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

**Caracterização de uma variação genética natural de *Solanum
galapagense* controlando o comprimento do entrenó e arquitetura
foliar em tomateiro**

Frederico Almeida de Jesus

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

**Piracicaba
2015**

Frederico Almeida de Jesus
Engenheiro Agrônomo

**Caracterização de uma variação genética natural de *Solanum galapagense*
controlando comprimento do entrenó e arquitetura foliar em tomateiro**

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

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

Piracicaba
2015

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

Jesus, Frederico Almeida de

Caracterização de uma variação genética natural de *Solanum galapagense*
controlando o comprimento do entrenó e arquitetura foliar em tomateiro / Frederico
Almeida de Jesus. - - Piracicaba, 2015.

70 p. : il.

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

1. Variação genética natural 2. Desenvolvimento 3. *Solanum galapagense* 4. Caule
I. Título

CDD 635.642
J58c

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter enviado seu filho, Jesus Cristo, para morrer em favor dos nossos pecados, trazendo nova vida para aqueles que nele acreditam.

Não posso deixar de agradecer aos meus pais, pelo apoio às minhas escolhas, mesmo não as entendendo; e pelo amor que eles guardam por mim em seus corações e que aparece sutilmente a cada despedida.

Aos meus irmãos, Célio, Sebastião, Francisca, Sérgio e Celso, agradeço por continuarem torcendo pelo meu sucesso.

Pelo seu jeito espontâneo e extrovertido, agradeço à minha esposa, Soraya, que tem feito a minha vida melhor desde o início do nosso namoro, contrabalanceando o meu jeito sério e sem graça com seu humor e sua alegria.

Aos companheiros e amigos de longa caminhada, Alexandre e Evandro, pela amizade, por dividirmos o teto e as contas por 12 anos, pelas noites em frente à televisão assistindo filmes, tirando sarro um do outro, “meiando” o leite, discutindo com propriedade sobre elefantes africanos e indianos, pelas teorias sobre o Faustão e o Alexandre Marques e por tantas outras histórias. Uma grande amizade que a paciência e a cumplicidade ajudaram a construir.

Agradeço ao professor Lázaro pela oportunidade de trabalho e de crescimento pessoal, pelas discussões empolgadas e pelas conversas sobre o futuro.

Aos amigos do LCHDV: Ariadne, Cássia, Eloísa, Guilherme, Ivan, João Pedro, Jonata, Lucas, Máisa, Marcela, Mateus e Stevan. A eles agradeço pelos bate-papos despretensiosos, pela companhia nas paradas para café com bolo, queijo ou algum outro doce mineiro, pelas risadas. Também agradeço a eles pelas ajudas inestimáveis; e pelas discussões de resultados, por vezes felizes, por vezes tristes e pela torcida pela finalização deste trabalho.

Aos pós-doutorandos de nosso laboratório, Agustin, Joni e Lílian, pela convivência e pelas críticas construtivas direcionadas ao meu trabalho, que auxiliaram na melhoria do mesmo.

Aos amigos de outros laboratórios: Airton, Antoine, Éder, Geraldo, João e Mariana, também agradeço pelo companheirismo, dicas e discussões.

Agradeço ao professor Fábio Tebaldi, pela oportunidade de trabalho no período de transição entre o mestrado e o doutorado, por se importar com o andamento do meu trabalho, pelas conversas e pelo apoio.

Ao professor Daniel Scherer, agradeço pelas instruções nas duas oportunidades que tive de trabalhar ao seu lado como monitor de disciplinas, pelas conversas profissionais e pelo exemplo como professor.

A secretária do nosso programa de pós-graduação, Solizete, por ser sempre carinhosa, atenciosa e preocupada; pela eficiência e pela operação de pequenos milagres para que toda a burocracia que lhe cabe funcione bem em nosso programa.

Agradeço à ESALQ por me acolher e proporcionar um ambiente para abrir a minha mente em relação à pesquisa e ao meio acadêmico.

E agradeço a CAPES, pelo apoio financeiro durante a execução deste trabalho.

Muito obrigado!

“Nothing in biology makes sense except in the light of evolution.”

Theodosius Dobzhansky

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 O tomateiro.....	15
2.2 Micro-Tom: sistema modelo para estudos em tomateiro.....	17
2.3 Espécies relacionadas ao tomateiro no Arquipélago de Galápagos	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Material Vegetal	23
3.2 Cultivo das plantas para os experimentos.....	25
3.3 Medições de altura das plantas.....	26
3.4 Medições do comprimento dos entrenós.....	27
3.5 Análise da arquitetura foliar.....	28
3.6 Massa fresca acumulada.....	29
3.7 Análises de produtividade	29
3.8 Marcadores moleculares para o gene <i>Pts/KD1</i>	30
3.9 Análises moleculares	31
3.10 Sequenciamento genômico do duplo mutante <i>Gdw-Pts</i>	32
3.11 Análises estatísticas	32
4 RESULTADOS	35
4.1 Comprimento de entrenó de <i>S. galapagense</i>	35
4.2 Caracterização morfológica da isolinha <i>Gdw</i>	35
4.3 Caracterização agrônômica da isolinha <i>Gdw</i>	40
4.4 Descoberta que a isolinha <i>Gdw</i> é um duplo mutante	43
4.5 Sequenciamento do genoma do duplo mutante <i>Gdw-Pts</i>	44
4.6 Obtenção das novas isolinhas <i>Gdw</i> e <i>Pts</i>	45
4.7 Caracterização morfológica das novas isolinhas <i>Gdw</i> e <i>Pts</i>	48
5 DISCUSSÃO	53
5.1 Efeito do locus <i>Gdw</i> sobre altura das plantas	53
5.2 Efeito do locus <i>Gdw</i> sobre a arquitetura foliar.....	56
5.3 Efeito do locus <i>Gdw</i> sobre caracteres de interesse agrônômico.....	59
5.4 Seleção das novas isolinhas <i>Gdw</i> e <i>Pts</i>	59
6 CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS.....	63

RESUMO

Caracterização de uma variação genética natural de *Solanum galapagense* controlando comprimento do entrenó e arquitetura foliar em tomateiro

A variação genética natural é uma fonte rica em novos genes e alelos presentes nas espécies selvagens relacionadas às espécies cultivadas. O gênero *Solanum* seção *Lycopersicum* possui espécies que evoluíram em variados ecossistemas compreendidos na região que vai do sul do Equador até o norte do Chile. Tais espécies podem ser cruzadas com o tomateiro cultivado (*Solanum lycopersicum*) e vêm sendo exploradas como fonte de resistência a patógenos, a artrópodes e a estresses bióticos; além de possuírem características ligadas à qualidade do fruto, como alto teor de sólidos solúveis e presença de fitonutrientes. No entanto, tais espécies foram pouco exploradas até o momento quanto a variações alélicas afetando a estrutura da planta, como arquitetura de órgãos dos sistemas caulinares e radiculares. *S. galapagense*, uma espécie endêmica das Ilhas Galápagos, possui características únicas do gênero, como a presença de folhas bastante recortadas e entrenós curtos. As folhas recortadas de *S. galapagense* já haviam sido previamente ligadas a *Petroselinum* (*Pts*), um alelo com expressão aumentada de um gene da família *KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN* (*KNOX*). O maior recorte foliar causado por *Pts* deve-se a interferência na via de desenvolvimento do primórdio foliar, através de sua interação com *BIPINNATA* (*BIP*), um gene da família *BEL1-LIKE HOMEODOMAIN* (*BELL*), para o qual o tomateiro apresenta um alelo perda de função, *bip*. No presente trabalho é caracterizado o locus *Galapagos dwarf* (*Gdw*), uma variação genética natural oriunda de *S. galapagense*. Foram utilizadas em estudos comparativos a cultivar Micro-Tom (MT), uma variedade de tomateiro com pequeno porte e ciclo rápido, e isolinhas contendo o locus *Gdw* e os alelos *Pts*, *bip*. Nestes estudos, verificou-se que embora todos esses alelos afetem a arquitetura foliar em tomateiro, formando folhas mais recortadas, somente *Gdw* apresentou fenótipo de entrenó curto, característico do parental *S. galapagense*. Tal característica, além de ter valor no melhoramento para obtenção de plantas compactas, pode ter implicações adaptativas e ecológicas no contexto em que evoluiu *S. galapagense*. O locus *Gdw* foi mapeado no cromossomo 2 de tomateiro, e no futuro, pretendemos clonar o gene *GDW*.

Palavras-chave: Variação genética natural; Desenvolvimento; *Solanum galapagense*; Caule

ABSTRACT

Characterization of a natural genetic variation from *Solanum galapagense* affecting internode length and leaf dissection on tomato

Natural genetic variation is a rich source of new genes or alleles, harbored in wild relatives of cultivated plants. The genus *Solanum* section *Lycopersicum* has members who had evolved in several ecosystems, extending from southern Ecuador through northern Chile. These species can be hybridized with the cultivated tomato (*Solanum lycopersicum*) and have been exploited to great extent in tomato breeding, as source of resistance or tolerance to pest, diseases and abiotic stresses. Moreover, wild species bear quality fruit traits that can improve solids soluble content and add phytonutrients into cultivated tomato. However, allelic variations affecting plant architecture coming from wild species have been underexplored. *S. galapagense*, an endemic species from Galápagos Islands, owns unique features, such as highly subdivided leaves and short internodes. The increased-leaf-dissection phenotype of *S. galapagense* was previously associated with the higher expression of the causative allele *Petroselinum* (*Pts*), a member of the *KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN* (*KNOX*) gene family. *Pts* affects the development pattern of leaf primordium, increasing leaf dissection through its interaction with *BIPINNATA* (*BIP*), a *BEL1-LIKE HOMEODOMAIN* (*BELL*) gene. Also, tomato has a *BIP* knockout allele, which is present in the *bip* mutant. The present work characterizes the *Galapagos dwarf* (*Gdw*) locus, a natural genetic variation from *S. galapagense*. Comparative analysis were made among Micro-Tom (MT), a *S. lycopersicum* cultivar with small size and short life cycle, and its near-isogenic lines (NILs) harboring *Gdw*, *Pts* and *bip* alleles. Although we verified that all these alleles affect leaf architecture, leading to more dissected leaves, only *Gdw* showed short internodes, which is typical from its parental *S. galapagense*. Besides its worth for the development of compact plants through breeding, such trait could be adaptive and ecologically meaningful in the evolutionary history of *S. galapagense*. The *Gdw* locus was mapped on the chromosome 2, and in the future we intent to clone the causative gene *GDW*.

Keywords: Natural genetic variation; Development; *Solanum galapagense*; Stem

1 INTRODUÇÃO

Solanum galapagense é uma espécie selvagem relacionado ao tomateiro, endêmica das Ilhas Galápagos. Essa espécie, antes denominada *Lycopersicon cheesmanii* f. *minor* devido ao seu nanismo, possui alto grau de dissecação foliar, característica até então associada exclusivamente à presença do alelo *Petroselinum* (*Pts*), descrito no início da década de 80 (RICK, 1980). Mais recentemente, Kimura *et al.* (2008) identificaram o gene *PETROSELINUM* (*PTS/KD1*) como pertencente à família *KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN* (*KNOX*). Em nosso laboratório, um locus ainda não descrito, responsável por reduzir o comprimento dos entrenós e aumentar a complexidade do limbo foliar, foi isolado desta mesma espécie, sendo nomeado *Galapagos dwarf* (*Gdw*) e introgridido no tomateiro domesticado (*S. lycopersicum*), cultivar Micro-Tom.

O objetivo deste trabalho foi estudar a base genética da arquitetura foliar e do nanismo de *S. galapagense* caracterizando o novo locus *Gdw*, através da análise de comparativa de seu nanismo e arquitetura foliar com os mutantes *Pts* e *bip*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O tomateiro

As espécies de tomateiro são originárias do noroeste da América do Sul; sendo encontradas no norte do Chile; ao longo da costa, nos vales e nos Andes do Peru; no sul do Equador; e no arquipélago de Galápagos (WARNOCK, 1991) (Figura 01).

Figura 1 **Distribuição geográfica das espécies de tomateiro.** O mapa ilustra a região de origem das espécies de tomateiro. Fonte: WARNOCK, 1991

Pertencem à família Solanaceae, e na revisão taxonômica mais recente, Peralta *et al.* (2008) incluíram-nas dentro do gênero *Solanum* seção *Lycopersicum*, reconhecendo 12 espécies selvagens além da espécie cultivada, *Solanum lycopersicum* (Figura 02). Todas as espécies são diploides ($2n=2x=24$) e apresentam sintenia com a espécie cultivada (CHETELAT; JI, 2007), podendo obter-se progênie férteis a partir de cruzamentos com *S. lycopersicum* (RICK, 1979).

Figura 2 **Frutos típicos representando cada uma das 13 espécies de tomateiro.** A nomenclatura binomial das espécies está de acordo com o tratamento taxonômico mais recente. Fonte: Modificado de LI; CHETELAT, 2010

Quanto ao centro de domesticação do tomateiro, há um debate sobre a sua localização, estando em disputa duas hipóteses: uma considerando a região dos Andes e outra a Mesoamérica (RICK; HOLLE, 1990; PERALTA *et al.*, 2008). Candole (1886) propôs o Peru como centro de domesticação, considerando a ausência da palavra tomate em línguas asiáticas antigas e que os primeiros registros de tomateiro realizados por botânicos europeu foram de plantas recebidas deste país. Jenkins (1948) propôs o México como centro de domesticação, baseado na utilização do tomateiro na culinária dos povos nativos mexicanos e pelos nomes por eles dados para se referir à planta e supondo a dispersão do tomateiro da região dos Andes até alcançar o México, como erva-daninha.

Um estudo de genética de populações com base em dados de marcadores moleculares e caracteres morfológicos suporta a hipótese de domesticação no México (BLANCA *et al.*, 2012). A espécie *S. pimpinellifolium* teria dado origem ao tomate-cereja selvagem (*S. lycopersicum* var. *cerasiforme*) na região dos Andes; e partir da dispersão desta, passando por redução da variabilidade por deriva gênica e fixação de alelos devido a autofecundação; esta chegaria ao México, onde teria sido domesticada, dando origem ao tomateiro cultivado (*S. lycopersicum* var. *lycopersicum*) (BLANCA *et al.*, 2012; RICK; FOBES, 1975 b).

O seu fruto, o tomate, é uma hortaliça de grande popularidade no mundo; parte integrante dos mais variados pratos, sendo preparado de diversas formas e constituindo matéria-prima importante para indústria de processamento. Devido ao

seu alto consumo, o tomate tornou-se uma das principais fontes de vitaminas e minerais na dieta humana (ESQUIÑAS-ALCAZAR; NUEZ, 1995; RICK, 1978).

Além de sua importância alimentar e econômica, o tomateiro é uma espécie de indiscutível relevância para a comunidade científica, por apresentar padrões de desenvolvimento ausentes no modelo *Arabidopsis thaliana*, como formação de frutos carnosos climatéricos, formação de folhas complexas, presença de tricomas glandulares multicelulares e ramificação simpodial de seus brotos (CAMPOS *et al.*, 2010; RANJAN *et al.*, 2012).

Ao longo das décadas, diversas ferramentas foram desenvolvidas para o tomateiro e estão disponíveis para a comunidade científica. Dentre elas: a coleção de mutantes e variações genéticas naturais do Tomato Genetic Resource Center (TGRC) (<http://tgrc.ucdavis.edu>); o mapa físico de ligação saturado com marcadores moleculares (TANKSLEY *et al.*, 1992; <http://solgenomics.net>); as introgression lines (ILs) com diversas espécies selvagens, com maior destaque para as ILs de *S. pennellii* (ESHED; ZAMIR, 1995); o genoma sequenciado (THE TOMATO GENOME CONSORTIUM, 2012); e protocolos eficientes de transformação genética (PINO *et al.*, 2010).

Com estas ferramentas e a possibilidade de explorar a ampla diversidade genética presente nas espécies selvagens, o tomateiro constitui-se um excelente modelo para estudos evolutivos e de desenvolvimento (ICHIHASHI; SINHA, 2014).

Além de sua aplicação em ciência básica, as espécies selvagens de tomateiro vêm sendo utilizadas no melhoramento da espécie cultivada, como fonte de resistência a doenças (CATANZARITI *et al.*, 2015) e insetos (LUCATTI *et al.*, 2013), fonte de tolerância a estresses abióticos (ARMS *et al.*, 2015) e no aumento da qualidade organoléptica (FRIDMAN *et al.*, 2000) e nutricional (SESTARI *et al.*, 2014) do tomate.

2.2 Micro-Tom: sistema modelo para estudos em tomateiro

No Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal (LCHDV), estuda-se os aspectos do desenvolvimento do tomateiro utilizando a cultivar (cv.) Micro-Tom (MT), a qual possui porte reduzido e hábito de crescimento determinado (MARTÍ *et al.*, 2006).

A cultivar MT foi desenvolvida com propósito ornamental e lançada em 1989, pelo programa de melhoramento de tomate da University of Florida (SCOTT; HARBAUGH, 1989). No final da década de 1990, foi proposta como modelo para o estudo da genética do tomateiro; devido ao seu porte reduzido e ao seu menor ciclo em relação às demais cultivares. Essas características da cultivar também facilitariam a triagem de fenótipos mutantes em grandes populações mutagenizadas artificialmente (MEISSNER *et al.*, 1997).

Martí *et al.* (2006) caracterizando a cultivar MT, demonstraram que o seu nanismo deve-se, parcialmente, a deficiência na síntese do hormônio vegetal brassinoesteróide. Ela carrega o alelo recessivo *dwarf*, que codifica uma versão defectiva da enzima 6-deoxocastasterone oxidase (citocromo P450; grupo CYP85), responsável pela conversão de 6-deoxocastasterona em castasterona (BISHOP *et al.*, 1999). Martí *et al.* (2006) também provaram que o hábito de crescimento determinado da cultivar deve-se a presença do alelo recessivo *self-pruning*. O gene funcional *SELF-PRUNING* é um gene regulatório da família *CETS*, homólogo ao gene *TERMINAL FLOWER* de *Arabidopsis thaliana*, responsável pela repressão do florescimento (LIFSCHITZ *et al.*, 2006).

No LCHDV, com o intuito de estudar mutantes de tomateiro em um mesmo background genético, as mutações previamente disponíveis em outros acessos foram introgridas na cv. MT, possibilitando a avaliação de duplos e triplos mutantes (CARVALHO *et al.*, 2011). As espécies selvagens também são cruzadas com a cv. MT, em busca de novos loci que alterem o padrão de desenvolvimento na espécie cultivada; direcionando esforços em cruzamentos com as espécies *S. galapagense*, *S. habrochaites*, *S. pennellii* e *S. pimpinellifolium*.

Recentemente, o LCHDV isolou e transferiu para MT loci de *S. galapagense* até então não descritos, controlando a formação de tricomas (VENDEMIATTI, 2015) e reduzindo o porte das plantas (GOLDENBERG, 2009).

2.3 Espécies relacionadas ao tomateiro no Arquipélago de Galápagos

O arquipélago de Galápagos é constituído de ilhas de origem vulcânica, estendendo-se ao longo da linha equatorial, aproximadamente 1000 quilômetros a oeste do Equador (DARWIN *et al.*, 2003).

Há diferenças ambientais consideráveis entre a região costeira e o interior das ilhas. A costa das ilhas, possui menor altitude, é árida, quente, com pouca formação de solo e presença de poucas plantas xerófitas; enquanto no interior da ilha, nas regiões acima de 300 metros de altitude, o ar é úmido, mais nublado, as temperaturas são amenas, há maior depósito de solo e a vegetação é mais exuberante (DARWIN, 1839; RICK, 1956; RICK; FOBES, 1975 a).

De acordo com a reclassificação mais recente, as ilhas abrigam duas espécies endêmicas relacionadas ao tomateiro, *S. cheesmaniae* e *S. galapagense* (DARWIN *et al.*, 2003). Elas foram descritas pela primeira vez pelo botânico Joseph Dalton Hooker, em 1847, como *Lycopersicon peruvianum* var. *parviflorum* (= *S. cheesmaniae*), *Lycopersicon pimpinellifolium* (= *S. cheesmaniae* “forma Academy Bay”) e *L. esculentum* var. *minor* (= *S. galapagense*), em seu trabalho intitulado “An enumeration of the plants of the Galapagos Archipelago with descriptions of those which are new” (PERALTA *et al.*, 2008).

Os espécimes faziam parte de uma coleção de plantas coletadas por Charles Darwin, em sua passagem pelo Arquipélago de Galápagos entre 16 de setembro e 20 de outubro de 1835, durante a viagem a bordo do H.M.S. Beagle (PERALTA *et al.*, 2008; RICK, 1956).

Em 1971, as plantas descritas por Joseph Hooker como *L. pimpinellifolium* e *L. esculentum* var. *minor*, foram reclassificadas por Charles Rick como *L. cheesmanii* e *L. cheesmanii* f. *minor*, respectivamente (PERALTA *et al.*, 2008). Até a mais recente classificação, as duas espécies de tomateiro de Galápagos, *S. cheesmaniae* e *S. galapagense*, eram consideradas uma única espécie.

A espécie *S. cheesmaniae* é encontrada com maior frequência no interior das ilhas, enquanto *S. galapagense* é encontrada quase exclusivamente na costa (DARWIN *et al.*, 2003; PERALTA *et al.*, 2008; RICK; BOWMAN, 1961). Nesse ambiente, exposta à água do mar, *S. galapagense* desenvolveu altos níveis de tolerância à salinidade (RUSH; EPSTEIN; 1976).

Devido à similaridade genética constatada, acredita-se que os tomateiros de Galápagos tenham se originado a partir de acessos costeiros de *S. pimpinellifolium* do norte do Peru (RICK; FOBES, 1975 a). O tomateiro teria alcançado a ilha pela ação de pássaros ou pelo fluxo da Corrente de Humboldt (RICK, 1966).

As espécies de tomateiro de Galápagos são as que apresentam menor diversidade genética quando comparadas as demais espécies (RICK; FOBES, 1975

a). A variabilidade genética intrapopulacional é praticamente nula, havendo maior variabilidade interpopulacional; e *S. galapagense* apresenta menor diversidade genética que *S. cheesmaniae* (RICK; FOBES, 1975 a).

Apesar da baixa diversidade genética das espécies, algumas características já foram exploradas no melhoramento da espécie cultivada. Como por exemplo, a mutação *jointless-2*, originária de *S. cheesmaniae*, foi incorporada em cultivares de tipo industrial de *S. lycopersicum*, destinados à produção de molhos e polpas (TANKSLEY; KHUSH, 2003). Em homozigose, *jointless-2* impede a formação da zona de abscisão do pedúnculo do fruto, permitindo a colheita mecanizada dos tomates. A identidade molecular do gene ainda é desconhecida (BUDIMAN *et al.*, 2004). Também já foram produzidas linhagens de *S. lycopersicum* com alto teor de sólidos solúveis na polpa dos frutos, a partir de cruzamentos com *S. galapagense* (TRIANO; ST. CLAIR, 1995). A alta tolerância de *S. galapagense* à salinidade (RUSH; EPSTEIN, 1976; RUSH; EPSTEIN, 1981 a) também foi incorporada em linhagens da espécie cultivada (RUSH; EPSTEIN, 1981 b).

Charles Rick, estudando os tomateiros de Galápagos, ficou intrigado com os fenótipos peculiares presentes nestas espécies, como os frutos alaranjados, entrenós curtos, densa pilosidade nas folhas e no caule, folhas altamente elaboradas e sementes pequeninas e de difícil germinação (RICK, 1956). Mais tarde, o próprio Charles Rick associou uma destas características a um gene, localizado no cromossomo seis e de herança semidominante, responsável pelo alto nível de complexidade foliar presente em *S. galapagense*. Esse gene foi nomeado *Petroselinum* (*Pts*), devido à semelhança das folhas de *S. galapagense* com as de salsinha (*Petroselinum crispum*) (RICK, 1980). O fruto alaranjado de *S. cheesmaniae* e *S. galapagense* deve-se a presença do alelo *Beta* (STOMMEL; HAYNES; 1994), uma variação genética natural que aumenta a expressão do gene *LYCOPENE BETA CYCLASE* (*Cyc-B*), causando a conversão de quase todo licopeno no fruto em β -caroteno (RONEN *et al.*, 2000). O alelo *Beta* também está presente em outras espécies selvagens que possuem frutos verdes, e ao serem cruzadas com o tomateiro cultivado, produzem híbridos com frutos alaranjados (LINCOLN; PORTER, 1950).

Os outros fenótipos destas espécies ainda permanecem pouco estudados. No LCHDV, retomou-se o estudo de duas destas características, a presença de tricoma em grande quantidade nas folhas (VENDEMIATTI, 2015) e os entrenós curtos. O

presente trabalho trata da caracterização fenotípica e agronômica da linhagem denominada *Galapagos dwarf* (*Gdw*), a qual possui o locus responsável pelo porte baixo de *S. galapagense* introgrado na cultivar MT.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal, do Departamento de Ciências Biológicas (LCB), na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

3.1 Material Vegetal

Os genótipos de tomateiro utilizados neste trabalho foram o controle MT; e as isolinhas *bipinnata* (*bip*); *Galapagos dwarf* (*Gdw*), e *Petroselinum* (*Pts*) (Tabela 01).

As isolinhas foram obtidas a partir do método de seleção recorrente. Após o cruzamento do genótipo doador da mutação de interesse com a cv. MT, as progênies em que se detectava a mutação de interesse eram retrocruzadas com MT. Após seis gerações de retrocruzamentos (BC_6), as plantas que mantinham a mutação de interesse foram autofecundadas no mínimo mais seis vezes (F_6), gerando o estoque de sementes de cada isolinha (BC_6F_n) (Figura 05).

Tabela 1 **Genótipos utilizados no presente trabalho.** Descrição dos fenótipos causados pela presença do alelo mutante em homozigose nas isolinhas MT. Origem refere-se à identificação do acesso na coleção do TGRC, que foi utilizado como genótipo doador da mutação de interesse. *At* = *Arabidopsis thaliana*. *BELL* = *BEL1-LIKE*. *SAW* = *SAWTOOTH*. *KNOX* = *KNOTTED1-LIKE HOMEOBOX*

Genótipo	Efeito/Função Gênica	Origem	Referências
Micro-Tom (MT)	Cultivar de <i>S. lycopersicum</i> .	LA3911	Scott; Harbaugh, 1989
<i>bipinnata</i> (<i>bip</i>)	Folhas com maior número de folíolos primários. Fator de transcrição do tipo <i>BELL</i> (<i>Solyc02g089940</i>), homólogo a <i>AtSAW1</i> e <i>AtSAW2</i> .	LA3765	Kimura <i>et al.</i> , 2008
<i>Galápagos dwarf</i> (<i>Gdw</i>)	Plantas com menor porte e bordas das folhas mais recortadas.	LA1401	-
<i>Petroselinum</i> (<i>Pts</i>)	Folhas mais recortadas nas bordas, com maior número de folíolos primários, presença de folíolos secundários. Fator de transcrição <i>KNOX</i> (<i>Solyc06g072480</i>), homólogo a <i>AtKNATM</i> .	LA1401	Kimura <i>et al.</i> , 2008

O fenótipo que levou a introgressão do locus *Gdw* foi encontrado em um cruzamento realizado entre *S. galapagense* LA1401 (Figura 03) e a cv. MT. Plantas com porte extremamente pequeno foram encontradas em uma população BC₁ (Figura 04), e a partir destas plantas, foi realizada a introgressão de *Gdw* em MT (GOLDENBERG, 2009) (Figura 05).

Figura 3 **Planta de *Solanum galapagense* LA1401 cultivada em casa de vegetação.** A foto principal mostra a planta inteira, crescendo em vaso de 10 L, com as primeiras flores visíveis. Detalhes mostram a folha e os frutos. Na foto inferior à direita, comparação com fruto maduro da cv. MT. Barra = 1 cm

Figura 4 **Fenótipo que originou a introgressão do locus *Gdw*.** Foto mostra uma planta MT x LA1401 BC₁F_n. Plantas como esta foram utilizadas para a introgressão de *Gdw*. Fonte: Lázaro E.P. Peres

Figura 5 **Método de introgressão.** O diagrama apresenta o método de introgressão. A cada geração F₂, plantas com fenótipo de porte pequeno eram novamente cruzadas com MT

3.2 Cultivo das plantas para os experimentos

Sementes de cada um dos genótipos foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio comercial (5% NaClO v/v), sendo mantidas em agitação em um béquer por 10 minutos. Após a desinfestação, as sementes foram recolhidas em uma peneira plástica e lavadas com água destilada. Em seguida, as sementes foram dispostas em caixas de germinação preta, sobre papel filtro umedecido com 10 mL de água destilada. As caixas foram mantidas em sala climatizada, com temperatura controlada de 25°C ± 2°C. Após o aparecimento da radícula, cada semente foi transferida para vasos individuais, com capacidade para 150 mL de substrato.

O substrato foi preparado em uma proporção de 1:1 de vermiculita expandida e substrato comercial Basaplant Hortaliças (Base Agro). Para cada litro do substrato, foi adicionado 4g de calcário e 8g de NPK 10-10-10.

Os vasos foram mantidos na casa de vegetação do LCHDV, que apresenta irrigação automatizada e controle de temperatura.

Adubação de cobertura foi realizada em torno de 30 dias após a semeadura (DAS), aplicando aproximadamente 1g de NPK 10-10-10 por planta. Uma segunda adubação foi realizada após o pegamento dos frutos, em torno de 75 DAS, para os experimentos de caracterização agrônômica.

Sementes de plantas de porte grande foram semeadas diretamente em vasos com capacidade de 250 mL, contendo substrato preparado conforme citado acima, exceto para a quantidade de NPK 10-10-10, em que foi utilizado 4g ao invés de 8g. De 15 a 20 sementes foram colocadas por vaso.

Quando as plantas apresentavam 2 pares de folhas verdadeiras visivelmente expandidas, elas foram individualizadas e transferidas para vasos com 150 mL de substrato. Após 1 mês, as plantas foram novamente transferidas para vasos com capacidade de 10 L de substrato. Para manter o caule das plantas ereto, uma vara de bambu foi colocada no vaso e utilizada como tutor, na qual o caule foi amarrado com fitilho, sendo eliminadas as brotações laterais semanalmente.

3.3 Medições de altura das plantas

Para plotagem da curva de crescimento, a altura das plantas foi medida no caule primário, a cada 5 dias, utilizando paquímetro digital, sendo o período de avaliação de 20 até 65 DAS.

Entre 20-40 DAS, as medições foram tomadas a partir dos cotilédones (ou da cicatriz cotiledonar) até o meristema apical caulinar. Depois deste período, as plantas emitiram as primeiras inflorescências. Entre 45-65 DAS, as medidas foram tomadas da cicatriz cotiledonar até o último entrenó abaixo da primeira inflorescência.

As repetições do experimento de curva de crescimento foram representadas por 10 plantas dos genótipos MT e *Gdw*.

Outro experimento foi conduzido, este para mensuração da altura final das plantas. Neste novo experimento, utilizando um paquímetro digital, foi medido a

altura do caule principal, a altura do caule primário e o comprimento do ramo lateral mais vigoroso (Figura 06). As medidas foram tomadas em plantas com idade de 65 DAS.

Figura 6 **Medições do caule.** O diagrama apresenta os pontos em que foram tomadas as medidas de altura do caule principal, altura do caule primário e comprimento do ramo lateral (RL). Fonte: Modificado de Vicente *et al.* (2015)

Neste experimento as repetições foram constituídas de 10 plantas dos genótipos, MT, *bip*, *Gdw* e *Pts*.

3.4 Medições do comprimento dos entrenós

O comprimento dos entrenós foi medido do primeiro ao quinto entrenó, em plantas com idade de 100 DAS, utilizando paquímetro digital.

As repetições deste experimento foram representadas por 10 plantas dos genótipos MT, *Gdw* homozigoto (*Gdw/Gdw*) e *Gdw* heterozigoto (*Gdw/+*).

As plantas do genótipo *Gdw* heterozigoto são híbridos de geração F_1 de cruzamentos realizados entre MT e *Gdw*.

Em outro experimento, foi medido o comprimento de entrenós de forma aleatória, em plantas adultas de genótipos com porte grande, utilizando paquímetro digital.

Neste experimento, as repetições foram representadas por 30 entrenós de plantas de *S. lycopersicum* cv. Santa Clara, *S. galapagense* LA1401 e *S. pennellii* LA0716.

3.5 Análise da arquitetura foliar

O tomateiro possui folhas complexas, ou seja, sua lâmina foliar é subdividida em folíolos. A análise da arquitetura foliar foi constituída por contagem do número de folíolos primários, folíolos secundários e folíolos intercalares presentes em cada folha (Figura 07); medição da área e do perímetro foliar; e pela determinação do índice de complexidade foliar.

As plantas foram trazidas para sala de estudos para digitalização das folhas. Um retângulo preto foi impresso e medido no tamanho de três centímetros de comprimento para ser utilizado como escala. A escala foi fixada no vidro da impressora/scanner com fita adesiva transparente. As folhas foram destacadas manualmente do caule das plantas e digitalizadas (Figura 07) na impressora modelo Laser Jet Pro CM1415fnw color MFP (Hewlett-Packard – HP). Após a digitalização da folha inteira, os folíolos laterais primários e os folíolos secundários foram cortados da raque com auxílio de um bisturi, e digitalizados (Figura 07). A imagem dos folíolos separados foi utilizada para contagem do número de folíolos, cálculo da área e perímetro das folhas, utilizando o programa Image J.

Figura 7 **Identificação dos tipos de folíolos presentes nas folhas de tomateiro.** A foto a esquerda mostra uma folha intacta. A foto da direita mostra uma folha com seus folíolos destacados. Imagens com os folíolos destacados foram utilizadas para cálculo da área e perímetro foliar

O índice de complexidade foliar (ICF) foi determinado utilizando a fórmula:

$$ICF = [(\text{perímetro foliar}^2)/(4\pi \times \text{área foliar})]$$

(BAI *et al.*, 2010; BILSBOROUGH *et al.*, 2011)

No primeiro experimento de análise da arquitetura foliar, foram coletadas da primeira até a sétima folha, de plantas com idade de 55 DAS. A repetição foi composta por cinco plantas dos genótipos MT, *Gdw/Gdw*, *Gdw/+*.

No segundo experimento, a quinta folha de plantas com idade de 65 DAS foi avaliada, e a análise composta por 10 repetições dos genótipos MT, *bip*, *Gdw* e *Pts*.

3.6 Massa fresca acumulada

O acúmulo de massa fresca foi determinado separando o caule e as folhas de plantas com idade de 100 DAS. A massa fresca foi medida utilizando balança de precisão.

A repetição deste experimento foi composta por 30 plantas dos genótipos MT, *Gdw/Gdw* e *Gdw/+*.

3.7 Análises de produtividade

A análise de produtividade foi composta pela contagem do número de frutos produzidos por planta; determinação do peso médio por fruto; e medição da produtividade por planta. Os frutos foram colhidos de plantas com idade de 100 DAS. Em todas as análises, os frutos maduros e os frutos verdes foram computados separadamente.

Todos os frutos de cada planta foram coletados e contados. Para medir a produtividade, todos os frutos produzidos por planta foram colocados em uma balança de precisão. O peso médio dos frutos foi determinado por cálculo: (peso total de frutos)/(número de frutos produzidos).

A repetição deste experimento foi composta por 30 plantas dos genótipos MT, *Gdw/Gdw* e *Gdw/+*.

3.8 Marcadores moleculares para o gene *Pts/KD1*

Para distinção entre o alelo *Pts* de *S. galapagense* e o alelo *KD1* de *S. lycopersicum*, foi desenhado um par de primers na região promotora do gene *PTS/KD1* (Solyc06g072480), flanqueando o local onde se encontra o polimorfismo entre os dois alelos.

Primer *Pts*-Promotor Direto – 5'...**GGGGGCTAGATGGTATGAGTT**...3'

Primer *Pts*-Promotor Reverso – 5'...**GCAAGAGTCCGTGAACCAAT**...3'

O par de primers *Pts*-Promotor gera um produto de 1427 nucleotídeos (nt) para o alelo *KD1* e um produto de 1426 nt para o alelo *Pts*. O produto de PCR deve ser sequenciado para diferenciar a variação genética natural (*Pts*) e o alelo comum da espécie cultivada (*KD1*). O alelo *KD1* possui uma adenina (A) na posição -1278 do promotor, a qual está ausente no alelo *Pts*, na posição -1230.

O sequenciamento do produto de PCR deste par de primers foi realizado no Laboratório de Genômica e Biologia Molecular de Plantas, do LCB, ESALQ.

Para diferenciar de forma mais prática os alelos *Pts* e *KD1*, sem necessidade de posterior sequenciamento do produto de PCR, um marcador tipo Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) foi desenvolvido. Em outra localização do promotor do gene *PTS/KD1*, há uma deleção de 47 nt no alelo selvagem *Pts*, a qual não está relacionada ao fenótipo induzido pelo alelo, e que torna o seu promotor mais curto. Flanqueando essa região foi desenhado um par de primers.

Primer *Pts*-CAPS Direto – 5'...**AGGAAGTGATTGACCCATGC**...3'

Primer *Pts*-CAPS Reverso – 5'...**CCCCAAACACCACTATCTAAGC**...3'

O par de primers *Pts*-CAPS gera um produto de 408 nt para o alelo *KD1* de *S. lycopersicum* e um produto de 362 nt para o alelo *Pts* de *S. galapagense*. O promotor de *KD1* possui uma inserção de 47 nt, onde há um sítio **GATTC** que é reconhecido pela enzima *Pfel* (*TfiI*), o qual está ausente no promotor de *Pts*. Após a digestão, o produto de *KD1* é dividido em dois fragmentos de 115 nt e 293 nt, enquanto o produto do alelo *Pts* permanece intacto, com 362 nt.

3.9 Análises moleculares

Foi isolado DNA genômico de tecidos foliares jovens (FULTON *et al.*, 1995). O DNA foi eluído em tampão TE (10mM Tris-Cl, pH 8.0; 1mM EDTA).

Os reagentes para PCR foram aliquotados para um volume final de 12 μ L, contendo: 5.5 μ L de água deionizada; 1.2 μ L de tampão *Taq* KCl (10x); 0.2 μ L de DNTP (10mM); 1.5 μ L de $MgCl_2$ (25mM); 0.25 μ L de primer direto (10pM); 0.25 μ L de primer reverso (10pM); 0.1 μ L da enzima *Taq* DNA polimerase; e 3.0 μ L de DNA genômico diluído 10 vezes (1:10) em TE.

Para o par de primers Pts-Promotor, os seguintes parâmetros de reação foram estabelecidos para cada passo: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos (min); desnaturação a 95°C por 30 segundos (s); anelamento a 58°C por 30s; extensão a 72°C por 1 min; 35 ciclos; e extensão final a 72°C por 10 min.

Já para o par de primers Pts-CAPS, para cada passo foram estabelecidos os seguintes parâmetros de reação: desnaturação inicial a 95°C por 2 min; desnaturação a 95°C por 30s; anelamento a 62°C por 30s; extensão a 72°C por 15s; 35 ciclos; e extensão final a 72°C por 10 min.

Para a reação de digestão do produto de PCR do primer Pts-CAPS, os reagentes foram aliquotados para um volume final de 10 μ L, contendo: 1.0 μ L de Tampão Orange (10x); 0.1 μ L da enzima *Pfe*-I; 0.9-5.9 μ L de água deionizada; e 3.0-8.0 μ L da PCR. Houve variação no volume aliquotado de água deionizada e de PCR em função da concentração estimada de DNA presente por μ L da PCR. A concentração de DNA foi estimada baseando-se no ladder.

O resultado do isolamento de DNA, das PCRs e das digestões foi visualizado em gel de agarose, preparado com tampão TAE (1x). Em cada poço do gel de agarose, foi carregado 10 μ L da seguinte solução: 7 μ L de água deionizada, 2 μ L de SYBR Gold (Invitrogen) diluído (6x); e uma alíquota de 1 μ L de DNA isolado ou de PCR. Para digestão, em cada reação foi aliquotado 2 μ L de SYBR Gold diluído (6x) no volume total de digestão, e todo o volume (12 μ L) foi carregado por poço. Em todo gel, um poço foi carregado com uma alíquota de 10 μ L ladder diluído.

As corridas foram realizadas em cubas de eletroforese contendo tampão TAE (1x), com duração de 45 min. Para os géis de DNA e de PCRs, a concentração de

agarose utilizada foi de 1.0%, aplicando-se 7V/cm; enquanto para géis de digestão, a concentração foi de 1.7%, aplicando-se 5V/cm.

Os géis foram visualizados em luz ultravioleta e fotografados com câmera digital.

3.10 Sequenciamento genômico do duplo mutante *Gdw-Pts*

O DNA genômico isolado de plantas de *Gdw-Pts* foi submetido ao sequenciamento de genoma total no Marshal University Genomics Core Facility, em parceria com o Prof. Dr. Vagner Benedito, da West Virginia University. A plataforma de sequenciamento utilizada foi Illumina HiSeq 2000 (Illumina). Foram gerados 15.6 Mb (milhões de bases) de dados brutos (90,4% $\geq$ Q30), alcançando uma cobertura de 16x o genoma do tomateiro.

As análises de bioinformática foram realizadas pela aluna de mestrado Eloisa Vendemiatti, que realizou estágio no West Virginia Genomics Core Facility, utilizando computadores High Performance.

A montagem do genoma de referência de *Gdw-Pts* consistiu no alinhamento das sequências de *S. galapagense* LA1401, MT (Wageningen University, Holanda) e *Gdw-Pts*, utilizando como base comparativa os dados genômicos de *S. lycopersicum* cv. Heinz 1706 com SNPs de MT (Osaka Prefecture University, Japão), a fim de buscar regiões de introgressões de SNPs de *S. galapagense* em MT.

3.11 Análises estatísticas

Foi utilizado o Delineamento Inteiramente Aleatorizado em todos os experimentos conduzidos.

Previamente, foi verificado se os dados experimentais apresentavam distribuições adequadas ao modelo linear de efeitos fixos. As suposições de normalidade, independência e igualdade da variância dos resíduos foram verificadas, para posterior uso da Análise da Variância (ANOVA).

Quando alguma das suposições foi violada, os dados brutos foram transformados por log (x) e verificados novamente quanto ao atendimento das mesmas. Estando os dados transformados readequados às suposições, eles foram

submetidos à ANOVA. Quando houve detecção do efeito de algum genótipo sobre a média, foi realizado o teste de Tuckey para comparação de médias.

No caso da não adequação dos dados após a transformação, foi realizada análise não paramétrica de Kruskal-Wallis. Quando detectado que ao menos um dos genótipos diferia dos demais, foi realizada a comparação múltipla de Siegel-Castellan, para diferenciação dos genótipos.

O programa R (R CORE TEAM, 2014) foi utilizado na verificação da adequação dos dados ao modelo, nas transformações e na ANOVA. Para análise de Kruskal-Wallis foi utilizado o programa Action (EQUIPE ESTATCAMP, 2014).

4 RESULTADOS

4.1 Comprimento de entrenó de *S. galapagense*

A fim de confirmar a observação feita por Charles Rick sobre os entrenós curtos da espécie *S. galapagense* (RICK, 1956), o comprimento destes foi medido, e comparado com os valores medidos em *S. lycopersicum* cv. Santa Clara e em *S. pennellii* (Figura 08).

Figura 8 **Comprimento de entrenós em três espécies de tomateiro.** Comprimento dos entrenós em plantas adultas. n = 30. Genótipos seguidos de letras distintas diferem ao nível de significância de 5%.

O comprimento médio de entrenós foi de 29.77 mm, 49.03 mm e 72.83 mm, para *S. galapagense*, *S. pennellii* e *S. lycopersicum*, respectivamente; confirmando a observação de Charles Rick (RICK, 1956).

4.2 Caracterização morfológica da isolinha *Gdw*

Primeiramente, confirmou-se que as plantas *Gdw* eram consistentemente menores que o controle MT (Figura 09).

Plantas *Gdw* apresentaram-se sempre menores que o controle MT na análise temporal de crescimento (Figura 10), excetuando-se aos 20 dias.

Figura 9 **Fenótipo das plantas com 62 dias de idade.** O locus *Galápagos dwarf* (*Gdw*) foi introgridido na cultivar MT e afeta a altura das plantas, tanto em homozigose (planta identificada *Gdw*) como em heterozigose (planta identificada *Gdw/+*). Barra = 10 cm. Foto: Stevan Bordignon

Figura 10 **Curva de crescimento das plantas.** Altura média do caule primário das plantas. No período de 20 a 40 dias, as medidas foram tomadas a partir dos cotilédones (ou da cicatriz dos cotilédones) até o meristema caulinar apical. Depois desse período, as plantas emitiram as primeiras inflorescências. No período entre 45 e 65 dias, as medidas foram tomadas da cicatriz dos cotilédones até o último entrenó abaixo da primeira inflorescência. $n=10$. Barra de erro indica o erro padrão da média. Médias seguidas de um asterisco (*) diferem ao nível de significância de 5%. Médias seguidas de três asteriscos (***) diferem ao nível de significância de 0,1%. Médias seguidas de ns (não significativo) não diferem entre si

Observou-se que o tamanho reduzido de *Gdw* deve-se ao menor comprimento dos entrenós de seu caule primário. Todos os entrenós de *Gdw* homozigoto (*Gdw/Gdw*) foram menores que MT, excetuando-se o segundo entrenó. *Gdw* heterozigoto (*Gdw/+*) apresentou padrão semelhante ao de *Gdw/Gdw* quanto às diferenças em relação a MT (Figura 11).

Figura 11 **Comprimento dos entrenós.** Comprimento médio do 1º ao 5º entrenó de plantas com 100 dias de idade. $n = 10$. Barra de erro indica o erro padrão da média. Médias com letras distintas diferem ao nível de significância de 5%. Médias seguidas de ns (não significativo) não diferem entre si. Comparação válida somente dentro do mesmo grupo de entrenós

Outra característica fenotípica notável observada nas plantas *Gdw* foi a maior complexidade de suas folhas em relação ao MT (Figura 12).

Figura 12 **Arquitetura foliar.** Quinta folha completamente expandida de plantas com 55 dias de idade. Barra = 3 cm

A fim de melhor caracterizar as diferenças na arquitetura foliar das plantas *Gdw*, contabilizou-se o número de folíolos primários, secundários e intercalares emitidos pelas folhas.

Na quarta folha expandida, ambos os genótipos carregando o locus *Gdw* formaram 7 folíolos, enquanto MT formou 5 (Figura 13). Observando as sete primeiras folhas, o número de folíolos primários emitidos por MT variou de 2 até 6. O número de folíolos primários emitidos por *Gdw*/+ variou de 3 até 7, enquanto para *Gdw*/*Gdw* o número variou de 3 até 8 (dados não apresentados).

Figura 13 **Arquitetura do limbo da quarta folha expandida.** Mediana dos folíolos primários, secundários e intercalares emitidos pela quarta folha de plantas com 55 dias de idade. n= 5. Barra de erro indica o erro padrão da média. Médias seguidas de letras distintas diferem ao nível de significância de 5%. Comparação válida somente dentro do mesmo tipo de folíolos

O efeito mais chamativo do locus *Gdw* sobre a arquitetura foliar foi observado no número de folíolos secundários emitidos, os quais foram observados apenas em plantas que possuíam uma ou duas cópias do locus de *S. galapagense*. Na quarta folha expandida, *Gdw*/*Gdw* emitiu 11 folíolos secundários (Figura 13). Observando as sete primeiras folhas, *Gdw*/+ emitiu folíolos secundários na quinta folha e na sexta folha, produzindo 4 e 2 folíolos respectivamente. *Gdw*/*Gdw* iniciou a emissão de folíolos secundários mais cedo, os quais foram observados a partir da segunda folha. O número de folíolos secundários emitidos por *Gdw*/*Gdw* variou de 3 até 13 (dados não apresentados).

Folíolos intercalares foram observados apenas na sétima folha de MT (dados não apresentados). Novamente, a presença do locus *Gdw* contribuiu para o aumento da complexidade foliar, uma vez que as plantas que o possuíam produziram maior

número de folíolos intercalares. Na quarta folha expandida, *Gdw/+* produziu 3 folíolos, enquanto *Gdw/Gdw* produziu 4 folíolos intercalares (Figura 13). Observando as sete primeiras folhas, *Gdw/+* começou a emitir folíolos intercalares a partir da terceira folha, produzindo de 1 até 4 folíolos. *Gdw/Gdw* iniciou a emissão de folíolos intercalares a partir da segunda folha, produzindo de 2 até 5 folíolos (dados não apresentados).

Também foi medida a área foliar e o perímetro foliar dos genótipos. A área foliar foi de 32.02 cm² para MT; 35.32 cm² para *Gdw/+*; e 37.85 cm² para *Gdw/Gdw*. Embora esses resultados apontem um efeito do locus *Gdw* no aumento da área foliar, não houve diferenças entre os genótipos (Figura 14).

Figura 14 **Área foliar média por folha.** Área foliar de plantas com 55 dias de idade. $n = 5$. Barra de erro indica o erro padrão da média. Médias seguidas de ns (não significativo) não diferem entre si.

O perímetro foliar foi de 69.81 cm para MT, 96.63 cm *Gdw/+* e 126.84 cm para *Gdw/Gdw* (Figura 15).

Embora não tenha havido diferença entre os genótipos para área foliar; o perímetro foliar foi maior em *Gdw/Gdw* em relação a MT. Essa diferença de 81% entre o perímetro foliar de *Gdw/Gdw* e MT pode ser explicada pelo maior número de folíolos emitidos por *Gdw/Gdw*. *Gdw/+* apresentou valor intermediário entre *Gdw/Gdw* e MT (Figura 15).

Figura 15 **Perímetro foliar médio por folha.** Perímetro foliar de plantas com 55 dias de idade. $n = 5$. Barra de erro indica o erro padrão da média. Médias seguidas de letras distintas diferem ao nível de significância de 1%

4.3 Caracterização agrônômica da isolinha *Gdw*

Também foram avaliadas características vegetativas e reprodutivas das plantas *Gdw*. Mediu-se a massa fresca da parte aérea, separando caule e folhas (Figura 16).

Figura 16 **Massa fresca acumulada.** Peso médio por planta de matéria fresca no caule e nas folhas. Plantas com 100 dias de idade. $n = 30$. Barra de erro indica o erro padrão da média. Médias seguidas de letras distintas diferem ao nível de significância de 5%. Comparação válida somente dentro do mesmo órgão

Para massa fresca acumulada no caule não houve grande diferença entre os genótipos. Os valores de massa fresca de caule foram 7.60g; 7.41g; e 8.50g; para MT, *Gdw/+* e *Gdw/Gdw*, respectivamente. Já para massa fresca acumulada nas folhas, os valores para *Gdw/Gdw* foram maiores em relação a MT e *Gdw/+* (Figura

16). Os valores de massa fresca de folhas foram 8.62g; 9.84g; e 13.82g; para MT, *Gdw/+* e *Gdw/Gdw*, respectivamente.

A produtividade dos genótipos foi comparada contando-se o número de frutos maduros e verdes produzidos por planta, sendo este dado integrado ao peso médio dos frutos.

Para o número de frutos maduros produzidos, não houve diferenças entre os genótipos (Figura 17). Todos os genótipos produziram 8 frutos maduros.

Para número de frutos verdes produzidos, os valores observados foram de 5 frutos para MT; 3 frutos para *Gdw/+*; e 2 frutos para *Gdw/Gdw*. MT produziu mais frutos verdes que *Gdw/+* e *Gdw/Gdw* (Figura 17).

Figura 17 **Frutos produzidos por planta.** Mediana do número de frutos maduros e verdes produzidos por planta. Frutos colhidos de plantas com 100 dias de idade. n = 30. Barra de erro indica o erro padrão da média. Médias seguidas de letras distintas diferem ao nível de significância de 5%. Médias seguidas de ns (não significativo) não diferem entre si. Comparação válida somente dentro do mesmo estágio de maturação

Não houve diferença no peso médio dos frutos maduros. Os frutos maduros de MT pesaram 4.55g; os de *Gdw/+* 4.94g; e os de *Gdw/Gdw* 4.45g (Figura 18).

Para o peso médio de frutos verdes, o genótipo MT foi o que produziu frutos maiores. Os frutos verdes de MT pesaram 2.82g; os de *Gdw/+* pesaram 2.07g; e os de *Gdw/Gdw* 1.90g (Figura 18).

Figura 18 **Peso médio por fruto.** Peso médio de frutos maduros e verdes produzidos por planta. Frutos colhidos de plantas com 100 dias de idade. n = 30. Barra de erro indica o erro padrão da média. Médias seguidas de letras distintas diferem ao nível de significância de 1%. Médias seguidas de ns (não significativo) não diferem entre si. Comparação válida somente dentro do mesmo estágio de maturação

Também não houve diferença para produtividade de frutos maduros entre os genótipos MT e *Gdw/+*, os quais produziram, respectivamente, 38.04g e 37.08 g de frutos por planta (Figura 19). A produtividade de frutos maduros de *Gdw/Gdw* foi menor dentre os genótipos, produzindo 31.20g de frutos maduros por planta.

Figura 19 **Produtividade.** Peso médio total de frutos maduros e verdes produzidos por planta. Frutos colhidos de plantas com 100 dias de idade. n = 30. Barra de erro indica o erro padrão da média. Médias seguidas de letras distintas diferem ao nível de significância de 5%. Comparação válida somente dentro do mesmo estágio de maturação

A produção de frutos verdes foi maior no genótipo MT em relação aos genótipos *Gdw/+* e *Gdw/Gdw* (Figura 19). MT produziu 13.24g de frutos verdes por

planta. *Gdw/Gdw* produziu 7.68 g de frutos por planta; e *Gdw/+* alcançou a produção de 5.44g de frutos por planta.

4.4 Descoberta que a isolinha *Gdw* é um duplo mutante

Como as plantas *Gdw* possuíam folhas mais complexas que as de MT, foi testada a possibilidade de a isolinha possuir uma variação genética natural oriunda de *S. galapagense*, que é responsável por alterar a arquitetura foliar, tornando os limbos mais divididos.

Dentre os genes conhecidos por tornar as folhas de tomateiro mais complexas, encontra-se o gene *PETROSELINUM/TOMATO KNOX-LIKE HOMEODOMAIN PROTEIN1* (*PTS/KD1*). O gene *PTS/KD1* é um fator de transcrição da família *KNOTTED-1 LIKE HOMEODOMAIN* (*KNOX*), homólogo ao gene *KNATM* de *Arabidopsis thaliana* (MAGNANI; HAKE, 2008).

O alelo *Pts* de *S. galapagense*, é mais expresso que o alelo *KD1* de *S. lycopersicum*, devido à deleção de uma adenina 1230 nt acima do códon de iniciação. A maior expressão do alelo *Pts* leva a maior complexidade das folhas de tomateiro (KIMURA *et al.*, 2008).

Para verificar a presença do alelo *Pts*, foi desenhado o par de primers *Pts*-Promotor, que flanqueia a região onde se encontra a deleção. Após a amplificação e sequenciamento do produto em MT, *Gdw* e *S. galapagense* LA1401, verificou-se a presença do alelo *Pts* na isolinha *Gdw* (Figura 20).

Figura 20 Sequenciamento de parte da região promotora do gene *PTS/KD1*. Resultado indicando a presença da adenina (A, realçada em azul) no promotor do alelo *KD1* de *S. lycopersicum* na cv. MT; e a ausência dessa mesma adenina no promotor do alelo *Pts*, presentes em *S. galapagense* LA1401 e na isolinha *Gdw*.

Descobriu-se então que a isolinha *Gdw*, na verdade é um duplo mutante, contendo tanto o alelo *Pts*, responsável por aumentar a dissecação foliar; quanto o locus *Gdw*, responsável por reduzir altura das plantas no caule principal.

4.5 Sequenciamento do genoma do duplo mutante *Gdw-Pts*

Antes da descoberta que a isolinha *Gdw* era um duplo mutante, ela teve seu genoma sequenciado.

Foi realizada a montagem do genoma de *Gdw-Pts* baseado em um genoma de referência, utilizando os arquivos de sequenciamento de genoma total do duplo *Gdw-Pts*, as sequências BAC-end e o genoma de *S. galapagense*. O acesso aos arquivos utilizados foi gentilmente cedido pelos grupos dos pesquisadores Dr. Aoki Koh (Japão), Dr. Andrew Thompson (Reino Unido) e Dr. Sanders Peters (Holanda).

Comparando os genomas de MT, *S. galapagense* e *Gdw-Pts*, foram observados regiões com grande concentração de SNPs no cromossomo 02 (Figura 21).

Figura 21 **Gráfico de densidade de SNPs no cromossomo 02 do duplo mutante MT-*Gdw-Pts*.** O eixo vertical representa o número de SNPs. O eixo horizontal representa a posição no cromossomo, baseado na versão 2.4 do genoma do tomateiro. Fonte: Eloisa Vendemiatti

Diante desta informação, foi descartada a hipótese do locus *Gdw* ser o alelo *Pts*, uma vez que o gene *PTS/KD1* encontra-se no cromossomo 06 do genoma de tomateiro (RICK, 1980; KIMURA *et al.*, 2008).

E visto que a isolinha *Gdw* possuía tanto o locus *Gdw* quanto o alelo *Pts* de *S. galapagense*, a mesma foi novamente cruzada com o MT, a fim de que fosse possível separá-los através da segregação independente, para gerar duas novas isolinhas: *Pts* e *Gdw*.

4.6 Obtenção das novas isolinhas *Gdw* e *Pts*

As plantas utilizadas para obtenção das novas isolinhas foram derivadas de uma população BC_7F_2 *Gdw-Pts* x MT. No total, 59 plantas foram genotipadas e medidas quanto à altura do caule principal (Tabela 02).

Para diferenciar plantas que possuíam o alelo *Pts* na população, as mesmas foram genotipadas com uso do par de primers *Pts-CAPS*. Como a identidade gênica do locus *Gdw* é desconhecida, as plantas foram avaliadas quanto à altura do caule primário, uma vez que *Gdw* foi identificado como responsável por reduzir o porte das plantas.

Conhecendo o genótipo das plantas, foi analisado o possível efeito do alelo *Pts* sobre a altura das plantas. Verificou-se que este alelo não influencia o porte das plantas, já que não houve diferenças na altura do caule primário entre os genótipos *KD1/KD1*, *Pts/KD1* e *Pts/Pts* (Figura 22A). Caso houvesse o efeito do alelo *Pts* no porte das plantas, a seleção de plantas possivelmente portadoras do locus *Gdw* poderia ser comprometida.

Após a confirmação do genótipo da população BC_7F_2 , foi possível observar a segregação independente de plantas com características necessárias para compor as novas isolinhas *Gdw* e *Pts*. Para a isolinha *Pts*, os indivíduos deveriam possuir maior altura e o alelo *Pts* em homozigose. Já para a isolinha *Gdw*, os indivíduos deveriam ter o alelo *KD1* em homozigose e possuírem caule primário reduzido.

Tabela 2 **Caracterização genotípica e fenotípica da população segregante BC₇F₂ *Gdw-Pts* x MT.** Cada planta da população foi medida para a altura do caule principal. Para o par de primers Pts-CAPS foi possível identificar indivíduos homozigotos e heterozigotos. As plantas realçadas foram selecionadas como candidatas as novas isolinhas *Gdw* e *Pts*

Planta	Altura (mm)	Genótipo	Planta	Altura (mm)	Genótipo
01	83	Pts/KD1	31	51	KD1/KD1
02	83	KD1/KD1	32	81	KD1/KD1
03	94	KD1/KD1	33	93	Pts/KD1
04	91	Pts/KD1	34	92	Pts/KD1
05	44	Pts/Pts	35	52	Pts/Pts
06	64	Pts/KD1	36	96	KD1/KD1
07	51	Pts/Pts	37	91	Pts/Pts
08	34	Pts/KD1	38	95	Pts/Pts
09	45	Pts/Pts	39	38	Pts/KD1
10	61	Pts/Pts	40	34	KD1/KD1
11	49	Pts/Pts	41	46	KD1/KD1
12	55	Pts/KD1	43	84	KD1/KD1
13	76	Pts/Pts	44	81	Pts/Pts
14	54	Pts/KD1	45	75	Pts/KD1
15	78	Pts/Pts	46	50	Pts/KD1
16	79	Pts/KD1	90	38	KD1/KD1
17	42	Pts/KD1	91	43	KD1/KD1
18	56	KD1/KD1	92	40	KD1/KD1
19	62	Pts/KD1	93	38	KD1/KD1
20	58	Pts/KD1	94	42	Pts/KD1
21	52	Pts/Pts	95	47	KD1/KD1
22	41	KD1/KD1	96	52	Pts/Pts
23	55	Pts/KD1	97	74	Pts/Pts
24	87	KD1/KD1	98	71	Pts/Pts
25	37	Pts/KD1	99	45	Pts/Pts
26	82	Pts/Pts	101	55	KD1/KD1
27	91	Pts/KD1	102	104	Pts/KD1
28	39	Pts/Pts	103	58	KD1/KD1
29	52	Pts/KD1	104	38	Pts/KD1
30	65	Pts/KD1

Figura 22 **Caracterização fenotípica e genotípica da população segregante *Gdw-Pts* x MT BC₇F₂.** **A)** Efeito do alelo *Pts* sobre a altura do caule primário. Os dados das plantas de cada genótipo foram agrupados. Genótipos seguidos de ns (não significativo) não diferem entre si. **B)** Gráfico plotando a altura do caule primário de todas as 59 plantas da população segregante, agrupadas por genótipo. Setas indicam os indivíduos selecionados de cada genótipo para compor as novas isolinhas *Gdw* e *Pts*

Foram selecionados cinco indivíduos para a isolinha *Gdw*: as plantas 22, 40, 90, 92 e 93 (Tabela 02; Figura 22B – setas alaranjadas). Essas plantas foram consideradas como possíveis candidatas a possuírem apenas o locus *Gdw*.

Da mesma forma, indivíduos para a isolinha *Pts* foram selecionados: as plantas 26, 37 e 38. (Tabela 02; Figura 22B – setas azuis). Estas plantas foram consideradas como possíveis candidatas a possuírem apenas o alelo *Pts*.

Uma vez que um dos critérios de seleção foi baseado em um fenótipo altamente influenciado por condições ambientais, as sementes das plantas

selecionadas foram colhidas individualmente para serem caracterizadas novamente na geração seguinte (BC₇F₃), para confirmação de que os fenótipos observados seriam mantidos nas progênes.

A hipótese de o locus *Gdw* afetar a arquitetura foliar de forma independente também foi verificada nesta nova caracterização.

4.7 Caracterização morfológica das novas isolinhas *Gdw* e *Pts*

Para caracterização morfológica foi avaliada a arquitetura foliar e a altura final das plantas.

As progênes das plantas consideradas como possíveis novas isolinhas foram semeadas e checadas aos 25 dias para seleção de quais progênes seriam caracterizadas.

Para as plantas candidatas a possuírem o locus *Gdw*, foi selecionada a progênie BC₇F₃ da planta 40, que apresentou maior uniformidade quanto ao porte reduzido. As progênes das plantas 22, 90, 92 e 93 não foram utilizadas por apresentarem grande variação em relação ao fenótipo.

Para as plantas candidatas a isolinha *Pts* foi selecionada a progênie BC₇F₃ da planta 26, que apresentou folhas com maior complexidade e porte semelhante ao de MT. A progênie da planta 37 apresentou fenótipo intermediário para complexidade foliar, o que não era esperado, uma vez que a planta apresentou fenótipo homozigoto para o alelo *Pts* (Tabela 02). Por esse motivo a progênie da planta 37 não foi utilizada. A planta 38 produziu poucas sementes e a maioria não germinou, não sendo sua progênie analisada.

Neste experimento de caracterização das novas isolinhas *Gdw* e *Pts*, também foi adicionado um novo genótipo, a isolinha *bipinnata* (*bip*). Este mutante possui maior complexidade foliar e foi utilizado como um controle para esta característica.

O gene *BIPINNATA* de tomateiro (Solyc02g089940) é um fator de transcrição que pertence à família *BELL-1 LIKE HOMEODOMAIN* (*BELL*), homólogo aos genes *SAWTOOTH1* e *SAWTOOTH2* de *A. thaliana*.

Os genótipos *Pts*, *bip* e *Gdw* apresentaram folhas com maior complexidade que as folhas de MT (Figura 23A).

Figura 23 **Arquitetura foliar. A)** Quinta folha completamente expandida de plantas com 65 dias de idade. Barra = 3 cm. **B)** Mediana dos folíolos primários, secundários e intercalares emitidos pela quinta folha de plantas com 65 dias de idade. n=10. Barra de erros representa o erro padrão da média. Médias seguidas de letras distintas diferem ao nível de significância de 5%. Comparação válida somente dentro do mesmo tipo de folíolo

Não houve diferença no número de folíolos primários formados entre os genótipos *Pts*, *bip* e *Gdw* (Figura 23B). As folhas de *Pts* emitiram 7 folíolos primários, enquanto as de *bip* emitiram 6.5 folíolos primários. Ambos os genótipos emitiram mais folíolos primários que os genótipos MT. *Gdw* e MT não diferiram entre si, os quais produziram 6 e 5 folíolos, respectivamente.

Chama a atenção a emissão de folíolos secundários, observados apenas no genótipo *Pts*, que emitiu 5 folíolos (Figura 23B).

A formação de folíolos intercalares é praticamente ausente nos genótipos MT e *bip*. *Pts* emitiu mais folíolos que *Gdw*, que produziram 3.5 e 2 folíolos intercalares, respectivamente (Figura 23B).

Não houve grandes diferenças entre a área foliar dos genótipos. Apenas *Pts* e *Gdw* diferiram entre si. MT e *bip* foram semelhantes tanto a *Pts* quanto a *Gdw*. (Figura 24A). Os genótipos apresentaram os seguintes valores de área foliar: 57.82 cm² para MT; 52.93 cm² para *bip*; 43.95 cm² para *Gdw*; e 60.16 cm² para *Pts* (Figura 24A).

Pts apresentou perímetro foliar maior que todos os genótipos; enquanto o perímetro de *bip* foi maior que MT. Os genótipos MT e *Gdw* não diferiram entre si, assim como *bip* não diferiu de *Gdw* (Figura 24B). Para perímetro foliar foram observados os seguintes valores: 101.2 cm para MT, 125.12 cm para *bip*; 109.2 cm para *Gdw* e 160.73 para *Pts* (Figura 24B).

Pts teve o maior índice de complexidade foliar dentre os genótipos, mas não diferiu de *bip* e *Gdw*, diferindo apenas de MT (Figura 24C). O índice de complexidade foliar dos genótipos foi de 14.3 para MT; 23.75 para *bip*; 22.04 para *Gdw* e 34.37 para *Pts* (Figura 24C).

Figura 24 **Arquitetura foliar.** **A)** Área foliar média e **B)** Perímetro foliar médio. Quinta folha de plantas com 65 dias de idade. **C)** Índice de complexidade foliar = $[(\text{perímetro}^2)/(4\pi \times \text{área})]$. $n = 10$. Barra de erros representa o erro padrão da média. Médias seguidas de letras distintas diferem ao nível de significância de 1% (B e C) ou 5% (A)

Para medição da altura em diferentes pontos da planta, foram adotados os critérios explicados na Figura 06 (em Material e Métodos).

A altura do caule principal foi de 12.77 cm para MT; 12.8 cm para *bip*; 10.94 cm para *Gdw*; e 12.8 cm para *Pts* (Figura 25).

Não houve diferença entre os genótipos em relação à altura do caule principal; apesar de *Gdw* apresentar o menor valor (Figura 25).

Figura 25 **Altura média de caules e ramo lateral.** Altura do caule principal, caule primário e ramo lateral de plantas com 65 dias de idade. $n = 10$. Barra de erros representa o erro padrão da média. Médias seguidas de letras distintas diferem ao nível de significância de 1%. Médias seguidas de ns (não significativo) não diferem entre si. Comparação válida somente dentro da mesma posição de tomada da medida

Para a altura do caule primário não houve diferença entre os genótipos (Figura 25). Os valores obtidos foram de 7.23 cm para MT; 7.08 cm para *bip*; 6.87 cm para *Gdw*; e 7.44 cm para *Pts*.

A altura no ramo lateral foi de 9.71 cm; 9.43 cm; 5.19 cm; e 7.97 cm; respectivamente para MT; *bip*; *Gdw*; e *Pts*. Não houve diferenças entre MT, *bip* e *Pts*, os quais apresentaram ramos maiores que *Gdw* (Figura 25).

Com esses resultados, as plantas da progênie 26 foram selecionadas como nova isolinha *Pts* e as plantas da progênie 40 foram selecionadas como nova isolinha *Gdw*.

5 DISCUSSÃO

Como alguns dos experimentos foram realizados em momentos distintos visando o mesmo objetivo de caracterizar o efeito do locus *Gdw* sobre o porte e a arquitetura foliar das plantas, esses dados serão discutidos conjuntamente para os genótipos MT, *Gdw*, *Pts*, *Gdw-Pts* e *bip*, evitando redundância.

5.1 Efeito do locus *Gdw* sobre altura das plantas

Nos primeiros experimentos realizados com o duplo mutante *Gdw-Pts*, o efeito do locus *Gdw* sobre a altura das plantas ficou mais evidente que os observados na isolinha *Gdw* selecionada. Apesar da presença do alelo *Pts* no duplo mutante, o efeito deste sobre a altura das plantas não foi verificado quando da análise da isolinha *Pts* (Figura 25). Desta forma, a discussão dos dados de altura das plantas *Gdw-Pts* foi feita considerando apenas o efeito de *Gdw* sobre este caráter.

Na curva de crescimento, *Gdw-Pts* apresentou redução na altura do caule primário (Figura 10), como resultado do encurtamento dos entrenós (Figura 11). Nos experimentos realizados com a nova isolinha *Gdw*, foi verificada uma tendência à redução do caule principal, apesar de não haver diferença em relação os genótipos MT, *bip* e *Pts* (Figura 25). Da mesma forma, o caule primário não foi afetado na isolinha *Gdw* (Figura 25), assim como o comprimento dos entrenós (dados não apresentados).

É possível que a diferença observada entre *Gdw-Pts* e *Gdw* sobre o porte das plantas seja devido ao efeito de dose gênica. Os experimentos realizados com *Gdw-Pts* contaram com plantas que passaram por mais de seis gerações de autofecundação (*Gdw-Pts* BC₆F_n), nas quais o locus *Gdw* encontrava-se em homozigose. Os experimentos realizados com *Gdw* utilizaram plantas F₃ (*Gdw* BC₇F₃), oriundas de uma única planta selecionada como candidata a possuir o locus de *S. galapagense* para redução do porte da planta. É possível que a planta 40 (BC₇F₂) possuísse o locus em *Gdw* em heterozigose, uma vez que a mesma foi selecionada pelo fenótipo. Logo, nos experimentos com a sua progênie, haveria plantas em homozigose e em heterozigose para o locus *Gdw*, bem como plantas sem o locus. Essa é uma hipótese razoável para explicar a diferença nos dados obtidos com *Gdw-Pts* e *Gdw*. Esta suposição poderia ser suportada pela observação

dos dados originais. Comparando o mesmo experimento, a altura do caule primário em MT variou de 11 a 14 cm; enquanto em *Gdw* variou de 7.6 a 13.2 cm. Também não se descarta a hipótese do locus *Gdw*, que se encontra no cromossomo 02 (Figura 21), seja composto por vários genes com efeito aditivo sobre o comprimento do caule, e que ao cruzar a linhagem *Gdw-Pts* com MT para originar a isolinha *Gdw*, esses genes tenham segregado devido a eventos de recombinação. Como resultado, não haveria reprodução do fenótipo observado no duplo *Gdw-Pts*.

O gene responsável pela redução do porte das plantas presente no locus *Gdw* ainda é desconhecido. Como crescimento das plantas é regulado por processos de divisão, diferenciação e expansão celular, o gene causativo de *Gdw* poderia estar relacionado à divisão celular ou expansão celular. Mutantes relacionados a defeitos no controle da divisão celular apresentam fenótipos drásticos distintos dos visualizados em *Gdw* (ENUGUTTI *et al.*, 2012; SUZUKI *et al.*, 2004), o que torna pouco provável que *Gdw* seja um mutante desta classe de desenvolvimento.

Por outro lado, *Gdw* poderia estar relacionado a genes envolvidos na regulação da expansão celular, uma vez que esse tipo de disfunção geralmente causa efeitos pleiotrópicos menos deletérios. Alguns dos hormônios vegetais estão envolvidos na regulação da expansão celular, como a auxina (XING *et al.*, 2015); brassinoesteróide (MAKAREVITCH *et al.*, 2012), o peptídeo RALF (BERGONCI *et al.*, 2014), citocininas (DOWNES; CROWELL, 1998) e giberelinas (PETTI *et al.*, 2015).

Mutantes com redução no porte da planta tiveram um grande impacto na agricultura durante a Revolução Verde, na década de 1970. As variedades semianãs de trigo e arroz utilizadas em cruzamentos que deram origem as cultivares de alta produtividade possuem defeitos na sinalização e síntese do hormônio giberelina, respectivamente (HEDDEN, 2003).

As variedades semianãs de trigo possuem a mutação *Reduced height-1 (Rht)*, e codificam uma proteína DELLA defectiva. O gene *RHT* é homólogo aos genes *GIBBERELLIN INSENSITIVE (GAI)* de *A. thaliana*, e *PROCERA* de tomateiro (JASINSKI *et al.*, 2008; PENG *et al.*, 1999), todos pertencentes à grande família de proteínas regulatórias GRAS. Proteínas DELLA atuam como repressoras do crescimento e são inativadas pela presença do hormônio giberelina. Ao se ligar ao seu receptor GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF (GID1), a giberelina promove uma mudança conformacional do mesmo, permitindo que ele se ligue a DELLA. O complexo GA-GID1-DELLA interage com o complexo E3 ligase (ou complexo de

SCF), o qual marca as proteínas DELLA para degradação pelo proteossoma 26S (ITOH *et al.*, 2002; UEGUCHI-TANAKA *et al.*, 2005). A proteína RHT defectiva da variedade de trigo semianã é resultado de uma substituição de um nucleotídeo, que causa o surgimento de um códon de parada prematuro, levando a perda de seu domínio DELLA (PENG *et al.*, 1999). Esta proteína truncada não é mais capaz de interagir com GID1, não sendo mais destruída pelo complexo SCF na presença de giberelina (MURASE *et al.*, 2008). Esse defeito ocasiona a repressão constitutiva do crescimento, que não pode ser revertida pelo hormônio giberelina, explicando o pequeno porte dos mutantes *Rht* de trigo.

As variedades anãs *sd-1* de arroz produzem uma versão defectiva da enzima GA20-oxidase, que constitui um passo metabólico importante na síntese de giberelinas ativas nas plantas (MONNA *et al.*, 2002; SASAKI *et al.*, 2002; SPIELMEYER *et al.*, 2002). O defeito deve-se a substituições de aminoácidos em diferentes posições nos alelos *sd1*, que levam a tradução de uma enzima com menor atividade catalítica, o que reduz a produção de GA₁ nos mutantes (MONNA *et al.*, 2002; SASAKI *et al.*, 2002; SPIELMEYER *et al.*, 2002).

Recentemente foi identificada uma variação genética natural do gene *ZmPGP1* de milho (*Zea mays*), que tem grande potencial para uso no melhoramento genético, por possibilitar a produção de variedades anãs com alta produtividade (XING *et al.*, 2015). A variação genética natural é alélica aos mutantes *brachytic2* (*br2*) previamente identificados, os quais por serem extremamente defectivos, não foram utilizados na agricultura. O gene *Br2* codifica uma proteína transportadora multidrug resistant (MDR), da classe das P-glicoproteínas (PGPs), responsável pelo transporte polar de auxina (MULTANI *et al.*, 2003).

O efeito no locus *Gdw* em cultivares virá a ser explorado em projetos futuros. No cultivo de tomates para consumo *in natura*, o caule das plantas é mantido ereto, com auxílio de estacas ou fitilhos. Variedades possuindo o locus *Gdw*, apresentando entrenós mais curtos, poderiam vir a produzir um número maior de inflorescências por metro linear de caule, uma vez que após a indução do florescimento, uma inflorescência é emitida a cada três folhas (SAMACH; LOTAN, 2007).

O porte reduzido conduzido pelo locus *Gdw* pode ter algum valor adaptativo para a espécie *S. galapagense*. É também possível que o locus seja um alelo defectivo de algum gene, uma vez que as plantas de *S. galapagense* evoluíram em um ambiente com pouca competição (RICK, 1967). Em tais condições, e diante de

um eventual relaxamento da seleção natural, mutações defectivas teriam oportunidade de surgirem e serem fixadas nas populações, processo que seria auxiliado pelo sistema de reprodução autógamo da espécie (RICK, 1967).

5.2 Efeito do locus *Gdw* sobre a arquitetura foliar

As espécies de tomateiro possuem folhas compostas. Espécies com folhas compostas apresentam o limbo foliar dividido em subunidades conhecidas como folíolos, em contraste com espécies de folhas simples, que apresentam o limbo foliar em lâmina única, sem subdivisões.

O processo de desenvolvimento de folhas em tomateiro segue um padrão que é comum para todas as angiospermas, sendo dividido em três fases: iniciação, morfogênese primária e morfogênese secundária (HAGEMANN; GLEISSBERG, 1996).

As folhas de tomateiro iniciam seu desenvolvimento como uma pequena protuberância nos flancos do meristema apical caulinar (SAM) (COLEMAN; GREYSON, 1976). O início do processo envolve divisões anticlinais da camada mais externa da túnica, com divisões periclinais na camada mais interna da túnica e nas células adjacentes, originando o primórdio foliar (COLEMAN; GREYSON, 1976).

Os folíolos em tomateiro são formados durante a fase de morfogênese primária, a partir da margem dos primórdios foliares, região conhecida como blastozona ou blastozona marginal, a qual possui células meristemáticas com capacidade morfogênica (HAGEMANN; GLEISSBERG, 1996). A formação dos folíolos na blastozona é semelhante à formação de primórdios foliares no SAM, ou seja, é uma reiteração do mesmo processo de desenvolvimento.

A morfogênese secundária é marcada pelo fim da formação de novos folíolos, ocasionada pela diferenciação das células, seguida de expansão celular (HAGEMANN; GLEISSBERG, 1996).

Alguns genes regulatórios e eventos moleculares já são conhecidos para as etapas do processo de desenvolvimento foliar. No SAM, genes da família *KNOX* são responsáveis pela manutenção da capacidade meristemática das células (LONG *et al.*, 1996). Para que haja a iniciação do primórdio foliar, a expressão de genes *KNOX* deve ser reprimida nas células do SAM que darão origem ao primórdio (LINCOLN *et al.*, 1994; LONG *et al.*, 1996; SMITH *et al.*, 1992). Em espécies de

folhas simples, a repressão dos genes *KNOX* é mantida ao longo de todo o desenvolvimento foliar (SINHA *et al.*, 1993), enquanto em espécies de folha composta, a expressão destes genes é retomada (BHARATHAN *et al.*, 2002).

Em tomateiro, a fase de morfogênese primária tem sua duração controlada pela ação dos genes *LANCEOLATE* e *miR319*. (ORI *et al.*, 2007). *LANCEOLATE* pertence à família de fatores transcricionais TCP classe II (ou TCP classe C), os quais regulam a proliferação celular (MARTÍN-TRILLO; CUBAS, 2009). O *MIR319* é um micro-RNA (miR); genes que expressam RNAs não codificantes, responsáveis pela clivagem de RNAs mensageiros (mRNAs) específicos, atuando como reguladores negativos de seus genes alvos (REIS *et al.*, 2015). No início da formação da folha há uma alta expressão do *miR319* e uma baixa expressão de *LANCEOLATE* e ao longo da progressão do desenvolvimento foliar, ocorre redução da expressão do *miR319* e aumento da expressão de *LANCEOLATE* (ORI *et al.*, 2007). Na fase de morfogênese primária, devido a maior expressão do *miR319*, as células da blastozona marginal permanecem com capacidade morfogênica, permitindo a formação de novos folíolos (ORI *et al.*, 2007). Quando é atingido um determinado nível de expressão de *LANCEOLATE*, sobrepujando a expressão do seu regulador negativo, há terminação da morfogênese primária e início da morfogênese secundária (ORI *et al.*, 2007).

Nos experimentos realizados, *Pts* apresentou folhas mais complexas (Figura 23A), como indicado pelo índice de complexidade foliar (Figura 24C) e pelo número de folíolos emitidos (Figura 23B).

Gdw e *bip* apresentaram índice de complexidade foliar semelhante (Figura 24C) e diferenças quanto à emissão de folíolos (Figura 23B). MT apresentou as folhas menos complexas dentre os genótipos avaliados (Figura 23 A e 23B; Figura 24C).

Os genes *PTS/KD1* e *BIP* são componentes da mesma via de regulação do desenvolvimento foliar de tomateiro (KIMURA *et al.*, 2008). Enquanto *PTS/KD1* atua positivamente sobre a complexidade foliar, *BIP* atuando reduzindo a complexidade. O fator de transcrição *PTS/KD1* interage diretamente com a proteína produzida pelo gene *BIP*, formando o complexo *PTS-BIP* (KIMURA *et al.*, 2008). A proteína *BIP*, também interage com um fator de transcrição produzido por outro membro da família *KNOX*, o gene *TKN2*, homólogo ao *SHOOTMERISTEMLESS (STM)* de *A. thaliana*. Quando há presença de *PTS/KD1*, a formação do dímero *BIP-TKN2* é impedida

(KIMURA *et al.*, 2008). A presença de maior quantidade da proteína PTS/KD1 causada pelo alelo *Pts* tem efeito celular semelhante ao do alelo perda de função *bip*, levando ao aumento da expressão *TKN1*, outro gene da família *KNOX*.

Durante a fase de morfogênese primária, a maior expressão de *TKN1* leva maior a formação de folíolos, provavelmente devido à manutenção da identidade meristemática nas células da blastozona. Por esse motivo, os genótipos *Pts* e *bip*, formam mais folíolos que MT. *Pts* é o alelo da espécie *S. galapagense* que é mais expresso que o alelo *KD1* de *S. lycopersicum*, enquanto *bip* é um alelo nulo do gene *BIP* (KIMURA *et al.*, 2008).

A maior complexidade foliar do locus *Gdw* provavelmente deve-se a maior capacidade morfogênica de sua blastozona marginal. Inúmeros genes conhecidos pela regulação desta capacidade poderiam ser responsáveis. Genes da família *KNOX* e *BELL* seriam possíveis candidatos. Genes controlando o ciclo celular como *LYRATA* (homólogo ao gene *JAGGED* de *A. thaliana*) (DAVID-SCHWARTZ *et al.*, 2009) e *LANCEOLATE* também poderiam ser candidatos. Também é conhecido que genes relacionados à sensibilidade à auxina, como *TRIFOLIATE*, membro da família *MYB*, alteram a complexidade foliar (NAZ *et al.*, 2013). É interessante notar que no duplo *Gdw-Pts*, a emissão de todas as classes de folíolos (Figura 13) é maior que a quantidade emitida por *Pts* ou *Gdw*, separadamente (Figura 23B). Há uma interação positiva entre os dois loci para aumentar a complexidade das folhas de tomateiro.

Quanto à identidade de *Gdw*, há uma dificuldade em convergir os possíveis candidatos ao locus *Gdw* quanto aos dois processos em que se observa seu efeito. É possível que o controle da arquitetura foliar e o controle do porte da planta sejam exercidos por genes distintos.

Sabe-se também que o hormônio giberelina pode afetar tanto a arquitetura foliar quanto o porte de tomateiro (LIVNE *et al.*, 2015). No caso de *Gdw*, seu pequeno porte e maior complexidade foliar estariam de acordo com menor sensibilidade ou menor produção de giberelina; embora *Gdw* não apresente falha na germinação, característica que seria esperada para este tipo de disfunção e observada nos mutantes de tomateiro *gibberellin deficient* (KOORNNEEF *et al.*, 1990).

5.3 Efeito do locus *Gdw* sobre caracteres de interesse agrônômico

Para os experimentos de caracterização agrônômica, não é possível avaliar o efeito do locus *Gdw* separadamente, pois não foi possível realizar um novo experimento de caracterização na isolinha *Gdw*. Todos os dados são referentes ao duplo *Gdw-Pts*.

A massa fresca de caule praticamente não diferiu entre os genótipos, enquanto a massa fresca acumulada para folhas foi maior em *Gdw-Pts* que em MT (Figura 16). A emissão de maior número de folíolos por folha (Figura 13) pode explicar a maior massa foliar.

Quanto ao número de frutos produzidos, *Gdw-Pts* produziu menor quantidade de frutos verdes que MT; e não houve diferença para número de frutos maduros (Figura 17). Quanto ao peso médio dos frutos, não houve diferenças para os frutos maduros, e *Gdw-Pts* produziu frutos verdes mais leves que MT (Figura 18). A produtividade de *Gdw-Pts* foi inferior a de MT, tanto para peso total de frutos maduros quanto de frutos verdes (Figura 19).

É possível que a menor produtividade de *Gdw-Pts* seja resultado do maior sombreamento de suas folhas, uma vez que possui entrenós mais curtos (Figura 11). Ainda, de acordo com os resultados obtidos por Vicente *et al.* (2015), é possível que o alelo *sp* presente na cultivar MT, somado a redução do porte da planta, tenha afetado o balanço vegetativo/reprodutivo da planta de maneira a torná-la pouco produtiva.

5.4 Seleção das novas isolinhas *Gdw* e *Pts*

Com bases nos dados de caracterização das isolinhas *Pts* e *Gdw*, as plantas da progênie 26, que possuem o alelo *Pts* em homozigose, foram selecionadas como nova isolinha *Pts*. Como esperado, as plantas da progênie apresentaram maior complexidade em sua arquitetura foliar quando comparadas às plantas MT (Figura 23 e 24). E como as plantas *Pts* não diferiram de MT em relação à altura do caule principal e do caule primário (Figura 25), é pouco provável que elas estejam carregando o locus *Gdw*.

As plantas da progênie 40, que possui o alelo *KD1* em homozigose, foram selecionadas como nova isolinha *Gdw*. Estas plantas apresentaram tendência a

menor altura do caule principal em relação a MT (Figura 25). Apesar de não apresentarem menor altura no ramo primário, elas foram selecionadas como portadoras do locus *Gdw*. É possível que a planta 40 possuísse o locus em heterozigose, e na progênie podem ter sido avaliadas plantas homozigotas e heterozigotas para o locus, assim como plantas sem o locus. A elevada variância dos dados em função dos genótipos distintos avaliados pode ter contribuído para não detecção de diferenças significativas do efeito do locus *Gdw* sobre a altura do caule.

Outro fator para seleção destas plantas como portadoras do locus *Gdw*, é a arquitetura foliar peculiar destas plantas. As plantas apresentaram maior emissão de folíolos primários e intercalares que MT (Figuras 23); além de possuírem folhas menores que as de MT (Figuras 23 e 24A), característica esta que a distingue dentre os outros genótipos. A redução na área foliar de *Gdw* pode estar relacionada com a redução do seu porte.

É importante ressaltar que apesar de *Gdw* não produzir folíolos secundários; *Pts* emitiu 5 folíolos secundários (Figura 21A; dados originais variaram de 1 a 7 folíolos); enquanto o duplo mutante *Gdw-Pts* emitiu 11 folíolos secundários (Figura 11; dados originais variaram de 8 a 13). O alelo *Pts* de *S. galapagense* é necessário para formação de folíolos secundários no background MT, apesar de sozinho não conseguir reproduzir o número de folíolos secundários emitidos pelo duplo *Gdw-Pts*. Estes dados suportam um possível efeito aditivo entre o locus *Gdw* e o alelo *Pts* na elaboração de folhas mais complexas, através da reiteração do processo morfogênico ao longo do desenvolvimento das folhas.

S. galapagense possui folhas tão elaboradas, que esta característica por si, torna a espécie distinta dos demais tomateiros (PERALTA *et al.*, 2008). Até o presente momento, *Pts* é o único gene oriundo desta espécie a que se atribui a sua arquitetura foliar complexa. No presente trabalho, foi identificado um novo componente que atua na elaboração da complexidade das folhas de *S. galapagense*.

Além de seu efeito na arquitetura foliar, o locus *Gdw* pode atuar de forma pleiotrópica sobre o desenvolvimento caulinar, reduzindo a altura das plantas. Este componente responsável pelo porte pequeno de *S. galapagense*, até o momento não havia sido isolado.

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho, conseguimos introgridir em *Solanum lycopersicum* cultivar Micro-Tom, uma variação genética natural provinda de *Solanum galapagense*.

Este locus, nomeado *Galapagos dwarf* (*Gdw*), controla de forma pleiotrópica o porte das plantas, reduzindo a altura do caule principal e do caule primário através do encurtamento dos entrenós; e a arquitetura foliar, aumentando a elaboração das folhas pela maior emissão de folíolos primários e folíolos intercalares.

A obtenção de isolinhas de MT contendo os alelos *Pts* e *bip*, não somente permitiu a realização do estudo comparativo com *Gdw*, mas também caracterizou esses genes quanto a processos ainda não estudados. Desse modo, no presente trabalho, foi determinado que embora *bip*, *Gdw* e *Pts* afetem a arquitetura foliar, somente *Gdw* afeta a altura da planta.

Através do sequenciamento e montagem do genoma de *Gdw*, temos fortes evidências de que o locus encontra-se no braço longo cromossomo 2.

Em continuidade ao trabalho desenvolvido, as próximas etapas dos estudos com *Gdw* serão o mapeamento fino e clonagem de seu gene causativo, bem como o estudo do possível impacto deste locus em cultivares comerciais de tomateiro.

REFERÊNCIAS

- ARMS, E.M.; BLOOM, A.J.; ST. CLAIR, D.A. High resolution mapping of a major effect QTL from wild tomato *Solanum habrochaites* that influences water relations under root chilling. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 128, p. 1713-1724, 2015.
- BAI, Y.; FALK, S.; SCHNITTGER, A.; JAKOBY, M.J.; HÜLSKAMP, M. Tissue layer specific regulation of leaf length and width in *Arabidopsis* as revealed by the cell autonomous action of *ANGUSTIFOLIA*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 61, p. 191-199, 2010.
- BERGONCI, T.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. Antagonistic relationship between *AtRALF1* and brassinosteroid regulates cell expansion-related genes. **Plant Signaling & Behavior**, 9:10, e976146, 2014. doi:10.4161/15592324.2014.976146
- BHARATHAN, G.; GOLIBER, T.E.; MOORE, C.; KESSLER, S.; PHAM, T.; SINHA, N.R. Homologies in leaf form inferred from *KNOX* gene expression during development. **Science**, Washington, v. 296, p. 1858-1860, 2002.
- BILSBOROUGH, G.D.; RUNIONS, A.; BARKOULAS, M.; JENKINS, H.W.; HASSON, A.; GALINHA, C.; LAUFS, P.; HAY, A.; PRUSINKIEWICZ, P.; TSIANTIS, M. Model for the regulation of *Arabidopsis thaliana* leaf margin development. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 108, p. 3424-3429, 2011.
- BISHOP, G.J.; NOMURA, T.; YOKOTA, T.; HARRISON, K.; NOGUCHI, T.; FIJIOKA, S.; TAKATSUTO, S.; JONES, J.D.G.; KAMIYA, Y. The tomato *DWARF* enzyme catalyzes C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 96, p. 1761-1766, 1999.
- BLANCA, J.; CAÑIZARES, J.; CORDERO, L.; PASCUAL, L.; DIEZ, M.J.; NUEZ, F. Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10: e48198, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0048198
- BUDIMAN, M.A.; CHANG, S.B.; LEE, S.; YANG, T.J.; ZHANG, H.B.; DE JONG, H.; WING, R.A. Localization of *jointless-2* gene in the centromeric region of tomato chromosome 12 based on high resolution genetic and physical mapping. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 108, p. 190-196, 2004.
- CANDOLE, A. **Origin of cultivated plants**. 1886. Reimpressão da 2.ed. New York: Hafner Publishing . 1959. p.290-292,

CAMPOS, M.L.; CARVALHO, R.F.; BENEDITO, V.A.; PERES, L.E.P. Small and remarkable: The Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 5, p. 267-270, 2010.

CARVALHO, R.F.; CAMPOS, M.L.; PINO, L. E.; CRESTANA, S.L.; ZSÖGÖN, A; LIMA, J.E.; BENEDITO, V.A.; PERES, L.E.P. Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. **Plant Methods**, v. 7, 2011. doi:10.1186/1746-4811-7-18.

CATANZARITI, A.M.; LIM, G.T.T.; JONES, D.A. The tomato *I-3* gene: a novel gene for resistance to *Fusarium* wilt disease. **New Phytologist**, Lancaster, v. 207, p. 106-118, 2015.

CHETELAT, R.T.; JI, Y. Chapter 03: Cytogenetics and evolution. In: Razdan; M.K.; Mattoo, A.K. (ed.). **Genetic improvement of solanaceous crops v. 2: Tomato**. Enfield: Science Publishers, 2007. p 77-112.

COLEMAN, W.K.; GREYSON, R.I. The growth and development of leaf in tomato (*Lycopersicon esculentum*). II: Leaf ontogeny. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 54, p. 2704-2717, 1976.

DARWIN, C (1839). Chapter XIX: Galapagos Arquipelago. In: Darwin, C. **Journal of researches in geology and natural history of the various countries visited by H. M. S. Beagle from 1832-1836**. London: Henry Colburn, 1839. p. 453-478.

DARWIN, S.C.; KNAPP, S.; PERALTA, I.E. Taxonomy of tomatoes in the Galápagos Islands: native and introduced species of *Solanum* section *Lycopersicon* (Solanaceae). **Systematics and Biodiversity**, London, v. 1, p. 29-53, 2003.

DAVID-SCHWARTZ, R.; KOENIG, D.; SINHA, N.R. *LYRATE* is a key regulator of leaflet initiation and lamina outgrowth in tomato. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 21, p. 3093-3104, 2009.

DOWNES, B.P.; CROWELL, D.N. Cytokinin regulates the expression of a soybean expansin gene by a post-transcriptional mechanism. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 37, p. 437-444, 1998.

ENUGUTTI, B.; KIRCHHELLE, C.; OELSCHNER, M.; RUIZ, R.A.T.; SCHLIEBNER, I.; LEISTER, D; SCHNEITZ, K. Regulation of planar growth by the *Arabidopsis* AGC protein kinase UNICORN. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 109, p. 15060-15065, 2012.

EQUIPE ESTATCAMP (2014). **Software Action. Estatcamp** - Consultoria em estatística e qualidade, São Carlos, Brasil. URL: <http://www.portalaction.com.br/>.

ESHED, Y.; ZAMIR, D. An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. **Genetics**, Bethesda, v. 141, p. 1147-1162, 1995.

ESQUIÑAS-ALCAZAR, J.; NUEZ, F. Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. In: Nuez, F. (Ed.). **El cultivo del tomate**. Bilbao: Ediciones Mundi-Prensa, 1995. p. 13-42.

FRIDMAN, E.; PLEBAN, T.; ZAMIR, D. A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 97, p. 4718-4723, 2000.

FULTON, T.M.; CHUNWONGSE, J.; TANKSLEY, S.D. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 13, p. 207-209, 1995.

GOLDENBERG, C.S. **Estudo de variações genéticas naturais de *Solanum galapagense* possivelmente relacionadas com alterações no hormônio giberelina**. 2009. 80p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2009.

HAGEMANN, W.; GLEISSBERG, S. Organogenetic capacity of leaves: the significance of marginal blastozones in angiosperms. **Plant Systematics and Evolution**, Viena, v. 199, p. 121-152, 1996.

HEDDEN, P. The genes of the Green Revolution. **Trends in Genetics**, Cambridge, v.19, p. 5-9, 2003.

ICHIHASHI, Y.; SINHA, N.R. From genome to phenome and back in tomato. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 18, p. 9-15, 2014.

ITOH, H.; UEGUCHI-TANAKA, M.; SATO, Y.; ASHIKARI, M.; MATSUOKA, M. The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 14, p. 57-70, 2002.

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

JENKINS, J.J. The origin of the cultivated tomato. **Economic Botany**, New York, v. 2, p. 379-392, 1948.

KIMURA, S.; KOENIG, D.; KANG, J.; YOONG, F.Y.; SINHA, N. Natural variation in leaf morphology results from mutation of a novel *KNOX* gene. **Current Biology**, London, v. 18, p. 672-677, 2008.

KOORNNEEF, M.; BOSMA, T.D.; HANHART, C.J.; VAN DER VEEN, J.H.; ZEEVAART, J.A. The isolation and characterization of gibberellin-deficient mutants in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 80, p. 852-857, 1990.

LI, W.; CHETELAT, R.T. A pollen factor linking inter and intraspecific pollen rejection in tomato. **Science**, Washington, v. 330, p. 1827-1830, 2010.

LIFSCHITZ, E.; EVIATAR, T.; ROZMAN, A.; SHALIT, A.; GOLDSCHMIDT, A.; AMSELLEM, Z.; ALVAREZ, J.P.; ESHED, Y. The tomato *FT* ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 6398-6403, 2006.

LINCOLN, C.; LONG, J.; YAMAGUCHI, J.; SERIKAWA, K.; HAKE, S. A *Knotted1-like homeobox* gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 6, p. 1859-1876, 1994.

LINCOLN, R.E.; PORTER, J.W. Inheritance of beta-carotene in tomatoes. **Genetics**, Bethesda, v. 35, p. 206-211, 1950.

LIVNE, S.; LOR, V.S.; NIR, I.; ELIAZ, N.; AHARONI, A.; OLSZEWSKI, N.E.; ESHED, Y.; WEISS, D. Uncovering DELLA-independent gibberellin responses by characterizing new tomato *procera* mutants. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 27, p. 1579-1594, 2015.

LONG, J.A.; MOAN, E.I.; MEDFORD, J.I.; BARTON, M.K. A member of the *KNOTTED* class of homeodomain proteins encoded by the *SHOOTMERISTEMLESS* gene of *Arabidopsis*. **Nature**, London, v. 379, p.66-69, 1996.

LUCATTI, A.F.; VAN HEUSDEN, A.W.; DE VOS, R.C.H.; VISSER, R.G.F.; VOSMAN, B. Differences in insect resistance between tomato species endemic to the Galapagos Islands. **BMC Evolutionary Biology**, New York, v. 13, doi:10.1186/1471-2148-13-175, 2013.

MAGNANI, E.; HAKE, S. *KNOX* Lost the OX: The *Arabidopsis KNATM* gene defines a novel class of *KNOX* transcriptional regulators missing the homeodomain. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 20, p. 875-887, 2008.

MAKAREVITCH, I.; THOMPSON, A.; MUEHLBAUER, G.J.; SPRINGER, N.M. *Brd1* gene in maize encodes a brassinosteroid C-6 oxidase. **PLoS ONE**, 7: e30798, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0030798.

MARTÍ, E.; GISBERT, C.; BISHOP, G.J.; DIXON, M.S.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.L. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, p. 2037-2047, 2006.

MARTÍN-TRILLO, M.; CUBAS, P. *TCP* genes: a family snapshot ten years later. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 15, p. 31-39, 2009.

MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYATUV, S.; SHALEV, G.; ASHRI, A.; ELKIND, Y.; LEVY, A. A new model system for tomato genetics. **The Plant Journal**, Oxford, v. 12, p. 1465-147, 1997.

MONNA, L.; KITAZAWA, N.; YOSHINO, R.; SUZUKI, J.; MASUDA, H.; MAEHARA, Y.; TANJI, M.; SATO, M.; NASU, S.; MINOBE, Y. Positional cloning of rice semidwarfing gene, *sd-1*: rice “Green Revolution Gene” encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis. **DNA Research**, Tokyo, v. 9, p. 11-17, 2002.

MULTANI, D.S.; BRIGGS, S.P.; CHAMBERLIN, M.A.; BLAKESLEE, J.J.; MURPHY, A.S.; JOHAL, G.S. Loss of an MDR transporter in compact stalks of maize *br2* and sorghum *dw3* mutants. **Science**, Washington, v. 302, p. 81-84, 2003.

MURASE, K.; HIRANO, Y.; SUN, T.; HAKOSHIMA, T. Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. **Nature**, London, v. 456, p. 459-463, 2008.

NAZ, A.A.; RAMAN, S.; MARTINEZ, C.C.; SINHA, N.R.; SCHMITZ, G.; THERES, K. *Trifoliata* encodes an MYB transcription factor that modulates leaf and shoot architecture in tomato. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 110, p. 2401-2406, 2013.

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

PENG, J.; RICHARDS, D.E.; HARTLEY, N.M.; MURPHY, G.P.; DEVOS, K.M.; FLINTHAM, J.E.; BEALES, J.; FISH, L.J.; WORLAND, A.J.; PELICA, F.; SUDHAKAR, D.; CHRISTOU, P.; SNAPE, J.W.; GALE, M.D.; HARBERD, N.P. ‘Green revolution’ genes encode mutant gibberellin response modulators. **Nature**, London, v. 400, p. 256-261, 1999.

PERALTA, I.E.; SPOONER, D.M.; KNAPP, S. Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; Solanaceae). **Systematic Botany Monographs**, Ann Arbor, v. 84, 2008. 186p.

PETTI, C.; HIRANO, K.; STORK, J.; DEBOLT, S. Mapping of a cellulose deficient mutant named *dwarf1-1* in *Sorghum bicolor* to the ‘Green Revolution’ gene GA20-oxidase reveals a positive regulatory association between gibberellin and cellulose biosynthesis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 169, p. 705-716, 2015.

PINO, L.E.; LOMBARDI-CRESTANA, S.; AZEVEDO, M.S.; SCOTTON, D.C.; BORGIO, L.; QUECINI, V.; FIGUEIRA, A.; PERES, L.E.P. The *Rg1* allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato ‘Micro-Tom’ model system. **Plant Methods**, v. 6, 2010. doi:10.1186/1746-4811-6-23.

R CORE TEAM (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

RANJAN, A.; ICHIHASHI, Y.; SINHA, N.R. The tomato genome: implications for plant breeding, genomics and evolution. **Genome Biology**, London, v. 13, doi:10.1186/gb-2012-13-8-167, 2012.

REIS, R.S.; HART-SMITH, G.; EAMENS, A.L.; WILKINS, M.R.; WATERHOUSE, P.M. Gene regulation by translational inhibition is determined by Dicer partnering proteins. **Nature Plants**, v.1, 14027. doi: 10.1038/nplants.2014.27, 2015.

RICK, C.M. Genetic and systematic studies on accessions of *Lycopersicon* from the Galápagos Islands. **American Journal of Botany**, New York, v. 43, p. 687-696, 1956.

RICK, C.M. Some plant-animal relations on the Galápagos Islands. *In*: Bowman, R.I. (Ed.). **Galapagos**. Berkley: University of California Press, 1966. p. 215-224.

RICK, C.M. Fruit and pedicel characters derived from Galápagos tomatoes. **Economic Botany**, New York, v. 21, p. 171-184, 1967.

RICK, C.M. The tomato. **Scientific American**, New York, v. 239, p. 67-76, 1978.

RICK, C.M. Biosystematic studies in *Lycopersicon* and closely related species of *Solanum*. *In*: HAWKES, J.G.; LESTER, R.N.; SKELDING, A.D. (Ed). **The biology and taxonomy of Solanaceae**. New York: Academic Press, 1979. p. 667-677.

RICK, C.M. *Petroselinum* (*Pts*), a new marker for chromosome 6. **Tomato Genetics Cooperative Report**, Davis, v. 30, p. 32, 1980.

RICK, C.M.; BOWMAN, R.I. Galápagos tomatoes and tortoises. **Evolution**, Lancaster, v. 15, p. 407-417, 1961.

RICK, C.M.; FOBES, J.F. Allozymes of Galápagos tomatoes: polymorphism, geographic distribution, and affinities. **Evolution**, Lancaster, v. 29, p. 443-457, 1975 a.

RICK, C.M.; FOBES, J.F. Allozyme variation in the cultivated tomato and closely related species. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, New York, v. 102, p. 376-384, 1975 b.

RICK, C.M.; HOLLE, M. Andean *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*: genetic variation and its evolutionary significance. **Economic Botany**, New York, v. 44, p. 69-78, 1990.

RONEN, G.; CARMEL-GOREN, L.; ZAMIR, D.; HIRSCHBERG, J. An alternative pathway to β -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of *Beta* and *old-gold* color mutations in tomato. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 97, p. 11102-11107, 2000.

RUSH, D.W.; EPSTEIN, E. Genotypic responses to salinity. **Plant Physiology**, Rockville, v. 57, p. 162-166, 1976.

RUSH, D.W.; EPSTEIN, E. Comparative studies on the sodium, potassium, and chloride. Relations of a wild halophytic and a domestic salt-sensitive tomato species. **Plant Physiology**, Rockville, v. 68, p. 1308-1313, 1981 a.

RUSH, D.W.; EPSTEIN, E. Breeding and selection for salt tolerance by incorporation of wild germplasm into a domestic tomato. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 106, p. 699-704, 1981b.

SAMACH, A; LOTAN, H. The transition to flowering in tomato. **Plant Biotechnology**, Oxford, v. 24, p. 71-82, 2007.

SASAKI, A.; ASHIKARI, M.; UEGUCHI-TANAKA, M.; ITOH, H.; NISHIMURA, A.; SWAPAN, D.; ISHIYAMA, K.; SAITO, T.; KOBAYASHI, M.; KHUSH, G.S.; KITANO, H.; MATSUOKA, M. Green revolution: A mutant gibberellin-synthesis gene in rice. **Nature**, London, v. 416, p. 701-702, 2002.

SCOTT, J.W.; HARBAUGH, B.K. Micro-Tom: a miniature dwarf tomato. **Florida Agricultural Experiment Station Circular**, Gainesville, v. 370, p. 1-6, 1989.

SESTARI, I; ZSÖGÖN, A; REHDER, GG; TEIXEIRA, LL; NMA, HASSIMOTTO; PURGATTOC, E; BENEDITO, VA; PERES, LEP. Near-isogenic lines enhancing ascorbic acid, anthocyanin and carotenoid content in tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) as a tool to produce nutrient-rich fruits. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 175, p. 111-120, 2014.

SINHA, N.R.; WILLIAMS, R.E.; HAKE, S. Overexpression of the maize homeobox gene, *KNOTTED-1*, causes switch from determinate to indeterminate cell fates. **Genes and Development**, New York, v. 7, p. 787-795, 1993.

SMITH, L.G.; GREENE, B.; VEIT, B.; HAKE, S. A dominant mutation in the maize homeobox gene, *Knotted-1*, causes its ectopic expression in leaf cells with altered fates. **Development**, Cambridge, v. 116, p. 21-30, 1992.

SPIELMEYER, W.; ELLIS, M.H.; CHANDLER, P.M. *Semidwarf (sd-1)*, “green revolution” rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 99, p. 9043-9048, 2002.

STOMMEL, J.R.; HAYNES, K.G. Inheritance of beta carotene content in the wild tomato species *Lycopersicon cheesmanii*. **The Journal of Heredity**, Washington, v. 85, p. 401-404, 1994.

SUZUKI, T.; INAGAKI, S.; NAKAJIMA, S.; AKASHI, T.; OHTO, M.A.; KOBAYASHI, M.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; KATO, T.; TABATA, S.; NAKAMURA, K.; MORIKAMI, A. A novel Arabidopsis gene *TONSOKU* is required for proper cell arrangement in root and shoot apical meristems. **The Plant Journal**, Oxford, v. 38, p. 673-684, 2004.

TANKSLEY, S.D.; KHUSH, G.S. Charles Madera Rick: 1915-2002. A Biographical Memoir. **Biographical Memoir**, Washington, v. 84, 2003. Disponível em: <http://www.nasonline.org/publications/biographical-memoirs/memoir-pdfs/rick-charles-m-jr.pdf>.

TANKSLEY, S.D.; GANAL, M.W.; PRINCE, J.P.; DE VICENTE, M.C.; BONIERBALE, M.W.; BROUN, P.; FULTON, T.M.; GIOVANNONI, J.J.; GRANDILLO, S.; MARTIN, G.B.; MESSEGUER, R.; MILLER, J.C.; MILLER, L.; PATERSON, A.H.; PINEDA, O.; RIIDER, M.S.; WING, R.A.; WU, W.; YOUNG, N.D. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. **Genetics**, Bethesda, v.. 132, n? ; p. 1141-1160, 1992.

THE TOMATO GENOME CONSORTIUM. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. **Nature**, London, v. 485, p. 635-641, 2012.

TRIANO, S.R.; ST. CLAIR, D.A. Processing tomato germplasm with improved fruit soluble solids content. **Hortscience**, St. Joseph, v. 30, p. 1477-1478, 1995.

UEGUCHI-TANAKA, M.; ASHIKARI, M.; NAKAJIMA, M.; ITOH, H.; KATOH, E.; KOBAYASHI, M.; CHOW, T.Y.; HSING, Y.I.; KITANO, H.; YAMAGUCHI, I.; MATSUOKA, M. *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1* encodes a soluble receptor for gibberellin. **Nature**, London, v. 437, p. 693-698, 2005.

VENDEMIATTI, E. **Compreendendo a via de desenvolvimento de tricoma glandular em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) utilizando mutantes e variações genéticas naturais**. 2015. 92p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2015.

VICENTE, M.H.; ZSÖGÖN, A.; DE SÁ, A.F.L.; RIBEIRO, R.V.; PERES, L.E.P. Semi-determinate growth habit adjusts the vegetative-to-reproductive balance and increases productivity and water-use efficiency in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 177, p. 11-19, 2015.

WARNOCK, S.J. Natural habitats of *Lycopersicon* species. **Hortscience**, St. Joseph, v. 26, p. 466-471, 1991.

XING, A.; GAO, Y.; YE, L.; ZHANG, W.; CAI, L.; CHING, A.; LLACA, V.; JOHNSON, B.; LIU, L.; YANG, X.; KANG, D.; YAN, J.; LI1, J. A rare SNP mutation in *Brachytic2* moderately reduces plant height and increases yield potential in maize. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, p. 3791-3802, 2015.