; CALDERON-VILLALOBOS, L.I.A.; ESTELLE, M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 5, n. 5, p. 301–307, May 2009.

SANTNER, A.; ESTELLE, M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. **Nature**, London, v. 459, n. 7250, p. 1071–1078, June 2009.

SHALIT, A.; ROZMAN, A.; GOLDSCHMIDT, A.; ALVAREZ, J. P.; BOWMAN, J. L.; ESHED, Y.; LIFSCHITZ, E. The flowering hormone florigen functions as a general systemic regulator of growth and termination. **Plant Biology**, London, v. 106, n. 20, p. 1–6, May 2009.

SHAN, X.; YAN, J.; XIE, D. Comparison of phytohormone signaling mechanisms. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 15, n. 1, p. 84–91, Feb. 2012.

SHEWFELT, R.L.; BRUCKNER, B. **Fruit and vegetable quality: an integrated view**. Lancaster: CRC Press, 2000. 352 p.

SILVA, J.B.C. da; GIORDANO, L.B.; FURUMOTO, O.; BOITEUX, L. S.; FRANÇA, F. H.; BÔAS, G. L. V.; BRANCO, M. C.; MEDEIROS, M. A.; MAROUELLI, W.; SILVA, W. L. C.; LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C.; NASCIMENTO, W. M.; PEREIRAI, W. Cultivo do tomate para industrialização. **Embrapa Hortaliças - Sistema de Produção**, Brasília, v. 1, n. 3, p. 1–7, 2003.

SMITH, J.W.M.; RITCHIE, D.B. Genetic resources a collection of near-isogenic lines of tomato : research tool of the future? **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 1, n. 1, p. 41–45, 1983.

SRIVASTAVA, A.; HANDA, A.K. Hormonal regulation of tomato fruit development: a molecular perspective. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 24, n. 2, p. 67–82, Sept. 2005.

SUN, T.-P. The molecular mechanism and evolution of the GA-GID1-DELLA signaling module in plants. **Current Biology**, London, v. 21, n. 9, p. R338–345, May 2011.

TANKSLEY, S.D. The genetic, developmental , and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2004.

TEALE, W.D.; PAPONOV, I.A.; PALME, K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 7, n. 11, p. 847–859, Nov. 2006.

ULMASOV, T.; MURFETT, J.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T.J. Creation of a highly active synthetic AuxRE. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 9, p. 1963–1971, Nov. 1997.

VAROQUAUX, F.; BLANVILLAIN, R.; DELSENY, M.; GALLOIS, P. Less is better: new approaches for seedless fruit production. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 18, n. 6, p. 233–242, June 2000.

WANG, H.; JONES, B.; LI, Z.; FRASSE, P.; DELALANDE, C.; REGAD, F.; CHAABOUNI, S.; LATCHÉ, A.; PECH, J.C. BOUZAYENA, M. The tomato aux / IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 17, p. 2676–2692, 2005.

WANG, H.; SCHAUER, N.; USADEL, B.; FRASSE, P.; ZOUINE, M.; HERNOULD, M.; LATCHÉ, A.; PECH, J.C.; FERNIE, A.R.; BOUZAYEN, M. Regulatory features underlying pollination-dependent and -independent tomato fruit set revealed by transcript and primary metabolite profiling. **The Plant cell**, Baltimore, v. 21, n. 5, p. 1428–1452, May 2009.

WANG, S.; CHANG, Y.; GUO, J.; ZENG, Q.; ELLIS, B.E.; CHEN, J.G. Arabidopsis ovate family proteins, a novel transcriptional repressor family, control multiple aspects of plant growth and development. **PloS One**, San Francisco, v. 6, n. 8, p. e23896, Jan. 2011.

WANG, S.; CHANG, Y.; GUO, J.; CHEN, J.-G. *Arabidopsis* ovate family protein 1 is a transcriptional repressor that suppresses cell elongation. **The Plant Journal**, Oxford, v. 50, n. 5, p. 858–872, June 2007.

WANG, X.; LIU, D.; LI, A.; SUN, X.; ZHANG, R.; WU, L.; LIANG, Y.; MAO, L. Transcriptome analysis of tomato flower pedicel tissues reveals abscission zone-specific modulation of key meristem activity genes. **PloS One**, San Francisco, v. 8, n. 2, p. e55238, Jan. 2013.

WEST, M.A.L.; HARADA, J.J. Embryogenesis in higher plants: an overview. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 5, n. 10, p. 1361–1369, Oct. 1993.

WOODWARD, A.W.; BARTEL, B. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 5, p. 707–735, Apr. 2005.

WU, S.; XIAO, H.; CABRERA, A.; MEULIA, T.; KNAAP, E. VAN DER. SUN regulates vegetative and reproductive organ shape by changing cell division patterns. **Plant Physiology**, Oxford, v. 157, p. 1175–1186, Nov. 2011.

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

YAMAGUCHI, S. Gibberellin metabolism and its regulation. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 225–251, Jan. 2008.