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

Análise das vias genéticas reguladas pelo microRNA156 e o gene *SINGLE FLOWER TRUSS* (*SFT*) em resposta a baixa temperatura no controle do florescimento de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)

Raphael Denys Fava

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

Piracicaba
2018

Raphael Denys Fava
Engenheiro Agrônomo

Análise das vias genéticas reguladas pelo microRNA156 e o gene *SINGLE FLOWER TRUSS (SFT)* em resposta a baixa temperatura no controle do florescimento de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)

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

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

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Fava, Raphael Denys

Análise das vias genéticas reguladas pelo microRNA156 e o gene *SINGLE FLOWER TRUSS (SFT)* em resposta a baixa temperatura no controle do florescimento de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) / Raphael Denys Fava. - - Piracicaba, 2018.

60 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Florescimento 2. Baixa temperatura 3. SFT 4. *Solanum lycopersicum*
I. Título

*Aos meus grandes e amados pais, Caetano e Suzette
Pelo exemplo de vida e amor incondicional.*

*Aos meus grandes irmãos, Caetano e Guilherme
Pela união, companheirismo e amizade fraternal.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, meu guia.

Aos meus pais, Caetano Fava e Suzette Aparecida Denys Fava e meus irmãos Caetano Antônio Fava e Guilherme Finistau Fava, por todo apoio nos momentos mais difíceis de vida, dando-me força e caminhando juntos ao meu lado. Também agradecimento especial às cunhadas Taiana Giglio e Marina Nogueira e aos meus sobrinhos João Gabriel e João Miguel, nossa fonte de alegria.

À minha namorada Isabela Guardia, muito obrigado por seu amor, companheirismo e por apoiar minhas decisões profissionais e pessoais, tornando esse período muito mais fácil e bonito. Também à toda sua família pelo apoio e torcida em todos os momentos.

Aos meus tios Nelsia e João, por todo apoio e incentivo aos meus estudos.

Ao Prof. Dr. Fábio Tebaldi Silveira Nogueira, por todos os ensinamentos, orientações e principalmente confiança depositada em mim. Mostrando por seu exemplo a importância do profissionalismo e competência para atingir expressivos resultados na ciência.

Ao professor Dr. Lázaro Perez, seus alunos e à técnica Cássia por contribuírem com os materiais e estruturas necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Dra. Helaine Carrer, pela disponibilidade de uso da casa de vegetação e os equipamentos relacionados as análise de expressão gênica.

Aos meus amigos do Laboratório GMDV: Geraldo Silva, Carlos Barrera, Eder Silva, João Correa, Felipe Hermínio, Letícia Frizzo, Diego Brito e Carolina De Marchi Santiago. Por todo companheirismo, tornando esse período mais fácil e proveitoso. Obrigado Geraldo por toda ajuda e sugestões durante meu mestrado.

Ao meu companheiro de moradia Fabio de Lima pela amizade e companheirismo durante todo o mestrado. Também aos amigos da república Casa Nova, por serem parte da minha família em Piracicaba e proporcionarem grandes momentos de descontração e alegria.

Aos meus amigos Wagner Yanaguizawa, Bruno Takeyoshi e Natália Grigol, pela valiosa ajuda no início do mestrado.

À Solizete, por toda eficiência nesse período.

À ESALQ, por todo apoio e acolhimento no período acadêmico.

À CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro durante a execução deste trabalho.

*“A menos que modifiquemos a nossa maneira
de pensar, não seremos capazes de resolver os
problemas causados pela forma como nos
acostumamos a ver o mundo”,*

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. MICRO-TOM (MT) COMO MODELO DE ESTUDO DO FLORESCIMENTO.....	13
2.2. VIAS GENÉTICAS QUE CONTROLAM O FLORESCIMENTO.....	13
2.3. CONTROLE DO FLORESCIMENTO PELAS VIAS <i>miR156/SPL/SBP (AGE)</i> , <i>FT/SFT</i> E BAIXAS TEMPERATURAS	14
2.3.1. <i>Via genética miR156/SPL/SBP (AGE)</i>	14
2.3.2. <i>Via genética da vernalização</i>	16
2.4. PROTEÍNAS DO GRUPO <i>POLYCOMB (PCG)</i> NA REGULAÇÃO DO FLORESCIMENTO.....	17
2.5. TOMATEIRO (<i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i>) COMO MODELO ALTERNATIVO PARA O ESTUDO DO CONTROLE DO	17
TEMPO DE FLORESCIMENTO	17
2.6. TEMPERATURA INFLUENCIANDO O FLORESCIMENTO.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. MATERIAL VEGETAL	23
3.2. PROTOCOLO DE CURTA EXPOSIÇÃO A BAIXA TEMPERATURA EM TOMATEIRO.....	23
3.3. AVALIAÇÃO DO TEMPO DE FLORESCIMENTO	25
3.3.1. <i>Avaliação da transição do meristema apical para meristema de inflorescência</i>	25
3.3.2. <i>Avaliação do número de folhas no eixo principal</i>	25
3.3.3. <i>Avaliação do número de dias até antese</i>	26
3.4. EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE RNA TOTAL	26
3.5. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR EM TEMPO REAL (RT-QPCR).....	26
3.6. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA EM ÁPICE VEGETATIVO E COTILÉDONE DE PLÂNTULAS DE TOMATEIRO MT	27
.....	27
3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DO TEMPO DE FLORESCIMENTO A BAIXA TEMPERATURA POR MEIO DA	29
CONTAGEM DO NÚMERO DE FOLHAS NO EIXO PRINCIPAL ATÉ A PRIMEIRA INFLORESCÊNCIA	29
4.2. MATURAÇÃO DO MERISTEMA APICAL EM TOMATEIRO EM RESPOSTA A CURTA EXPOSIÇÃO A BAIXA	33
TEMPERATURA (16°C).....	33
4.3. TEMPO DE FLORESCIMENTO EM NÚMERO DE DIAS ATÉ A ANTESE EM TOMATEIRO CV. MICRO-TOM.....	36
4.4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-QPCR EM ÁPICE DE TOMATEIRO CV.MT DOS GENES <i>CBF1</i> ,	39
<i>miR156</i> E <i>SlySBP15</i>	39
4.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS GENES <i>CBF1</i> , <i>miR156</i> , <i>SlySBP15</i> E <i>SFT</i> POR RT-QPCR EM	42
COTILÉDONES DE TOMATEIRO MT	42
4.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES <i>SLEZ1</i> , <i>SLEZ2</i> , <i>SLEZ3</i> E <i>SLMSL1</i> POR RT-QPCR EM COTILÉDONES DE	45
TOMATEIRO CV. MT.....	45
5. CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS.....	51
APÊNDICES	59

RESUMO

Análise das vias genéticas reguladas pelo microRNA156 e o gene *SINGLE FLOWER TRUSS* (*SFT*) em resposta a baixa temperatura no controle do florescimento de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)

O florescimento é um processo essencial no desenvolvimento vegetal. A mudança de fase vegetativa para reprodutiva em plantas reprograma várias vias genéticas e metabólicas fundamentais para a complementação de seu ciclo de vida. Em *Arabidopsis thaliana*, modelo mais estudado para o desenvolvimento floral, cinco rotas genéticas são descritas para o controle do florescimento, apresentando redundância de regulação entre essas vias. Dentre essas, a via AGE, regulada pela idade da planta, tem como seu principal efector o microRNA156 (miR156) e os seus alvos diretos, os fatores de transcrição do tipo *SBP/SPL* (*SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-like*). Em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), planta considerada insensível ou pouco responsiva a duas das cinco vias do florescimento (fotoperíodo e vernalização), a via AGE também controla a transição de fase vegetativa para reprodutiva. Plantas de tomateiro superexpressando o miR156 atrasam a transição de fase vegetativa para reprodutiva. Ao contrário, plantas superexpressando o florígeno *SINGLE FLOWER TRUSS* (*SFT*) aceleram a mudança de fase vegetativa para reprodutiva. Após curta exposição a baixa temperatura (16°C) o tomateiro também altera o tempo de florescimento, atrasando a transição de fase e prolongando o número de dias até a antese, tanto no cultivar determinado Micro-Tom (MT), quanto no cultivar indeterminado Ailsa Craig. Interessantemente, houve redução de número de folhas nesses cultivares quando expostos a curto período de baixa temperatura (16°C). Entretanto, a diminuição do número de folhas, que está relacionada ao plastochron, pode ter assumido funções específicas em tomateiro que não estão diretamente correlacionadas com o controle do tempo de florescimento em resposta a baixas temperaturas. A baixa oferta do florígeno *SFT*, em resposta a baixa temperatura, foi necessária para o atraso no tempo de florescimento das plantas, associando sua expressão a via AGE, com regulação da expressão do miR156 e do seu alvo *SISBP15*, alterando o acúmulo de seus transcritos no ápice e cotilédones. Em *arabidopsis*, a redução da expressão de genes *SPLs* em plantas superexpressando o miR156 resulta em extremo atraso no florescimento e concomitante aumento da produção de folhas em resposta a baixas temperaturas. Em tomateiro, a repressão dos genes *SBPs/SPLs* em plantas miR156OE também promove atraso no florescimento, mas não afeta a produção de folhas em resposta a baixa temperatura, o que também é observado com o aumento de *SFT* e plantas *p35S::SFT*. Além disso, a regulação transcricional, pós-transcricional e possivelmente epigenética de alguns genes da via miR156/SPL/SBP, sugere uma complexa inter-relação entre essa via e a temperatura ambiental em tomateiro.

Palavras-chave: Florescimento; Baixa temperatura; *SFT*; *Solanum lycopersicum*

ABSTRACT

Analysis of the genetic pathways regulated by microRNA156 and the *SINGLE FLOWER TRUSS* gene (*SFT*) in response to low temperature in control of tomato flowering (*Solanum lycopersicum* L.)

Flowering is an essential process in plant development. The change from vegetative to reproductive phase in plants reprograms several genetic and metabolic pathways fundamental to the complementation of their life cycle. In *Arabidopsis thaliana*, the most studied model for floral development, there are five genetic routes described for the control of flowering, which present regulatory redundancy between them. Among these, the AGE pathway, regulated by plant age, has microRNA156 (miR156) as its main effector and the transcription factors *SBP/SPL* (*SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-like*) as its direct targets. In tomato (*Solanum lycopersicum* L.), plant considered insensitive or not responsive to two of the five flowering pathways (photoperiod and vernalization), the AGE pathway also controls vegetative to reproductive phase transition. Tomato plants overexpressing the miR156 delay the transition from vegetative to reproductive phase. In contrast, plants overexpressing the flowering *SINGLE FLOWER TRUSS* (*SFT*) accelerate the vegetative to reproductive phase shift. After short exposure to low temperature (16°C) the tomato also altered the flowering time, delaying the phase transition and extending the number of days until the anthesis, both in the determined Micro-Tom (MT) cultivar and in the indeterminate cultivar Ailsa Craig. Interestingly, there was a reduction in the number of leaves in these cultivars when exposed to a short period of low temperature (16°C). However, the decrease in number of leaves, related to plastochron, may have assumed specific functions in tomatoes that are not directly correlated with the control of flowering time in response to low temperatures. The low supply of the *SFT* florigen, in response to low temperature, was necessary for the delay in the flowering time of the plants, associating its expression to the AGE path, with regulation of the expression of miR156 and its target *SISBP15*, changing the accumulation of its transcripts at the apex and cotyledons. In *arabidopsis*, the reduction of *SPL* gene expression in plants overexpressing miR156 results in extreme flowering delay and concomitant increase of leaf production in response to low temperatures. In tomato, repression of *SBPs* / *SPL* genes in miR156EE plants also promotes delay in flowering, but does not affect leaf production in response to low temperature, which is also observed with increasing *SFT* and *p35S::SFT* plants. In addition, the transcriptional, post-transcriptional and possibly epigenetic regulation of some genes in the miR156 / *SPL* / *SBP* pathway suggests a complex interrelationship between this pathway and the environmental temperature in tomato.

Keywords: Flowering; Low temperature; *SFT*; *Solanum lycopersicum*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. MODELO DE REGULAÇÃO DO FLORESCIMENTO EM ARABIDOPSIS PELA VIA AGE EM RESPOSTA A BAIXA TEMPERATURA (16°C).....	19
FIGURA 2. COMPARAÇÃO ENTRE PERÍODOS DE DESENVOLVIMENTO DO TOMATEIRO	25
FIGURA 3. AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE FOLHAS ATÉ A PRIMEIRA INFLORESCÊNCIA DOS GENÓTIPOS DE TOMATEIRO MT E AILSA CRAIG.....	31
FIGURA 4. AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE FOLHAS ATÉ A PRIMEIRA INFLORESCÊNCIA DOS GENÓTIPOS DE TOMATEIRO <i>P35S::SFT</i> E <i>MIR156OE</i>	33
FIGURA 5. PADRÃO DE DESENVOLVIMENTO MERISTEMÁTICO DE PLÂNTULAS MT E <i>MIR156OE</i>	34
FIGURA 6. AVALIAÇÃO DO TEMPO DE FLORESCIMENTO EM NÚMERO DE DIAS ATÉ A ANTESE DOS GENÓTIPOS MT, ALISA CRAIG, <i>MIR156OE</i> , <i>P35S::SFT</i> E <i>SFT</i>	37
FIGURA 7. ÁRVORE FILOGENÉTICA COMPARANDO AS SEQUÊNCIAS IDENTIFICADAS EM <i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i> COM <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	39
FIGURA 8. ANÁLISE DE EXPRESSÃO RELATIVA POR RT-QPCR NO GENÓTIPO MT DOS GENES <i>CBF1</i> , <i>MIR156</i> MADURO E <i>SLYSBP15</i> , COMPARANDO ÁPICES REPRODUTIVOS NOS TRATAMENTOS DE 23°C E 16°C.....	41
FIGURA 9. ANÁLISE DE EXPRESSÃO RELATIVA POR RT- QPCR NO GENÓTIPO MT DOS GENES <i>CBF1</i> , <i>MIR156</i> MADURO E <i>SLYSBP15</i> , COMPARANDO COTILÉDONES DE PLANTAS EXPOSTAS A TEMPERATURA DE 23°C E 16°C..	43
FIGURA 10. ANÁLISE DE EXPRESSÃO RELATIVA POR RT-QPCR DOS GENES <i>SLEZ3</i> , <i>SLMSL1</i> , <i>SLEZ2</i> E <i>SLEZ1</i> NO GENÓTIPO MT, COMPARANDO COTILÉDONES NOS TRATAMENTOS DE 23°C E 16°C..	47

1. INTRODUÇÃO

O florescimento é marcado por alterações críticas no desenvolvimento das plantas, envolvendo modificações no padrão de morfogênese e diferenciação celular. A transição de fase adulto vegetativa para adulta reprodutiva desencadeia mudanças substanciais, reprogramando vias genéticas envolvidas praticamente em todo o ciclo de vida da planta. Em *Arabidopsis thaliana* foram descritas cinco rotas genéticas envolvidas no controle do florescimento (WANG; CZECH; WEIGEL, 2009). Essas vias regulam genes que compõem respostas para diferentes estímulos sendo responsáveis pela alteração da identidade do meristema vegetativo para meristemas de inflorescência e floral (LOHMANN; WEIGEL, 2002).

A mudança de identidade do ápice vegetativo foi descrita por KNOTT (1934) como sendo o recebimento de diferentes estímulos ambientais nos tecidos foliares, os quais são convertidos em sinal denominado “florigeno” que é translocado, via fluxo em massa no floema, até o meristema apical, induzindo a mudança de identidade do meristema vegetativo para meristema de inflorescência e, posteriormente, promovendo a formação de meristemas florais. Foi demonstrando posteriormente por CORBESIER et al. (2007) que o gene responsável pelo sinal denominado “florigeno” é um fator de transcrição pertencente à família *CENTRORADIALIS/TERMINAL FLOWER 1/SELF-PRUNING (CELT5)*, denominado *FLOWERING LOCUS T (FT)* em *arabidopsis*.

Em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), o gene *SINGLE FLOWER TRUSS (SFT)* codifica uma proteína ortóloga a *FT* de *arabidopsis*, que é responsável pelo controle do florescimento em tomateiro (MOLINERO-ROSALES et al., 2004; LIFSCHITZ et al. 2006). Plantas transgênicas superexpressando o gene *SFT* aceleraram o florescimento em tomateiro; já no mutante *sft*, o período de florescimento é atrasado (LIFSCHITZ et al. 2006). Notavelmente, o gene *SFT* aparece também como um importante integrador das vias genéticas para o florescimento. Em *arabidopsis*, por exemplo, a superexpressão do gene *SFT* substituiu o estímulo de dia longo (fotoperíodo) e promoveu o florescimento nesta espécie (LIFSCHITZ et al. 2006).

Independentemente do modelo de indução do florescimento ter sido descrito para plantas sensíveis ao fotoperíodo, tal como *arabidopsis*, há uma variedade de estímulos conhecidos que podem ser reconhecidos por diferentes espécies (LIFSCHITZ et al., 2006). Por exemplo, na ausência de indução do florescimento pelo fotoperíodo ou vernalização, outras

vias como a via *AGE* (via controlada pela idade) e de respostas a baixas temperaturas (acima de 10°C) assumem funções cruciais na regulação do florescimento (WANG et al., 2009; CAPOVILLA et al., 2015).

Logo, a partir do descrito podemos sugerir que as respostas dos estímulos ambientais à baixa temperatura ocorrem através da via AGE, regulada pelo miR156/*SPL/SBP* e *SFT*, os quais desempenham funções chaves na regulação do tempo de florescimento de tomateiro. Poucos trabalhos avançaram no entendimento do papel da baixa temperatura no florescimento de *S. lycopersicum*, restringindo-se ao comportamento fisiológico da planta (CALVERT, 1957; NOTO; LA MALFA, 1985). Entretanto, a resposta das vias genéticas regulatórias, bem como suas funções específicas e interações, ainda são pouco conhecidas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Micro-Tom (MT) como modelo de estudo do florescimento

A cultivar miniatura de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) micro-Tom (MT) é um modelo amplamente utilizado no estudo genético para o desenvolvimento de plantas (MEISSNER et al., 1997), por assemelhar-se a características do modelo genético *arabidopsis*, possuindo curto ciclo de vida (70-90 dias) e porte reduzido (15-20 cm), e sendo adequado para produção de plantas transgênicas (WANG et al., 2005; SILVA et al., 2014; MARTÍNEZ-BELLO; MORITZ; LÓPEZ-DÍAZ, 2015; ALMEIDA et al., 2015; SILVA et al., 2017; SILVA et al., 2018).

Diferentemente do hábito de crescimento monopodial de *Arabidopsis thaliana*, o tomateiro possui hábito de crescimento simpodial. Mais especificamente, o tomateiro cv. MT possui hábito de crescimento determinado, característica que se deve a presença do alelo *sp* para o gene *SELF-PRUNING* (MARTÍ et al., 2006). Essa particularidade promove regulação diferenciada no desenvolvimento da planta, uma vez ocorrendo a transição o meristema simpodial não terá capacidade de reiterar o crescimento vegetativo, diferentemente de cultivares de crescimento indeterminado, em que o meristema simpodial retoma o crescimento vegetativo, como no caso do cultivar Ailsa craig. Também o cultivar MT apresenta grande número de mutantes relacionados ao desenvolvimento, já introgrididos neste *background* genético, promovendo a crescente utilização desse cultivar para fins de estudos funcionais. (WANG et al., 2005; SUN et al., 2006; SILVA et al., 2014; MARTÍNEZ-BELLO; MORITZ; LÓPEZ-DÍAZ, 2015; LIU et al., 2016; SILVA et al., 2018).

2.2. Vias genéticas que controlam o florescimento

A regulação do florescimento em *arabidopsis* é feita principalmente por cinco vias sendo elas: a via de vernalização, a qual promove o florescimento em plantas expostas a longos períodos a baixas temperaturas na faixa de 2°C a 4°C (MICHAELS; AMASINO, 1999); a via do fotoperíodo, a qual controla o período de florescimento de acordo com diferentes regimes de exposição das plantas a presença ou ausência de luminosidade (CORBESIER; COUPLAND, 2005); a via controlada pelo fitormônio giberilina (GA), a qual na ausência de

estímulos provenientes do fotoperíodo, desempenha papel essencial para indução do florescimento (WILSON; HECKMAN; SOMERVILLE, 1992); a via autônoma, a qual atua independente da giberilina e do fotoperíodo, agindo na regulação endógena de genes repressores da indução floral (KIM et al., 2009; MICHAELS, 2009); e a via da idade (*AGE*), que utiliza a idade da planta como mecanismo regulador de processos temporais, incluindo a transição de fase vegetativa para reprodutiva (WANG; CZECH; WEIGEL, 2009).

Em *arabidopsis*, várias vias genéticas responsáveis pelo florescimento apresentam funções regulatórias redundantes, podendo essa espécie tolerar a deficiência de determinada via e completar o seu ciclo de vida. Contudo, a geração do triplo mutante de *arabidopsis co-2;fca-1;ga1-3* (afetando, respectivamente, as vias de fotoperíodo, autônoma e do fitormônio giberelina) promove a inibição completa do florescimento (REEVES et al., 2001), indicando que as vias comprometidas pelas mutações são fundamentais para o florescimento. Notavelmente, REEVES et al., (2001) demonstraram que o fenótipo vegetativo do triplo mutante pode ser revertido pela vernalização, promovendo o florescimento mesmo na ausência de três importantes vias. Esses resultados demonstram que temperaturas extremamente baixas (2^o-4^oC) podem controlar o florescimento de *arabidopsis* de forma independente das vias genéticas supracitadas.

As vias genéticas citadas anteriormente confluem em conjunto para a indução de alguns genes-chave responsáveis pela indução do florescimento em *A. thaliana*, como *APETALA1 (AP1)*, o qual foi descrito como fator de transcrição do tipo MADS-BOX (GUSTAFSON-BROWN; SAVIDGE; YANOFSKY, 1994), e *LEAFY (LFY)*, que é um fator de transcrição específico de plantas (WEIGEL et al., 1992) e o gene *FLOWERING LOCUS T* ou *FT* (MOLINERO-ROSALES et al., 2004), o qual funciona como um gatilho para a transição de meristema vegetativo para reprodutivo.

2.3. Controle do florescimento pelas vias *miR156/SPL/SBP (AGE)*, *FT/SFT* e baixas temperaturas

2.3.1. Via genética *miR156/SPL/SBP (AGE)*

A via *AGE* está associada ao desenvolvimento temporal da planta, sendo suas funções reguladas por microRNAs (miRNAs), especialmente o microRNA156 (*miR156*) e seus

alvos diretos, os fatores de transcrição (FT) do tipo *SBP/SPL* (*SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-like*) (RHOADES et al., 2002). Os miRNAs são pequenos RNAs envolvidos na regulação da expressão gênica em vias de desenvolvimento vegetal (BAULCOMBE, 2004; MALLORY E VAUCHERET, 2006). Esses pequenos RNAs não codificantes de 20-22 nucleotídeos regulam a expressão de genes-alvos ligando-se a um sítio complementar nos mRNAs alvo. Essa associação induz a desestabilização e/ou clivagem ou mesmo bloqueio da tradução do mRNA por associação do complexo miRNA/mRNA a proteínas do tipo ARGONAUTAS (AGOs) (IWAKAWA et al., 2013).

Em *arabidopsis* foram identificados seis miRNAs que regulam o tempo de florescimento (miR156, miR163, miR169, miR172, miR398 e miR399), (LEE et al., 2010). Destes, duas famílias, miR156 e miR172, apresentam grande importância para a regulação da transição das fases juvenil-adulta e adulta vegetativa para adulta reprodutiva (HUIJSER; SCHMID, 2011). A expressão desses miRNAs é oposta: enquanto o miR156 é altamente expresso em plantas jovens, seu decréscimo ocorre com o envelhecimento da planta. Já o miR172 possui expressão reduzida em plantas jovens, ocorrendo aumento de sua expressão com o envelhecimento da planta (HUIJSER; SCHMID, 2011).

O miR156 interage com genes-alvo controlando a fase do desenvolvimento vegetativo-reprodutivo em *Arabidopsis thaliana* (WU et al., 2009). Seus alvos *SPL/SBP* são FTs específicos de plantas (KLEIN; SAEDLAR; HUIJSER, 1996; CARDON et al., 1999). No caso de *Arabidopsis thaliana*, dez dos 16 membros dessa família de FTs apresentam regulação pelo miR156 (SCHWAB et al., 2005; SALINAS et al., 2012). Os genes *SPL/SBP* são classificados em dois grupos, baseado no tamanho da proteína produzida e na posição do sítio de regulação para o miR156 (RHOADES et al., 2002; SALINAS et al., 2012). Em *arabidopsis*, os genes *SPL/SBP* pequenos, como o gene *SPL/SBP3*, apresentam o sítio de reconhecimento para o miR156 na região 3'-UTR (não traduzida). Já os genes *SPL/SBP* maiores, como o gene *SPL/SBP15*, apresentam sítio de reconhecimento para o miR156 na região codante (RHOADES et al., 2002). O tamanho das proteínas e posição do sítio regulado pelo miR156 nesses genes é conservado em várias espécies, incluindo o tomateiro (SALINAS et al., 2012; MOREA et al., 2016; SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2018).

A relação entre o miR156 e os genes *SPLs/SBPs* é antagônica: uma vez que há diminuição do acúmulo do microRNA, há um aumento da expressão dos *SPLs/SBPs*, promovendo a ativação de genes de indução floral como *LEAFY*, *APETALA1* e *MIR172* e

induzindo a transição de fase vegetativa adulta para adulta reprodutiva (YAMAGUCHI et al., 2009). Os ortólogos dos genes *LFY* e *AP1* em tomateiro são os genes *FALSIFLORA (FA)* (MOLINERO-ROSALES et al., 1999) e *MACROCALYX (MC)* (VREBALOV et al., 2002), respectivamente, os quais também estão associados com o desenvolvimento reprodutivo (YUSTE-LISBONA et al., 2016; SILVA et al., 2018). Consistentemente, plantas que superexpressam o miR156 em arabidopsis e tomateiro apresentam maior produção de ramos laterais em decorrência de uma intensa redução da dominância apical, além de atraso na transição da fase adulta vegetativa para reprodutiva (SCHWAB et al., 2005; SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2018). Do mesmo modo, plantas de arabidopsis expressando versões resistentes ao miR156 de seus genes alvos (por exemplo, expressão dos genes *SPL/SBP3* e *SPL/SBP15* contendo mutações silenciosas no sítio de ligação do miR156) apresentam menor número de folhas e transição vegetativa-reprodutiva acelerada (XU et al., 2016).

2.3.2. Via genética da vernalização

Além da idade, a temperatura é um fator abiótico crucial para a transição floral em algumas espécies. Neste contexto, plantas de clima temperado, como no caso de *Arabidopsis thaliana*, possuem a via da vernalização que induz o florescimento (MICHAELS; AMASINO, 1999) após exposição a longos períodos de baixas temperaturas na faixa de (2^o-4^oC) (SUNG; AMAZINO, 2004), como ocorre no período de inverno intenso em várias localidades do globo terrestre.

A exposição ao frio pode ocorrer semanas ou meses antes do florescimento, pois a memorização dos sinais de vernalização por longos períodos é controlado epigeneticamente, promovendo a inibição da resposta ao florescimento (SHELDON et al., 2008). A exposição prolongada a baixas temperaturas regula a expressão de genes efetores do florescimento, permitindo que o gene *FT* seja expresso e induza o florescimento em condições favoráveis a manutenção e preservação da espécie (SHELDON et al., 2008).

Diferentemente de arabidopsis, o tomateiro, planta também utilizada como modelo para pesquisas em vários aspectos do desenvolvimento, inclusive o florescimento (LIFSCHITZ et al., 2006), é considerada insensível ou pouco responsiva às duas vias das cinco citadas (fotoperíodo e vernalização) (LOZANO et al., 2009)..

2.4. Proteínas do grupo *Polycomb* (*PcG*) na regulação do florescimento

As proteínas do grupo *Polycomb* (*PcG*) são supressores da expressão gênica e são evolutivamente conservadas em espécies de plantas e animais, desempenhando papel crucial na regulação das modulações epigenéticas, isto é, metilação do DNA e metilação de histonas (SCHUETTENGROBER et al., 2007; MARGUERON; REINBERG, 2011; SHARIF et al., 2013). Em *Arabidopsis*, a mudança de fase vegetativa nas plantas é regulada por uma diminuição no nível de miR156, e a regulação negativa deste microRNA durante a mudança de fase vegetativa está associada a um aumento do nível de metilação de que (DNA ou histona? Tem que colocar aqui!) (XU et al., 2015), que é um produto da atividade do *Polycomb Repressive Complex 2* (*PRC2*) (SIMON; KINGSTON, 2013).

Os genes *SWINGER* e *CURLY LEAF* (*CLF*) (GOODRICH et al. 1997; LUO et al. 1999; CHANVIVATTANA et al. 2004) pertencem ao complexo *PCR2*. Juntamente com outro gene *PcG*, o *MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA 1* (*MSI1*), os genes *SWINGER* e *CLF* apresentam papel importante epigeneticamente no florescimento de *Arabidopsis thaliana*, promovendo a regulação do florescimento em resposta a baixa temperatura. (CHANVIVATTANA et al., 2004; WOOD et al., 2006; DE LUCIA et al., 2008). Os genes homólogos para tomateiro do *SWINGER* e *CURLY LEAF* (*CLF*), são os genes *SIEZ1*, *SIEZ2*, respectivamente, e o gene *SIEZ3* (BOUREAU et al., 20016). O homólogo do *MSI1* em tomateiro é o gene *S/MSI1* (DAN-DAN et al., 2016).

Em tomateiro os genes *SLEZs* apresentam-se expressos em diversos tecidos como folhas, flores, ápices caulinares e frutos. O silenciamento do gene *SIEZ2* (que em *Arabidopsis* controla o desenvolvimento vegetativo-reprodutivo), altera o desenvolvimento do fruto de tomate (BOUREAU et al., 20016). Ademais, o silenciamento do gene *S/MSI1* alterou o tempo de desenvolvimento e maturação de frutos de tomateiro, relacionando a maior expressão desse gene a manutenção da maturação do fruto (DAN-DAN et al., 2016).

2.5. Tomateiro (*Solanum lycopersicum*) como modelo alternativo para o estudo do controle do tempo de florescimento

Apesar de *Arabidopsis thaliana* ser consagrada como modelo genético, estudos gerados nesta espécie não podem ser aplicados de forma generalizada em todas as espécies vegetais. Por possuir crescimento monopodial, *Arabidopsis* mantém a atividade do

meristema apical durante todo o ciclo de vida da planta (SCHMITZ; THERES, 1999). Já no tomateiro, o crescimento é do tipo simpodial, com fases reprodutivas e vegetativas alternando regularmente ao longo do desenvolvimento do meristema apical (PNUELI et al., 1998). Além disso, as plantas de tomateiro possuem frutos carnosos e climatérios e também são plantas consideradas perenes ou semi-perenes, enquanto que *arabidopsis* é considerada uma espécie anual.

O tomateiro atualmente é utilizado com um modelo alternativo para o estudo de mecanismos fisiológicos e moleculares envolvidos na transição floral e desenvolvimento de flores e frutos (LOZANO et al., 2009; SILVA et al., 2018). Análises funcionais de genes reguladores como *LATERAL SUPPRESSOR (LS)*, *SELF PRUNING (SP)*, *SINGLE FLOWER TRUSS (SFT)* e *FALSIFLORA (FA)*, revelam mecanismos envolvidos no desenvolvimento da parte aérea e florescimento, que são conservados em *arabidopsis*. Além disso, fatores de transcrição são responsáveis por características singulares no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo do tomate (LOZANO et al., 2009). Mais recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o efeito do fitohormônio giberelina no controle do tempo de florescimento em tomateiro é sinérgico ao efeito do miR156, sendo, portanto, o oposto ao efeito observado no controle do florescimento de *arabidopsis* (YU et al., 2012; SILVA et al., 2018).

Notavelmente, no duplo mutante *sft fa* ocorre um grande prolongamento do estágio vegetativo, com produção de mais de 100 folhas no eixo principal, caracterizando completo bloqueio da transição do meristema (MOLINERO-ROSALES et al., 2004). O gene *SFT* aparece também como indutor do florescimento em tabaco (*Nicotiana tabacum*) espécie da família solanácea, sensível ao fotoperíodo. (LIFSCHITZ et al., 2006). Apesar do tomateiro se apresentar insensível ou pouco responsivo a via da vernalização e fotoperíodo (LOZANO et al., 2009), quando os cotilédones completamente expandidos são expostos a baixa temperatura ocorre diminuição da produção do número de folhas no eixo principal, aparentemente promovendo uma resposta da planta a regulação do tempo de florescimento (CALVERT, 1957; NOTO; LA MALFA, 1985).

2.6. Temperatura ambiental influenciando o florescimento

Adicionalmente à regulação do florescimento mediada pelo miR156/*SPLs/SBPs* na via *AGE*, microRNAs também fazem parte da regulação do tempo de florescimento em

resposta à temperatura ambiental. A via da vernalização e as vias da temperatura ambiental são dependentes da temperatura para o controle do florescimento. Considerando que as respostas fisiológicas e moleculares a vernalização requerem longos períodos de exposição a baixas temperaturas, geralmente abaixo de 10°C, as vias responsivas a temperatura ambiental modulam a resposta ao florescimento após curta exposição a baixas temperaturas, geralmente entre 12°C à 27°C (KUMAR; WIGGER, 2010; WIGGE et al., 2013). Em *Arabidopsis thaliana*, temperaturas ambientais na faixa de 16°C atrasam a mudança de fase juvenil-adulta e consequentemente seu florescimento, em comparação com plantas crescidas a 23°C. Isso ocorre principalmente pela indução do acúmulo do miR156 nessa faixa de temperatura (KIM et al., 2016). Um dos alvos do miR156, o gene *SPL/SBP3*, tem sua expressão reprimida em condições de baixas temperaturas, o que também promove uma redução da expressão do florigeno *FT*, levando ao atraso no florescimento (KIM et al., 2012) (Figura 1).

Figura 1. Modelo de regulação do florescimento em arábida pela via *AGE* em resposta a baixa temperatura (16°C) (KIM et al., 2012, figura adaptada). Observa-se no modelo que quanto maior o tamanho da letra referente ao nome do gene, maior sua expressão.

Por outro lado, em tomateiro, planta considerada insensível ou pouco responsiva a duas vias das cinco citadas para o florescimento (fotoperíodo e vernalização), as exposições a baixas temperaturas (12°-16°C) diminuem o número de folhas no eixo principal da planta (VALLEJOS et al., 1983). A regulação do florescimento pela temperatura em tomateiro foi

primeiramente descrita na década de 1950 por CALVERT (1957), quem realizou experimento com o cultivar indeterminado Ailsa Craig, expondo as plantas nove dias após a expansão do cotilédone ao tratamento de baixas temperaturas (10° - 15°). Em tomateiro, a transição da fase vegetativa para reprodutiva é avaliada a partir no número de folhas produzido no eixo principal até o aparecimento da primeira inflorescência visível (MOLINERO-ROSALES et al., 1999; THOUET et al., 2012). No cultivar de tomateiro Micro-Tom, por exemplo, as plantas produzem em média cinco folhas no eixo principal até o surgimento da primeira inflorescência visível (VICENTE et al., 2015; SILVA et al., 2018).

CALVERT (1957) observou redução de 14 para 8 folhas submetidas ao tratamento de curto período a baixas temperaturas, sugerindo uma aceleração na transição adulta vegetativa para reprodutiva. Posteriormente, na década de 80, NOTO (1985) avaliou três variedades de tomateiros em três temperaturas noturnas diferentes, 7°C , 14°C e 21°C . De forma geral, as plantas produziram menor número de folhas no eixo principal, sendo que quanto menor a temperatura mais pronunciada foi a redução no número de folhas no eixo principal, novamente sugerindo uma aceleração na transição adulta vegetativa para reprodutiva. Entretanto, em nenhum dos trabalhos descritos até o momento para tomateiro, a transição do meristema vegetativo para meristema de inflorescência foi avaliada em resposta a exposição a baixa temperatura. Este parâmetro é crucial para determinar com precisão o período de transição de fase vegetativa para reprodutiva (PARK et al., 2012).

A temperatura ambiental pode afetar o período de transição da fase adulta vegetativa para adulta reprodutiva em muitas espécies (BERNIER; PÉRILLEUX, 2005). Por exemplo, curta exposição à temperatura ambiental promove o florescimento em *Phalaenopsis* (WANG et al., 1995) e *Pharbitis* (TAKENO et al., 2016), inibindo em *Chrysanthemum* (KUNITAKE et al., 2009) e *Arabidopsis thaliana* (KIM et al., 2012). Embora o tomateiro floresça de forma autônoma, estudos sugerem que fatores ambientais estejam envolvidos na modificação do padrão de florescimento (SAMACH; LOTAN, 2007). Baixas temperaturas (10° - 15°C) influenciam o desenvolvimento de tomateiro, reduzindo a taxa de produção de folhas no eixo principal (LOZANO et al., 2009).

Mesmo que as taxas de produção de folhas possam variar para diferentes cultivares de tomateiro, a resposta à baixa temperatura será similar (VAN PLOEG; HEUVELINK, 2005; LOZANO et al., 2009). Também a baixa temperatura afeta outros aspectos do

desenvolvimento do tomateiro, como por exemplo a produção de biomassa (VAN PLOEG; HEUVELINK, 2005). Contudo, a análise do tempo de florescimento em tomateiro pode ser melhor compreendida considerando o momento em que a primeira inflorescência atinge a antese como sendo a somatória entre a taxa de produção de folhas e o número de folhas formadas antes da primeira inflorescência no eixo principal (SAMACH; LOTAN, 2007).

Dado que o número de folhas no eixo principal foi reduzido em plantas de tomateiro expostas a curto período de baixa temperatura, nossa hipótese inicial foi de que exposição curta a baixas temperaturas poderia acelerar o florescimento em tomateiro, diferentemente de *arabidopsis*, na qual a exposição a baixa temperatura ambiental promove aumento do número de folhas no eixo principal pela interação com o módulo *miR156/SPL/FT*. O tomateiro a baixa temperatura (16°C), promoveria resposta inversa do mecanismo regulador que controla o tempo de florescimento.

Portanto o objetivo principal desse trabalho foi estudar o papel das vias *miR156/SPL/SBP* e *SFT* no controle do florescimento em tomateiro em resposta a baixas temperaturas. É importante salientar que, até o momento, pouco se é conhecido sobre as vias genéticas e epigenéticas que controlam o florescimento em resposta a exposição a baixas temperaturas em tomateiro. Assim, o estudo dos mecanismos moleculares, além de produzirem um modelo alternativo a *arabidopsis*, pode ser expandido e gerar avanços para essa espécie com interesse econômico, a qual os conhecimentos para essa área restringem-se a estudos realizados em décadas anteriores.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

A maioria dos experimentos foram conduzidos utilizando-se o tomateiro cv. Micro-Tom (MT), cultivar modelo para estudo de *Solanum lycopersicum* que apresenta pequeno porte, curto ciclo de vida e transformação genética realizável (MEISSNER et al., 1997). Plantas MT superexpressando o miR156 (miR156OE) e superexpressando o gene *SFT* (*p35S::SFT*) já foram descritas (SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2018). Também foi utilizado em experimentos específicos o cultivar de tomateiro indeterminado Ailsa Craig, o qual apresentou alteração no tempo de florescimento por influência de baixas temperaturas (CALVERT et al., 1957).

3.2. Protocolo de curta exposição a baixa temperatura em tomateiro

Foram testados para o protocolo de florescimento de tomateiro sobre baixa temperatura três métodos para padronização da germinação das sementes, utilizando meio de cultura MS meia força, germinação direta no substrato (mistura de 1:1, por volume, de substrato comercial, Plantmax HT Eucatex, Brasil, e vermiculita suplementada com 1 g/L de NPK 10:10:10 e 4 g/L de calcário) em bandeja de 30 células com volume de 90 ml/célula, e também a germinação em caixa de germinação do tipo (gerbox). Foi selecionado para o presente trabalho a germinação das sementes em caixa de germinação do tipo gerbox, devido a melhor adaptação das sementes pós germinação em substratos descrito, como também viabilidade de padronização do estágio inicial de desenvolvimento, pela observação do desenvolvimento da radícula.

A temperatura para o tratamento das plantas de tomateiro foi determinada em experimentos preliminares realizados em câmaras de crescimento do tipo B.O.Ds, com regime de dia longo (16 horas luz: 8 horas escuro), em experimento com temperaturas de 8°C, 12°C e 16°C, como mostrado no Apêndice A. Na temperatura de 8°C observou-se severa inibição do desenvolvimento da plântula, enquanto que a exposição a 12°C promoveu pequeno estresse, com presença de antocianina na parte abaxial dos cotilédones (Apêndice A). Já a 16°C, as plantas se desenvolveram sem aparente estresse e apresentaram

diferença no número de folhas no eixo principal antes da primeira inflorescência. Portanto, elegemos a temperatura de 16°C para testar a sinalização a curta exposição a baixa temperatura. A temperatura controle foi de 23°C (SILVA et al., 1994), para o desenvolvimento de tomateiro em B.O.D.

As plantas foram semeadas em gerbox, com papel absorvente embebido em água, e germinadas sob condição de ausência de luminosidade. Após a germinação, período caracterizado pela emissão da radícula, foram transplantadas em bandejas de muda de tomate de 30 células com volume de 90 ml/célula contendo uma mistura de 1:1 (por volume) de substrato comercial (Plantmax HT Eucatex, Brasil) e vermiculita suplementada com 1 g/L de NPK 10:10:10 e 4 g/L de calcário e transferidas a câmaras incubadoras do tipo B.O.Ds. Foi estabelecido como “dia um” de desenvolvimento o momento em que ocorre a emissão da radícula. Após transplantadas em bandeja, foram mantidas em câmara sob regime de dia longo (16 horas luz: 8 horas escuro) a temperatura de 23°C durante 3 dias, até a expansão dos cotilédones. Posteriormente transferidas para uma câmara sob regime de dia longo (16 horas luz: 8 horas escuro) a temperatura de 16°C, considerando o tratamento 1 e uma segunda B.O.D a temperatura controle de 23°C considerando tratamento 2, por um período de sete dias do desenvolvimento intermediário do cotilédone. Neste período ocorre expansão dos cotilédones e transição de meristema vegetativo para meristema de inflorescência no tomateiro cv. MT (SILVA et al., 2018), realizando o mesmo tratamento para todos os cultivares analisados. Posteriormente, as plântulas foram transplantadas para vasos de 150 ml contendo a mesma mistura de substrato e transferidas para casa de vegetação, como observado na Figura 2. A partir do transplantio, todas as plantas foram mantidas em temperatura de casa-de-vegetação, na qual a temperatura variou de 27-30°C até as análises morfológicas.

Figura 2. Comparação entre períodos de desenvolvimento do tomateiro considerando a emissão da radícula como dia um, emissão do gancho plumular como 2 dias após a germinação (DAG), desenvolvimento intermediário do cotilédone como 3 DAG e expansão total do cotilédone como 5 DAG. Barra de escala: 2 mm.

3.3. Avaliação do tempo de florescimento

3.3.1. Avaliação da transição do meristema apical para meristema de inflorescência

Foram avaliados, em estereoscópio, os ápices vegetativo e de inflorescência de plântulas de tomateiro cv. MT e miR156OE após curta exposição a baixas temperaturas. Para cada genótipo, foram utilizadas 15 repetições por tempo de avaliação. Os meristemas foram classificados de acordo com sua morfologia em três categorias (vegetativo, transição e reprodutivo) (PARK et al., 2012; SILVA et al., 2018).

3.3.2. Avaliação do número de folhas no eixo principal

O número de folhas no eixo principal foi mensurado, considerando o total de folhas formadas até da primeira inflorescência no eixo principal, evento que determina a transição de fase do meristema vegetativo para o de inflorescência (SAMACH; LOTAN, 2007). Foram

avaliadas em média 15 plantas para os genótipos de tomateiro cv. MT, miR156OE, *p35S::SFT*, e o cultivar Ailsa Craig.

3.3.3. Avaliação do número de dias até antese

Foi avaliado o número de dias necessários após a germinação para que pelo menos 50% das plantas de tomateiro atingisse a antese, momento que seus órgãos florais estão completamente desenvolvidos. Foram avaliados os genótipos de tomateiro cv. MT, miR156OE, *p35S::SFT*, e o cultivar Ailsa Craig, após as plântulas serem expostas a baixas temperaturas (16°C) e temperatura controle (23°C), com um número médio de 15 repetições por tempo de avaliação.

3.4. Extração e análise de RNA total

Foram feitas as extrações de RNA total de diferentes amostras seguindo a recomendação do fabricante do reagente TRIZOL (Invitrogen). Cada genótipo foi macerado em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido. Após a extração do RNA total, as amostras foram tratadas com 2 µl de DNase I Amplification Grade (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante para remoção total de DNA genômico. Em seguida foi verificada a integridade das amostras de RNA por verificação de eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com 0,001% (v/v) de brometo de etílio, em tampão de corrida TAE 1x (40mM Tris-acetato; 1mM EDTA) com tensão constante de 130V. A concentração e pureza do RNA foi avaliada por espectrofotometria de absorção, utilizando o equipamento Thermo NanoDrop 2000 (Uniscience).

3.5. Avaliação da expressão gênica por RT- PCR em Tempo Real (RT-qPCR)

Foi realizada a análise do acúmulo de mRNAs e miRNAs maduros por RT-qPCR como descrito (SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2018). O reagente adotado nesse experimento foi o Go Taq® qPCR Master Mix (PROMEGA). Os iniciadores específicos estão descritos no Apêndice B. Foram utilizados como controle o gene endógeno *TUBULINA* (Soly04g081490)

(MOUNET et al., 2009) para meristema e o gene endógeno CAC (Solyc08g006960) (EXPÓSITO-RODRÍGUES et al., 2008) para controle de análises de expressão gênica nos tecidos cotiledonares.

As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas no sistema *One Step PCR System* (Life Technologies - EUA). As reações foram amplificadas por 10 segundos a 95°C, seguido de 40 a 50 ciclos de 95°C por 10 segundos e 72°C por 30 segundos. Todas as reações foram realizadas em triplicatas e com controle negativo (sem adição de amostra cDNA). A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método do *Ct* comparativo pelo *software* homônimo da mesma plataforma (EXPÓSITO-RODRÍGUEZ et al., 2008).

3.6. Análise de expressão gênica em ápice vegetativo e cotilédone de plântulas de tomateiro MT

Para a análise da expressão gênica em ápice vegetativo de plântulas de tomate, foram coletadas três amostras biológicas de tecidos oriundos do ápice caulinar provenientes dos genótipos cv. MT. Cada amostra foi composta pelo pool de pelo menos cinco ápices vegetativos com 13 dias após germinação (DAG). Amostras biológicas de cotilédones do genótipo cv. MT foram coletadas aos 13 DAG de desenvolvimento. Cada amostra foi composta pelo *pool* de tecido oriundo de pelo menos sete plântulas.

3.7. Análises estatísticas

Todos os dados das variáveis dos experimentos citados foram analisados utilizando o programa Assistat versão 7.7 beta (disponível em: <http://assistat.com>) e as médias comparadas pelo teste de Tukey para número de folhas e T-student para análises de qPCR.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da resposta do tempo de florescimento a baixa temperatura por meio da contagem do número de folhas no eixo principal até a primeira inflorescência

Os primórdios foliares são produzidos a partir do meristema apical em intervalos regulares. O tempo decorrente entre a formação de dois primórdios foliares sucessivos define o *plastochron* (VALLEJOS et al., 1983). Um dos parâmetros para avaliar o tempo de florescimento do eixo principal é medir o número de folhas produzidas antes da conversão de meristema vegetativo em uma estrutura reprodutiva (KINET; PEET, 1997). Nesse processo, o miR156 aparece como um modulador quantitativo, em vez de espacial, da expressão dos genes *SPLs* em primórdios foliares e no meristema, e a atividade das *SPLs* inibe a iniciação de novas folhas no meristema apical da planta (WANG et al., 2008).

Para determinar se a curta exposição a baixas temperaturas afeta o tempo de florescimento em tomateiro, inicialmente foi avaliado o número de folhas no eixo principal formadas até a primeira inflorescência visível, em plantas expostas a baixa temperatura (16°C) e temperatura controle (23°C), utilizando o cultivar modelo de tomateiro MT e as plantas miR156OE, *p35S::SFT*, além do cultivar indeterminado Ailsa Craig.

As plantas do cultivar MT expostas a curto períodos de baixa temperatura (16°C) apresentaram diminuição de ~1,3 folhas em relação ao controle (Figura 3A,B); também as plantas do cultivar Ailsa Craig expostas ao tratamento de temperatura apresentaram redução de ~1,4 folhas em relação ao controle de 23°C (Figura 3C). Interessantemente, o número de folhas produzidas no eixo principal até a primeira inflorescência no cultivar MT foi por em média de 8 folhas (Figura 3B), um número maior do que o descrito para plantas MT crescidas em casa-de-vegetação (VICENTE et al., 2015; SILVA et al., 2018). Provalmente, essa diferença é devido a diferença em qualidade de luz disponível para as plantas de tomateiro cv. MT crescidas em B.O.D nos nossos experimentos. De qualquer forma, embora a diferença no número de folhas tenha sido pequena entre 23°C e 16°C (Figura 3), esta foi significativamente relevante. Além disso, o experimento foi repetido em outra época do ano, apresentando resultados similares. Baseado nos dados descritos na literatura, pode-se concluir que, as plantas de tomateiro cv. MT e Ailsa Craig expostas ao tratamento de curta exposição à baixa temperatura (16°C) (Figura 3) apresentaram aumento no *plastochron*,

produzindo menor número de folhas no eixo principal que as plantas controles cv. MT e Ailsa Craig expostas a temperatura controle de 23°C. Nossos dados corroboram aqueles descritos anteriormente para outros cultivares de tomateiro (CALVERT et al., 1957; NOTO, 1985).

Figura 3. Avaliação dos genótipos de tomateiro cultivares MT e Ailsa Craig quanto ao florescimento. A) Comparação entre o cultivar MT exposto a temperatura controle de 23°C e o mesmo cultivar a temperatura de 16°C exposto por sete dias após o período de 3 DAG, o qual ocorre a expansão intermediária do cotilédone, com número de 15 repetições para cada tratamento. B) e C) Quantificação do número de folhas no eixo principal até a primeira inflorescência dos genótipos cv. MT e Ailsa Craig, respectivamente. * significa $p < 0,05$ de probabilidade pelo teste de Tukey.

Com o intuito de determinar se as vias genéticas reguladas pelo miR156 e o gene *SFT* estavam associadas o controle do florescimento em tomateiro em resposta a exposição a baixa temperaturas, nós avaliamos a transição para o florescimento (por meio da contagem do número de folhas no eixo principal) em plantas miR156OE e *p35S::SFT* (LIFSCHITZ et al., 2006; SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2018) expostas ao tratamento de 16°C (vide Material e Métodos). Em plantas de *arabidopsis* superexpressando o miR156, foi observado encurtamento do *plastochron* nos dias iniciais de desenvolvimento. Nesta espécie, plantas superexpressando o miR156 tiveram aumento da taxa de produção de folhas de 1,4 para 2,2 folhas ao dia (SCHWAB et al., 2005), enquanto que em plantas de tomateiro superexpressando o miR156, ao menos nos dias iniciais de desenvolvimento, não apresentaram alteração no *plastochron*, mantendo taxa de iniciação dos primórdios foliares comparáveis as plantas MT (SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2018). Em plantas superexpressando o gene *SFT* (*p35S::SFT*) ocorre forte aumento do *plastochron*, acelerando o florescimento de tomateiro (SILVA et al., 2018).

Foram contados o número de folhas no eixo principal quando a primeira inflorescência estava visível dos genótipos *p35S::SFT* e miR156OE (Figura 4) expostas ao mesmo tratamento de temperatura do experimento anterior (16°C) e controle 23°C. Foi observado que não houve alteração do número de folhas dessas plantas quando expostas ao tratamento de curta exposição a temperatura 16°C em relação ao controle (Figura 4). Os dados sugerem que a repressão dos genes *SPLs* (regulados pelo miR156) nas plantas miR156OE e o aumento de expressão do gene *SFT* nas plantas *p35S::SFT* foram suficientes para minimizar o efeito da baixa temperatura no *plastochron* de tomateiro. É possível que o efeito de temperaturas baixas na produção de folhas em tomateiro seja dependente da correta expressão dos genes *SPLs* e *SFT*, a qual foi profundamente alterada nas plantas *p35S::SFT* e miR156OE. Entretanto, não está claro se este efeito no *plastochron* em tomateiro está correlacionado com sua resposta ao florescimento em temperaturas baixas. Em *arabidopsis*, a superexpressão do miR156 causa extremo atraso no florescimento, quando avaliado o número total de folhas até a primeira inflorescência visível. Segundo KIM et al. (2012), plantas de *arabidopsis* miR156OE produzem duas vezes mais folhas quando expostas a curtos períodos de 16°C do que plantas de *arabidopsis* miR156OE crescidas a 23°C. Portanto, a redução de expressão dos genes *SPLs* (regulados pelo miR156) em plantas de *arabidopsis* miR156OE atrasa o florescimento em resposta a temperatura ambiental.

Figura 4. Avaliação dos genótipos de tomateiro *p35S::SFT* e *miR156OE* quanto ao florescimento. A e B) Comparação entre a temperatura controle de 23°C e temperatura de 16°C, exposta por sete dias após o período de 3 DAG, o qual ocorre a expansão intermediária do cotilédone, para os cultivares *p35S::SFT* e *miR156OE*, com em média 15 repetições para cada tratamento. C-D) Quantificação do número de folhas no eixo principal até a primeira inflorescência dos genótipos *p35S::SFT* e *miR156OE*. * significa $p < 0,05$ de probabilidade pelo teste de Tukey.

4.2. Maturação do meristema apical em tomateiro em resposta a curta exposição a baixa temperatura (16°C)

As inflorescências se desenvolvem a partir do meristema apical, o qual através da maturação de grupo de células totipotentes promove regulação da transição vegetativa - reprodutiva da planta. A transição de fase apresenta-se como um parâmetro crucial para determinar com precisão o período de transição do meristema vegetativo para o reprodutivo (PARK et al., 2012) e assim, determinar o tempo de florescimento da planta.

A via genética *AGE*, regulada pelo *miR156*, controla a maturação do meristema, regulando o período de transição de fase vegetativa em reprodutiva (SCHWAB et al., 2005; XIE; WU; XIONG, 2006). Para estudar o papel da transição apical do meristema de tomateiro no tempo de florescimento em resposta a baixa temperatura, analisamos no 13º dia após a

germinação (DAG) os ápices de plantas de tomateiro cv. MT expostas a curto período de baixa temperatura (16°C) e controle de (23°C). O padrão de análise foi estabelecido em experimento prévio que determinou o momento em que todos os primórdios foliares formados antes da transição do meristema floral estivessem desenvolvidos. Baseado na morfologia do meristema apical (PARK et al., 2012; SILVA et al., 2018), foi possível identificar que nesse período a totalidade das plantas de tomateiro encontravam-se no estágio de transição ou reprodutivo (Figura 5).

Figura 5. Padrão de desenvolvimento meristemático de plântulas MT e miR156OE. (A-C) Ápices representativos dos estágios de maturação do meristema vegetativo (A), transição (B) e reprodutivo (C). A seta vermelha indica o meristema simpodial e a seta preta indica a inflorescência, que marca a transição de fase. Barra de escala em (A-C): 500 μm . (D-F) Padrão de desenvolvimento de meristema em análise de M.E.V., representando os estágios vegetativo (D), transição (E) e reprodutivo (F). (G e H) Frequência do tipo de meristema nos ápices de plântulas MT e miR156OE aos 13 dias após germinação. Foram avaliadas 10 plântulas para cada genótipo para cada tratamento. Barra de escala em (D-F): 100 μm , 30 μm e 100 μm .

Foi possível observar, baseado na morfologia do meristema apical (Figura 5A-F), que aos 13 DAG, as plantas MT expostas ao tratamento de curta exposição a baixa temperatura (16°C) apresentaram menos de 50% de meristemas reprodutivos, diferentemente das plantas controles (23°C), nas quais a maior parte das plantas já apresentaram meristema em estágio reprodutivo (mais de 90%) aos 13 DAG (Figura 5G). Este resultado sugere que, diferentemente do que se esperava baseado na contagem do número de folhas (Figura 4), a exposição a baixas temperaturas atrasa a maturação do meristema, quando comparadas as plantas MT em temperatura controle. Em plantas miR156OE, tanto as plântulas expostas ao tratamento de baixa temperatura (16°C), quando as plântulas crescidas em temperatura controle (23°C), apresentaram maioria dos meristemas na fase vegetativa, cerca de 80% e 70% respectivamente e somente uma pequena porcentagem de meristema em transição (Figura 5H).

Aparentemente, os ápices de plantas miR156OE foram menos sensíveis a exposição por baixa temperatura, visto que a diferença entre temperaturas (16°C e 23°C) foi menor (30%) de meristemas em transição a 23°C comparado a 20% de meristemas em transição a 16°C (Figura 5H). A diferença no tempo de transição do meristema apical entre os tratamentos em tomateiro cv. MT sugere que a baixa temperatura promove atraso da transição do estado vegetativo no meristema apical, e consequentemente atraso no tempo de florescimento em plantas expostas a um curto período a baixa temperatura (16°C). Por outro lado, em plantas superexpressando o miR156 (miR156OE), o elevado nível de transcritos do miR156 (e consequente redução drástica de transcritos dos genes *SBPs/SPLs*; SILVA et al., 2014, 2018) tanto em plantas expostas ao tratamento de baixa temperatura (16°C), quanto nas plantas controle (expostas a temperatura de 23°C) regulam a transição de fase vegetativa-reprodutiva. Os genes *SBPs/SPLs* parecem ser importantes para a percepção do estímulo de baixa temperatura em tomateiro, já que a restrição de sua atividade em plantas miR156OE aparentemente reduziu a sensibilidade dessas plantas ao estímulo de baixas temperaturas. Entretanto, para confirmar essa hipótese, análises de maturação do meristema em resposta a baixa temperatura em plantas com altos níveis de transcritos de *SBPs/SPLs* precisam ainda ser realizadas.

Em conjunto, os resultados indicam que a redução de atividade das proteínas *SBPs/SPLs* (como nas plantas miR156OE) reduzem ou bloqueiam a resposta de florescimento de tomateiro a curta exposição a baixas temperaturas, corroborando com os dados

observados na Figura 4, em que o número de folhas de plantas miR156OE não foi modificado em resposta a exposição a baixas temperaturas. A redução dessa resposta pode ser causada pela alteração de expressão do gene *SFT*, alvo das SBPs/SPLs (SILVA et al., 2018), visto que em plantas de tomateiro com ganho de função para o gene *SFT* (*p35S::SFT*), o número de folhas em resposta a exposição a baixas temperaturas também não foi alterado. Entretanto, análises detalhadas de maturação do meristema de plântulas *p35S::SFT* e mutante *sft* expostas a curto período de baixa temperatura precisam ser realizadas para corroborar esta hipótese.

4.3. Tempo de florescimento em número de dias até a antese em tomateiro

A antese floral é marcada pelo momento da abertura da flor. O tempo decorrente até a abertura do primeiro botão floral é utilizado como parâmetro para investigar os mecanismos genéticos que controlam o tempo de florescimento em *Solanum lycopersicum* (JIMENEZ-GOMEZ et al., 2007). Para analisar o efeito da baixa temperatura (16°C) no tempo de florescimento de tomateiro, foi também mensurado o número de dias até a antese para cada tratamento, comparando o número de dias necessários para que pelo menos 50% das plantas apresentassem flores na fase de antese, como observado na Figura 6.

Figura 6. Avaliação do tempo de florescimento em número de dias até a antese dos genótipos de tomateiro cv. MT, Alisa Craig, miR156OE e *p35S::SFT*. (A - E) Comparação entre a temperatura controle de 23°C e tratamento de temperatura de 16°C por um período de sete dias após o desenvolvimento intermediário do cotilédono, para os genótipos MT, Alisa Craig, miR156OE e *p35S::SFT* respectivamente, com 15 repetições para cada tratamento.

O número de dias até antese apresenta-se útil, mesmo para investigar os mecanismos genéticos controlando o tempo de florescimento em espécies selvagens relacionadas ao tomateiro (Kinet, 1977). O número de dias até a antese foi utilizado para medir o tempo de florescimento entre *S. lycopersicum* e *S. chmielewskii*. As plantas de *S. lycopersicum* floresceram em média após 45,6 dias de desenvolvimento, 48 dias antes das plantas de *S. chmielewskii* (JIMENEZ-GOMEZ et al., 2007). No presente trabalho, comparou-se o número de dias até a antese entre plantas expostas a temperatura de 23°C e 16°C. As plantas de tomateiro cv. MT expostas a 16°C atrasaram em dois dias a fase de antese (Figura 6A). O mesmo foi observado para o cultivar Ailsa Craig (Figura 6B), o qual apresentou também aumento de dois dias no período de antese. Ambos os resultados reforçam o efeito de curta exposição a baixa temperatura no atraso de florescimento em tomateiro. Entretanto, em plantas superexpressando o miR156 (miR156OE) e plantas superexpressando o gene *SFT*, não houve diferença do número de dias até antese. Conjuntamente, os dados sugerem que alterações nas vias do miR156-SBPs/SPLs e *SFT* reduzem a sensibilidade de

plantas de tomateiro em relação ao controle do florescimento em resposta a exposição de plântulas a baixa temperatura.

Assim pode-se sugerir que para análise da variável temperatura ambiental dentro de um mesmo cultivar/genótipo, parâmetros como transição do meristema e dias até a antese devem ser usados para análise do tempo de florescimento. O número de folhas produzidas pelo ápice caulinar está fortemente relacionado ao *plastochron* e pode estar desacoplado da maturação do meristema em relação ao tempo de florescimento em resposta a exposição a baixas temperaturas. Levando em consideração a transição do meristema e dias até a antese, houve um prolongamento da fase de transição como também um maior tempo para a antese, caracterizando atraso do tempo de florescimento para os cultivares e genótipos analisados. Também foi demonstrado que a via *miR156/SPL/SBP/SFT* tem grande importância para o florescimento de tomateiro, uma vez que a expressão ectópica de genes dessa via não alterou nenhum dos parâmetros analisados para tempo de florescimento em plantas sobre baixa temperatura.

Dado que o *plastochron* foi mais longo em plantas de tomateiro submetidas a exposição curta a baixas temperaturas (Figura 4), mas a maturação do meristema e dias até antese foram atrasados nestas mesmas plantas, é possível inferir que há um desacoplamento da maturação do meristema e produção de primórdios foliares em relação a resposta ao florescimento em plantas de tomateiro expostas a baixas temperaturas. Existem duas vias genéticas conhecidas que afetam o comprimento do *plastochron* em *arabidopsis*: uma inclui o *miR156* e seus alvos *SBPs/SPLs* (SCHWARZ et al, 2008). Em *arabidopsis*, o duplo mutante *sp19sp15* apresenta encurtamento do *plastochron*, embora com fenótipo mais brando do que em plantas superexpressando o *miR156*. Já a expressão da versão resistente ao *miR156* do gene *SPL9* promove aumento do *plastochron* (SCHWAB et al., 2005).

A outra via é regulada pelo gene *CYP78A5/KLÜH*, ortólogo do gene *PLASTOCHRON1 (PLA1)* de arroz, o qual controla o *plastochron* de forma independente da via *miR156/SBPs/SPLs*. O gene *CYP78A5/KLÜH* pertence a superfamília *cytochrome P450*, mais especificamente a família em plantas *CYP78A* (SCHULER e WERCK-REICHHART, 2003; ITOH et al, 1998; ZONDLO; IRISH, 1999; MIYOSHI et al, 2004; ANASTASIOU et al, 2007; SCHWARZ et al, 2008). Para identificar possíveis genes homólogos ao *CYP78A5/KLÜH* em tomateiro, foi construído uma árvore filogenética utilizando o programa MEGA-X

(<https://www.megasoftware.net/>). Utilizando o modelo de comparação Neighbor-joining, método de distância p e supressão pair-wise, foram agrupadas sequências de aminoácidos de mesmo domínio conservado e maior similaridade em diferentes famílias em *Arabidopsis*, com sequências de aminoácidos com mesmo domínio conservado e maior similaridade de *Solanum lycopersicum*. Pela proximidade foram encontrados dois possíveis homólogos em tomateiro: acessos Solyc03g114940 e Solyc12g056810 (Figura 7).

Figura 7. Árvore filogenética comparando as sequências identificadas em *Solanum lycopersicum* com *Arabidopsis thaliana*. Foi gerado utilizando-se o programa MEGA-X com o modelo de comparação Neighbor-joining, método de distância p e supressão pair-wise.

Os próximos experimentos incluem avaliar a expressão dos genes *Solyc03g114940* e *Solyc12g056810* em ápices de plantas MT submetidas a exposição por curto período a baixas temperaturas.

4.4. Análise da expressão gênica por RT-qPCR em ápice de tomateiro cv.MT dos genes *CBF1*, *miR156* e *SlySBP15*

Para avaliar a interação molecular entre as vias *miR156* e *SlySBP* em resposta à baixa temperatura, avaliou-se a expressão do *miR156* maduro e do gene *SlySBP15* no ápice

de plantas MT. O acúmulo de miR156 promove atraso no florescimento, regulando a transição floral via a repressão de genes do tipo *SPL/SBP* (SALINAS et al., 2012). Em tomateiro, o gene *SlySBP15* é regulado pelo miR156 (SILVA et al., 2014), sendo este relacionado a regulação da expressão de genes responsáveis pela transição e iniciação floral (SILVA et al., 2018). Baseado no tempo de desenvolvimento estabelecido em DAG e transição do meristema (Figura 5 A-C), decidiu-se adotar o 13 DAG como tempo de avaliação, uma vez que nesse período todos os primórdios foliares formados antes da transição do meristema floral estão desenvolvidos, como mostrado na Figura 5G. Assim em tomateiro cv. MT, esse período de desenvolvimento proporciona uma "janela" do estágio reprodutivo.

Para controle do tratamento de baixa temperatura foi utilizado gene relacionado aos mecanismos de adaptação a baixas temperaturas em plantas. Em arábida, a via do gene *C-Repeat binding factor (CBF)* apresenta vários genes relacionados a regulação por baixa temperatura (MARUYAMA et al. 2004; VOGEL et al. 2005). Entre esses genes, o primeiro membro da família *CBF*, o gene *CBF1* apresenta maior participação na tolerância a baixa temperatura (HSIEH et al., 2002). Em tomateiro, seu homólogo *CBF1* apresenta papel chave na resposta a baixa temperatura, induzindo a expressão de vários genes responsivos a esse estímulo ambiental (HSIEH et al. 2002). Os níveis de transcritos do gene *CBF1* aumentaram em plantas MT expostas ao tratamento de baixa temperatura (16°C). Portanto, esse resultado indica que o tratamento por baixas temperaturas (16°C) foi "percebido" ao nível molecular em ápices de tomateiro.

Figura 8. Análise de expressão relativa via RT-qPCR no genótipo de tomateiro cv. MT dos genes *CBF1*, *miR156* maduro e *SlySBP15*, comparando ápices reprodutivos nos tratamentos de 23°C e 16°C. Os dados representam a média e o erro padrão de três amostras biológicas. A) Padrão de expressão do *CBF1* maduro comparando 23°C e 16°C. B) Padrão de expressão do *miR156* comparando 16°C e 23°C. C) Padrão de expressão da *SlySBP15* comparando 16°C e 23°C. * significa $p < 0,05$ de probabilidade pelo teste-t de Student.

A expressão do miR156 maduro em ápices de 13DAG aumenta em plantas tratadas com baixa temperatura (16°C) (Figura 8B), o que provavelmente está relacionado com o atraso do florescimento obtido por exposição a baixa temperatura, observado no desenvolvimento do meristema e no número de dias que as plantas de MT atingiram a antese (Figuras 5 e 6). Portanto, nossos dados indicam que baixas temperaturas prolongam a maturação do meristema e florescimento por meio da indução a expressão desse microRNA.

Com o intuito de avaliar qual ou quais possíveis genes *SBP/SBP* (alvos do miR156) poderiam ser modificados ao nível de expressão gênica pelo tratamento por baixas temperaturas, foi avaliada a expressão dos genes *SlySBP3* e *SlySBP15*, ambos candidatos a regulação do tempo de florescimento em tomateiro (SILVA et al., 2018). Similar a seus homólogos em *arabidopsis* (SALINAS et al., 2012), os genes *SlySBP3* e *SlySBP15* desempenham papel central durante a maturação do meristema (SILVA et al., 2018; PARK et al., 2012). Importante, os homólogos dos genes *SlySBP3* e *SlySBP15* em *arabidopsis* são reprimidos nos ápices e nas folhas após exposição a baixa temperatura (KIM et al., 2012).

Enquanto a expressão de *SlySBP3* não foi alterada pela exposição dos ápices a 16°C (dados não mostrados), os níveis de transcritos do gene *SlySBP15* foram significativamente reduzidos aos 13 DAG em plantas com tratamento de baixa temperatura (16°C) (Figura 8C). Como observado na Figura 5G, as plantas MT apresentavam ápices em maior porcentagem no estado de transição do que as plantas controles (23°C), em que a maioria dos ápices já se apresentavam na fase reprodutiva (Figura 5G). Conjuntamente, os dados sugerem que o atraso do tempo de florescimento é resultado da maior expressão do miR156, o que resulta na expressão reduzida de *SlySBP15*, promovendo então a manutenção do meristema de transição por mais tempo. Portanto, a via da temperatura ambiental pode estar regulando, através da via miR156/*SPL/SBP*, o florescimento em tomateiro.

4.5. Análise da expressão gênica dos genes *CBF1*, miR156, *SlySBP15* e *SFT* por RT-qPCR em cotilédones de tomateiro MT

A transição do meristema apical é regulada por fatores endógenos e ambientais, os quais convergem para a mudança de identidade vegetativo para reprodutivo em plantas. O gene *SFT* apresenta papel chave nesse processo por ser um sinal móvel universal efetor do florescimento (LIFSCHITZ et al., 2006). As plantas percebem os estímulos ambientais nas

folhas, translocando a proteína *SFT* dessa região para o meristema, via floema, promovendo a transição de fase vegetativa para reprodutiva (LIFSCHITZ et al., 2006).

Com o intuito de avaliar a sinalização molecular da baixa temperatura no florescimento, foi analisado a expressão do gene *SFT* no cotilédone de plântulas de tomateiro cv. MT. Avaliou-se no cotilédone a expressão do gene efetor do florescimento *SFT* aos 13 DAG. Também foi avaliado a expressão do gene controle para temperatura *CBF1* e dos efetores da via *AGE*, o miR156 e seu alvo *SlySBP15* no mesmo período (Figura 9).

Como observado nos dados de expressão em ápices de 13 DAG (Figura 8A), os níveis de transcritos do gene *CBF1* aumentaram no cotilédone de plantas MT, indicando resposta molecular nos cotilédones ao tratamento de curta exposição a baixa temperatura 16°C em relação ao controle 23°C (Figura 9A).

Figura 9. Análise de expressão relativa via RT- qPCR no genótipo de tomateiro cv. MT dos genes *CBF1*, miR156 maduro e *SlySBP15*, comparando cotilédones de plantas expostas a temperatura de 23°C e 16°C. Os dados representam a média e o erro padrão de três amostras biológicas. A) Padrão de expressão do *CBF1* comparando 23°C e 16°C. B) Padrão de expressão do *SFT* comparando 16°C e 23°C. C) Padrão de expressão do miR156 maduro comparando 16°C e 23°C. D) Padrão de expressão de *SlySBP15* comparando 16°C e 23°C. * significa $p < 0,05$ de probabilidade pelo teste-t de Student.

Analisando os níveis de transcritos do gene *SFT*, observou-se alteração dos transcritos no cotilédone de plantas sobre exposição a baixa temperatura (16°C), diminuindo em relação ao controle (23°C) (Figura 9B). Portanto, é possível sugerir que uma das causas do maior tempo para transição das plantas expostas a baixa temperatura (16°C), seja a baixa presença de *SFT* em suas folhas, impossibilitando o desencadeamento da transição meristemática para a fase reprodutiva. Interessantemente, foram observados também os níveis de transcritos do miR156 e *SlySBP15* no cotilédone de MT, observando diminuição dos níveis do miR156 maduro e aumento da expressão de *SlySBP15* em plantas MT, expressões expostas as observadas nas análises realizadas nos ápices para o mesmo tratamento.

Os resultados observados tanto para o miR156 quanto para o gene *SlySBP15* foram inesperados (Figura 9), visto que se esperava padrão de expressão similar ao observado nos ápices (Figura 8). Em *arabidopsis*, os níveis de transcritos do miR156 aumentam em resposta a exposição a baixas temperaturas (16°C) tanto nos ápices como nos tecidos foliares, o oposto sendo observado para seus genes alvo em ambos os órgãos (KIM et al., 2012). Os dados em *arabidopsis* sugerem acoplamento da regulação da produção de folhas e maturação do meristema pela via miR156/*SBPs/SPLs* em resposta a baixas temperaturas. Em tomateiro, nossos resultados sugerem desacoplamento da regulação da produção de folhas e maturação do meristema pela via miR156/*SBPs/SPLs* em resposta a baixas temperaturas (Figura 9). Suportando essa ideia, a produção de folhas não foi alterada em plantas miR156OE expostas a curto período de exposição a 16°C (Figura 4). Além disso, os dados sugerem que a expressão de *SFT* nos cotilédones é regulada por baixa temperatura independentemente da via miR156/*SBPs/SPLs* (Figura 9). Se as vias reguladas por *SFT* e pelo miR156 interagem geneticamente em tomateiro em resposta a baixas temperaturas, ainda é uma questão sem resposta. Em *arabidopsis*, o duplo transgênico miR156OE; *p35S::FT* mostra redução na produção de folhas e tempo de florescimento em relação as plantas miR156OE, mas similar as plantas *p35S::FT* após exposição a baixas temperaturas (KIM et al., 2012). Cruzamentos entre as plantas de tomateiro miR156OE e *p35S::SFT* estão sendo realizados para avaliar no duplo-transgênico miR156OE; *p35S::SFT* a resposta a curta exposição a 16°C em termos de produção de folhas e maturação do meristema.

4.6. Análise da expressão dos genes *SIEZ1*, *SIEZ2*, *SIEZ3* e *SIMSI1* por RT-qPCR em cotilédones de tomateiro cv. MT

Componentes evolutivamente conservados na regulação da transição de fase vegetativa-reprodutiva em plantas incluem fatores epigenéticos (AHMAD; ZHANG; CAO, 2010). No núcleo eucariótico, a molécula de DNA está firmemente associada aos octâmeros de histonas na cromatina. A organização dessa estrutura da cromatina é crucial para o controle da expressão gênica e outros processos nucleares. Modificações pós-traducionais de histonas e do remodelamento dos nucleossomos, além do padrão de metilação do DNA, afetam a estrutura da cromatina e consequentemente a transcrição dos genes, sendo coletivamente referidas como alterações epigenéticas. Essas alterações são causadas por fatores epigenéticos específicos, os quais são dedicados a remodelar a cromatina (SPRINGER, 2013).

Alguns fatores epigenéticos evolutivamente conservados associados a alteração da cromatina pertencem ao complexo de proteínas denominado Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2). Este complexo é fundamental para modular a expressão gênica durante o desenvolvimento vegetal (MOZGOVA et al. 2015; XIAO; WAGNER, 2015). Genes do complexo PRC2, como *CURLY LEAF (CLF)* e *MULTISUPPRESSOR of IRA 1 (MSI1)* em *arabidopsis* promovem o florescimento em resposta a baixa temperatura (CHANVIVATTANA et al., 2004; WOOD et al., 2006; DE LUCIA et al., 2008), sendo seus homólogos em tomateiro os genes *SIEZ1*, *SIEZ2* e *SIEZ3* (BOUREAU et al., 20016) e *SIMSI1* (DAN-DAN et al., 2016), respectivamente. Em *arabidopsis*, a regulação negativa dos genes *MIR156* durante a mudança de fase juvenil-adulta está associada a um aumento de metilação do DNA, promovida pelo complexo PRC2 (XU et al., 2015). Baseado nos dados mostrados até o momento, e com o intuito de contribuir para o melhor entendimento do comportamento da transição de fase vegetativa-reprodutiva em tomateiro na via da temperatura ambiental, avaliou-se a expressão dos genes *SIEZ1*, *SIEZ2*, *SIEZ3* e *SIMSI1* nos cotilédones de plantas tomateiro cv.MT submetidas a curta exposição a baixa temperatura de 16°C e controle de 23°C.

OS genes *SIEZ1*, *SIEZ2* e *SIEZ3* são expressos em todos os órgãos de plantas de tomateiro, embora com diferentes perfis de expressão. Entretanto, os transcritos de *SIEZ1* se acumulam com maior abundância nas flores e nas folhas expandidas (HOW KIT et al. 2010).

Os transcritos do gene *SLEZ3* apresentam padrão de acúmulo em folhas semelhante ao mRNA de *SLEZ1*, caracterizado por aumento durante a expansão foliar e diminuindo a expressão desse gene após antese e desenvolvimento dos frutos. Já o gene *SLEZ2* apresenta um papel pleiotrópico, atuando no desenvolvimento vegetativo, reprodutivo e desenvolvimento do fruto (BOUREAU et al., 2016). Nossos dados mostram que houve maior expressão do gene *SLEZ3* em tecidos cotiledonares de plantas expostas ao tratamento de curta exposição a baixa temperatura (Figura 10A), diferentemente dos genes *SLEZ1* (Figura 10C) e *SLEZ2* (Figura 10D), todos possivelmente pertencentes ao complexo PCR2 de tomateiro. Outro gene candidato a regulação do desenvolvimento a baixa temperatura é o gene *SLMSL1*, visto que também pertence a genes da família *polycomb* (*PcG*) que interagem com o complexo PCR2 e seu homólogo em arábidsopsis, *MSI1*, interage na regulação do florescimento em resposta a baixa temperatura (DAN-DAN et al., 2016). Em tomateiro, o gene *SIMSI1* regula a fase de maturação do fruto, sendo que sua maior expressão inibe o amadurecimento, regulando negativamente um grande conjunto de genes que atuam nessa fase do desenvolvimento (DAN-DAN et al., 2016). Observou-se aumento sutil nos níveis dos transcritos do gene *SLMS1* em tecidos cotiledonares de plantas MT submetidas ao tratamento de baixa temperatura 16°C (Figura 10B). Nossos dados sugerem que tanto o *SLEZ3*, quanto o *SLMSL1*, podem estar envolvidos na regulação epigenética de genes associados ao controle do florescimento em plantas de tomateiro submetidas a baixas temperaturas.

Figura 10. Análise de expressão relativa via RT-qPCR dos genes *SLEZ3*, *SLMSL1*, *SLEZ2* e *SLEZ1* no genótipo de tomateiro cv. MT, comparando cotilédones nos tratamentos de 23°C e 16°C. Os dados representam a média e o erro padrão de três amostras biológicas. A) Padrão de expressão do *SLEZ3* maduro comparando 23°C e 16°C. B) Padrão de expressão do *SLMSL1* comparando 16°C e 23°C. C) Padrão de expressão da *SLEZ2* comparando 16°C e 23°C. D) Padrão de expressão da *SLEZ1* comparando 16°C e 23°C. * significa $p < 0,05$ de probabilidade pelo teste-t de Student.

Embora a ausência de mutantes de tomateiro para os genes do complexo PCR2 tenha nos impedindo de avaliar o papel funcional desses genes no controle do tempo de florescimento em relação ao tratamento de baixas temperaturas, é possível que proteínas do complexo PCR2 regulem a via do miR156/*SBPs/SPLs* e a expressão do gene *SFT*. Futuros trabalhos incluem gerar mutantes via edição gênica (CRISPR/Cas9) de genes do complexo PCR2 em tomateiro.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que:

A curta exposição a baixa temperatura atrasou o tempo de florescimento em tomateiro, atrasando a maturação do meristema e aumentando o número de dias até a antese, tanto do cultivar determinado MT quanto do indeterminado Ailsa craig. Por outro lado, a repressão dos genes *SBPs/SPLs* em plantas *miR156OE* reduz a resposta do florescimento a exposição de plantas a baixas temperaturas. Similar resultado é observado em plantas com aumento da oferta de *SFT* (em plantas *p35S::SFT*).

A curta exposição a baixa temperatura afeta positivamente a produção do *miR156* no ápice. Essa regulação ocorre durante a transição do meristema e pode ser responsável pelo atraso no florescimento. O aumento dos níveis de transcritos do *miR156* é acompanhado pela redução da transcrição do gene *SlySBP15*, sugerindo que pelo menos esse gene *SBP/SPL* está envolvido no controle do tempo de florescimento em resposta a baixas temperaturas. Também é observado esse antagonismo de expressão no cotilédone, com inibição dos níveis de transcritos do *miR156* maduro e nível maior de transcritos da *SlySBP15*. Em conjunto, esses resultados sugerem que baixas temperaturas regulam de forma independente a via *miR156/SBP/SPL* nos ápices e no cotilédone.

A presença de maior acúmulo de transcritos do *SFT* no cotilédone de plantas expostas a baixa temperatura pode impossibilitar ou dificultar o desencadeamento da transição meristemática da fase vegetativa para a fase reprodutiva.

Os genes do complexo PRC2, *SLEZ3* e *SLMSL1* aparecem como possíveis alvos da regulação do tempo de florescimento em resposta a baixa temperatura, atuando em paralelo ou na mesma via que *miR156/SPL/SBP/SFT*.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. et al. Down-regulation of tomato PHYTOL KINASE strongly impairs tocopherol biosynthesis and affects prenyl lipid metabolism in an organ-specific manner. **Journal of experimental botany**, v. 67, n. 3, p. 919-934, 2015.
- AHMAD, A.; ZHANG, Y.; CAO, X. Decoding the epigenetic language of plant development. **Molecular plant**, v. 3, n. 4, p. 719-728, 2010.
- ANASTASIOU, E. et al. Control of plant organ size by *KLUH/CYP78A5*-dependent intercellular signaling. **Developmental cell**, v. 13, n. 6, p. 843-856, 2007.
- BAULCOMBE, D. RNA silencing in plants. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 356-363, 2004.
- BERNIER, G.; PÉRILLEUX, Cl. A physiological overview of the genetics of flowering time control. **Plant Biotechnology Journal**, v. 3, n. 1, p. 3-16, 2005.
- BOUREAU, L. et al. A *CURLY LEAF* homologue controls both vegetative and reproductive development of tomato plants. **Plant molecular biology**, v. 90, n. 4-5, p. 485-501, 2016.
- CALVERT, A. Effect of the Early Environment on Development of Flowering in the Tomato: I. Temperature. **Journal of Horticultural Science**, v. 32, n. 1, p. 9-17, 1957.
- CAPOVILLA, G.; SCHMID, M.; POSÉ, D. Control of flowering by ambient temperature. **Journal of experimental botany**, v. 66, n. 1, p. 59-69, 2015.
- CHANVIVATTANA, Y. et al. Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in Arabidopsis. **Development**, v. 131, n. 21, p. 5263-5276, 2004.
- CORBESIER, L.; COUPLAND, G. Photoperiodic flowering of Arabidopsis: integrating genetic and physiological approaches to characterization of the floral stimulus. **Plant, Cell & Environment**, v. 28, n. 1, p. 54-66, 2005.
- CORBESIER, L. et al. *FT* protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of Arabidopsis. **Science**, v. 316, n. 5827, p. 1030-1033, 2007.
- CARDON, G. et al. Molecular characterisation of the Arabidopsis *SBP-box* genes. **Gene**, v. 237, n. 1, p. 91-104, 1999.
- DAN-DAN, L. et al. *Polycomb-group* protein *SIMS1* represses the expression of fruit-ripening genes to prolong shelf life in tomato. **Scientific reports**, v. 6, p. 31806, 2016.
- DE LUCIA, F. et al. A PHD-polycomb repressive complex 2 triggers the epigenetic silencing of FLC during vernalization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2008.

- EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M. et al. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC plant biology**, v. 8, n. 1, p. 131, 2008.
- GOODRICH, J. et al. A *Polycomb-group* gene regulates homeotic gene expression in Arabidopsis. **Nature**, v. 386, n. 6620, p. 44, 1997.
- GUSTAFSON-BROWN, C.; SAVIDGE, B.; YANOFSKY, M. F. Regulation of the Arabidopsis floral homeotic gene *APETALA1*. **Cell**, v. 76, n. 1, p. 131-143, 1994.
- HOW KIT, A. et al. Functional analysis of *SIEZ1* a tomato *Enhancer of zeste (E (z))* gene demonstrates a role in flower development. **Plant molecular biology**, v. 74, n. 3, p. 201-213, 2010.
- HSIEH, T. et al. Heterology expression of the Arabidopsis *C-repeat/dehydration* response element binding Factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. **Plant physiology**, v. 129, n. 3, p. 1086-1094, 2002.
- HUIJSER, P.; SCHMID, M. The control of developmental phase transitions in plants. **Development**, v. 138, n. 19, p. 4117-4129, 2011.
- ITOH, J. et al. A recessive heterochronic mutation, *plastochron1*, shortens the plastochron and elongates the vegetative phase in rice. **The Plant Cell**, v. 10, n. 9, p. 1511-1521, 1998.
- IWAKAWA, H.; TOMARI, Y. Molecular insights into microRNA-mediated translational repression in plants. **Molecular cell**, v. 52, n. 4, p. 591-601, 2013.
- JIMENEZ-GOMEZ, J. M. et al. Quantitative genetic analysis of flowering time in tomato. **Genome**, v. 50, n. 3, p. 303-315, 2007.
- KIM, W. et al. Structural determinants of miR156a precursor processing in temperature-responsive flowering in Arabidopsis. **Journal of experimental botany**, p. erw248, 2016.
- KIM, J. J. et al. The microRNA156-*SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE3* module regulates ambient temperature-responsive flowering via *FLOWERING LOCUS T* in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 159, n. 1, p. 461-478, 2012.
- KIM, D. et al. Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. **Annual Review of Cell and Developmental**, v. 25, p. 277-299, 2009.
- KINET, J. M. Effect of defoliation and growth substances on the development of the inflorescence in tomato. *Scientia Horticulturae*, v. 6, n. 1, p. 27-35, 1977.

- KINET, J. M.; PEET, M. M. Tomato. In: Wien HC (Ed) The Physiology of Vegetable Crops, **CAB International**, Wallingford, p. 207-258, 1997.
- KLEIN, J.; SAEDLER, H.; HUIJSER, P. A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene *SQUAMOSA*. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 250, n. 1, p. 7-16, 1996.
- KNOTT, J. E. Effect of a localized photoperiod on spinach. In: Proc. Am. Soc. Hortic. **Sci.** p. 152-154, 1934.
- KUMAR, S. V.; WIGGE, P. A. H2A. Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in Arabidopsis. **Cell**, v. 140, n. 1, p. 136-147, 2010.
- KUNITAKE, T. et al. Long-term exposure of mother plants to low temperatures delays flowering of Japanese autumn-flowering *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 'Jinba' and 'Seiko no Aki'. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 78, n. 2, p. 224-230, 2009.
- LEE, H. et al. Genetic framework for flowering-time regulation by ambient temperature-responsive miRNAs in Arabidopsis. **Nucleic acids research**, p. gkp1240, 2010.
- LIFSCHITZ, E. et al. The tomato *FT* ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 16, p. 6398-6403, 2006.
- LIFSCHITZ, E.; ESHED, Y. Universal florigenic signals triggered by *FT* homologues regulate growth and flowering cycles in perennial day-neutral tomato. **Journal of experimental botany**, v. 57, n. 13, p. 3405-3414, 2006.
- LIU, M. et al. Comprehensive profiling of Ethylene Response Factors expression identifies ripening-associated ERF genes and their link to key regulators of fruit ripening in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Plant physiology**, p. pp. 01859.2015, 2016.
- LOHMANN, J. U.; WEIGEL, D. Building beauty: the genetic control of floral patterning. **Developmental cell**, v. 2, n. 2, p. 135-142, 2002.
- LUO, M. et al. Genes controlling fertilization-independent seed development in Arabidopsis thaliana. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 1, p. 296-301, 1999.
- LOZANO, R. et al. Genetic analysis of reproductive development in tomato. **International Journal of Developmental Biology**, v. 53, n. 8-9-10, p. 1635-1648, 2009.
- MALLORY, A. C.; VAUCHERET, H. Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. **Nature genetics**, v. 38, p. S31-S36, 2006.

- MARTÍ, E. et al. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 9, p. 2037-2047, 2006.
- MARTÍNEZ-BELLO, L.; MORITZ, T.; LÓPEZ-DÍAZ, I. Silencing C19-GA 2-oxidases induces parthenocarpic development and inhibits lateral branching in tomato plants. **Journal of experimental botany**, v. 66, n. 19, p. 5897-5910, 2015.
- MARUYAMA, K. et al. Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis *DREB1A/CBF3* transcriptional factor using two microarray systems. **The Plant Journal**, v. 38, n. 6, p. 982-993, 2004.
- MEISSNER, R. et al. A new model system for tomato genetics. **The Plant Journal**, v. 12, n. 6, p. 1465-1472, 1997.
- MARGUERON, R.; REINBERG, D. The *Polycomb complex PRC2* and its mark in life. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 343, 2011.
- MICHAELS, S. D.; AMASINO, R. M. *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. **The Plant Cell**, v. 11, n. 5, p. 949-956, 1999.
- MICHAELS, S. D. Flowering time regulation produces much fruit. **Current opinion in plant biology**, v. 12, n. 1, p. 75-80, 2009.
- MIYOSHI, K. et al. PLASTOCHRON1, a timekeeper of leaf initiation in rice, encodes cytochrome P450. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 3, p. 875-880, 2004.
- MOLINERO-ROSALES, N. et al. *FALSIFLORA*, the tomato orthologue of *FLORICAULA* and *LEAFY*, controls flowering time and floral meristem identity. **The Plant Journal**, v. 20, n. 6, p. 685-693, 1999.
- MOLINERO-ROSALES, N. et al. *SINGLE FLOWER TRUSS* regulates the transition and maintenance of flowering in tomato. **Planta**, v. 218, n. 3, p. 427-434, 2004.
- MOREA, G. et al. Functional and evolutionary analyses of the miR156 and miR529 families in land plants. **BMC plant biology**, v. 16, n. 1, p. 40, 2016.
- MOUNET, F. et al. Gene and metabolite regulatory network analysis of early developing fruit tissues highlights new candidate genes for the control of tomato fruit composition and development. **Plant Physiology**, v. 149, n. 3, p. 1505-1528, 2009.
- MOZGOVA, I.; KÖHLER, C.; HENNIG, L. Keeping the gate closed: functions of the *polycomb repressive complex PRC 2* in development. **The Plant Journal**, v. 83, n. 1, p. 121-132, 2015.

- NOTO, G.; LA MALFA, G. Flowering of tomato in relation to pre-planting low temperatures. In: **Symposium on Protected Cultivation of Solanacea in Mild Winter Climates 191**. 1985. p. 275-280.
- PARK, S. J. et al. Rate of meristem maturation determines inflorescence architecture in tomato. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 2, p. 639-644, 2012.
- PNUELI, L. et al. The *SELF-PRUNING* gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of *CEN* and *TFL1*. *Development*, v. 125, n. 11, p. 1979-1989, 1998.
- REEVES, P. H.; COUPLAND, G. Analysis of flowering time control in Arabidopsis by comparison of double and triple mutants. **Plant Physiology**, v. 126, n. 3, p. 1085-1091, 2001.
- RHOADES, M. W. et al. Prediction of plant microRNA targets. **Cell**, v. 110, n. 4, p. 513-520, 2002.
- SALINAS, M. et al. Genomic organization, phylogenetic comparison and differential expression of the *SBP-box* family of transcription factors in tomato. **Planta**, v. 235, n. 6, p. 1171-1184, 2012.
- SAMACH, A.; LOTAN, H. The transition to flowering in tomato. **Plant Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 71-82, 2007.
- SCHMITZ, G.; THERES, K. Genetic control of branching in Arabidopsis and tomato. **Current opinion in plant biology**, v. 2, n. 1, p. 51-55, 1999.
- SCHUETTENGROBER, B. et al. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 735-745, 2007.
- SCHULER, M. A.; WERCK-REICHART, Daniele. Functional genomics of P450s. **Annual review of plant biology**, v. 54, n. 1, p. 629-667, 2003.
- SCHWAB, R. et al. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. **Developmental cell**, v. 8, n. 4, p. 517-527, 2005.
- SCHWARZ, S. et al. The microRNA regulated *SBP-box* genes *SPL9* and *SPL15* control shoot maturation in Arabidopsis. **Plant molecular biology**, v. 67, n. 1-2, p. 183-195, 2008.
- SHARIF, J. et al. Embracing change to remain the same: conservation of polycomb functions despite divergence of binding motifs among species. **Current opinion in cell biology**, v. 25, n. 3, p. 305-313, 2013.

- SHELDON, C. C. et al. Resetting of *FLOWERING LOCUS C* expression after epigenetic repression by vernalization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 6, p. 2214-2219, 2008.
- SILVA, E. M. et al. microRNA 159-targeted *Sl GAMYB* transcription factors are required for fruit set in tomato. *The Plant Journal*, v. 92, n. 1, p. 95-109, 2017.
- SILVA, G. F. et al. microRNA156-targeted *SPL/SBP box* transcription factors regulate tomato ovary and fruit development. **The Plant Journal**, v. 78, n. 4, p. 604-618, 2014.
- SILVA, G. F. et al. Tomato floral induction and flower development are orchestrated by the interplay between gibberellin and two unrelated micro RNA-controlled modules. **New Phytologist**, Sep 20. doi: 10.1111/nph.15492. 2018.
- SILVA, J.B.C.; GIORDANO, L.B.; BOITEUX, L.S. et al. Cultivo do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) para industrialização. Brasília: **Embrapa/CNPQ**, v. 12, p. 36p, 1994.
- SIMON, J. A.; KINGSTON, R. E. Occupying chromatin: Polycomb mechanisms for getting to genomic targets, stopping transcriptional traffic, and staying put. **Molecular cell**, v. 49, n. 5, p. 808-824, 2013.
- SPRINGER, N. M. Epigenetics and crop improvement. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 4, p. 241-247, 2013.
- SUN, H. et al. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. **Plant and Cell Physiology**, v. 47, n. 3, p. 426-431, 2006.
- SUNG, S.; AMASINO, R. M. Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. **Nature**, v. 427, n. 6970, p. 159-164, 2004.
- TAKENO, K. Stress-induced flowering: the third category of flowering response. **Journal of experimental botany**, v. 67, n. 17, p. 4925-4934, 2016.
- THOUET, J. et al. Repression of floral meristem fate is crucial in shaping tomato inflorescence. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31096, 2012.
- VALLEJOS, C. E. et al. Characterization of a differential low-temperature growth response in two species of *Lycopersicon*: the plastochron as a tool. **Planta**, v. 159, n. 6, p. 487-496, 1983.
- VAN PLOEG, D; HEUVELINK, E. Influence of sub-optimal temperature on tomato growth and yield: a review. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 80, n. 6, p. 652-659, 2005.

- VICENTE, M. et al. Semi-determinate growth habit adjusts the vegetative-to-reproductive balance and increases productivity and water-use efficiency in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Journal of plant physiology**, v. 177, p. 11-19, 2015.
- VOGEL, Jonathan T. et al. Roles of the *CBF2* and *ZAT12* transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 41, n. 2, p. 195-211, 2005.
- VREBALOV, J. et al. A *MADS-box* gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus. **Science**, v. 296, n. 5566, p. 343-346, 2002.
- WEIGEL, D. et al. *LEAFY* controls floral meristem identity in Arabidopsis. **Cell**, v. 69, n. 5, p. 843-859, 1992.
- WANG, H.; JONES, B.; LI, Z.; FRASSE, P.; DELALANDE, C.; REGAD, F.; CHAABOUNI, S.; LATCHE, A.; PECH, J. C.; BOUZAYEN, M. The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 10, p. 2676–2692, 2005.
- WANG, J. et al. Dual effects of miR156-targeted *SPL* genes and *CYP78A5/KLUH* on plastochron length and organ size in Arabidopsis thaliana. **The Plant Cell**, v. 20, n. 5, p. 1231-1243, 2008.
- WANG, J.; CZECH, B.; WEIGEL, D. miR156-regulated *SPL* transcription factors define an endogenous flowering pathway in Arabidopsis thaliana. **Cell**, v. 138, n. 4, p. 738-749, 2009.
- WANG, Y. et al. Phalaenopsis orchid light requirement during the induction of spiking. **HortScience**, v. 30, n. 1, p. 59-61, 1995.
- WIGGE, P. A. et al. Ambient temperature signalling in plants. **Current opinion in plant biology**, v. 16, n. 5, p. 661-666, 2013.
- WILSON, R. N.; HECKMAN, J. W.; SOMERVILLE, C. R. Gibberellin is required for flowering in Arabidopsis thaliana under short days. **Plant Physiology**, v. 100, n. 1, p. 403-408, 1992.
- WOOD, Craig C. et al. The Arabidopsis thaliana vernalization response requires a polycomb-like protein complex that also includes *VERNALIZATION INSENSITIVE 3*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 39, p. 14631-14636, 2006.
- WU, G. et al. The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in Arabidopsis. **Cell**, v. 138, n. 4, p. 750-759, 2009.

- XIAO, J.; WAGNER, D. Polycomb repression in the regulation of growth and development in Arabidopsis. **Current opinion in plant biology**, v. 23, p. 15-24, 2015.
- XIE, K.; WU, C.; XIONG, L. Genomic organization, differential expression, and interaction of *SQUAMOSA promoter-binding-like* transcription factors and microRNA156 in rice. **Plant physiology**, v. 142, n. 1, p. 280-293, 2006.
- XU, M. et al. Epigenetic regulation of vegetative phase change in Arabidopsis. **The Plant Cell**, p. TPC2015-00854-RA, 2015.
- XU, M. et al. Developmental functions of miR156-regulated *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)* genes in Arabidopsis thaliana. **Plos genetics**, v. 12, n. 8, p. e1006263, 2016.
- YAMAGUCHI, A. et al. The microRNA-regulated *SBP-Box* transcription factor *SPL3* is a direct upstream activator of *LEAFY*, *FRUITFULL*, and *APETALA1*. **Developmental cell**, v. 17, n. 2, p. 268-278, 2009.
- YU, S. et al. Gibberellin regulates the Arabidopsis floral transition through miR156-targeted *SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE* transcription factors. **The Plant Cell**, p. tpc. 112.101014, 2012.
- YUSTE-LISBONA, F. J. et al. Characterization of vegetative inflorescence (mc-vin) mutant provides new insight into the role of *MACROCALYX* in regulating inflorescence development of tomato. **Scientific reports**, v. 6, p. 18796, 2016.
- ZONDLO, S. C.; IRISH, V. F. *CYP78A5* encodes a cytochrome P450 that marks the shoot apical meristem boundary in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 19, n. 3, p. 259-268, 1999.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Testes para determinar a temperatura ideal para o protocolo de tratamento de baixa temperatura em tomateiro. A) Germinação de sementes em meio *in vitro* meia força. B) Tratamento de plantas de MT com 12°C e controle de 23°, durante 7 dias após a expansão intermediária dos cotilédones, plantas com 13 DAG. C) Tratamento de plantas MT com 8°C e controle 23 °C, plantas expostas a baixa temperatura desde a emissão da radícula.

MS meia força

APÊNDICE B. Tabela de iniciadores (primers)

Primer	Sequência	Acesso	Função
mature miR156 F	CCTGAGTGACAGAAGAGAGTG	MIMAT0000167	qPCR
RT 156	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTGCTCT		qPCR
SFT F	CACCGATATTCCAGCTACCA	Solyc03g063100	qPCR
SFT R	TGTTTGCCGACCTAATTGTC		qPCR
F Sly SBP15	CACCCACTCTAAGTCTCCTACTGTTGTTGTT	Solyc10g078700	qPCR
R Sly SBP15	TCAAAGAGTCCAGTGCACATTC		qPCR
SIEZ1 F	GATCTGAGAGCAATGGGATG	Solyc01g079390	qPCR
SIEZ1 R	CTAGGGGTTTCCATTCTGGT		qPCR
SIEZ2 F	GGGTGAACCTCGAAGAAGAT	Solyc03g044380	qPCR
SIEZ2 R	TACAGGGGACACTCCTTTCCA		qPCR
SIEZ3 F	GCAGTGATAGCGAGGAAGAA	Solyc02g093190	qPCR
SIEZ3 R	GACAAGAAGTGCCTAGCAA		qPCR
SIMSI1 F	CCTCTTGAGGATGCTGAGAA	Solyc01g104510	qPCR
SIMSI1 R	CGATTAACTCTCCATCGTG		qPCR
CBF1 F	AGGGGAATCAGGAAGAGGAA	Solyc03g026280.	qPCR
CBF1 R	GCCTCCAAGCAGAATCAGAG		qPCR