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

**Compreendendo a via de desenvolvimento de tricoma glandular em
tomateiro (*Solanum lycopersicum*) utilizando mutantes e variações
genéticas naturais**

Eloisa Vendemiatti

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

**Piracicaba
2015**

Eloisa Vendemiatti
Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas

**Compreendendo a via de desenvolvimento de tricoma glandular em tomateiro
(*Solanum lycopersicum*) utilizando mutantes e variações genéticas naturais**

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

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

**Piracicaba
2015**

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

Vendemiatti, Eloisa

Compreendendo a via de desenvolvimento de tricoma glandular em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) utilizando mutantes e variações genéticas naturais / Eloisa Vendemiatti. - - Piracicaba, 2015.

92 p. : il.

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

1. Tricomas 2. Tomateiro 3. Herbivoria 4. Micro-Tom I. Título

CDD 635.642
V483c

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

Ao meu avô Francisco pelo orgulho e
alegria que sente de todas minhas
conquistas.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente no meu dia-a-dia colocando sempre pessoas iluminadas em meu caminho.

Aos meus pais, Leila e Vanderlei, pelo amor e apoio incondicional e pela paciência em todos os momentos difíceis.

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ e ao Programa de Pós Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas pela oportunidade e a estrutura física oferecidas para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Lázaro E. Pereira Peres, pela orientação, amizade e confiança em mim depositada para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Walter Bernardi e à Empresa Nunhems do Brasil pela ajuda e disponibilidade na elaboração de alguns experimentos.

Aos Prof. Vagner Benedito e Stephen DiFazio, da West Virginia University, pela disponibilidade, paciência e ajuda com a análise de dados de sequenciamento.

Ao Prof. Fábio T. S. Nogueira e ao Geraldo F. Silva pela ajuda nos experimentos de RT-PCR e pelas discussões sempre muito produtivas.

Ao Dr. Leonardo S. Boiteux pelas ideias, discussões e disponibilidade em nos ajudar com alguns experimentos.

Ao Dr. Lucas Cutri pelo companhia no nosso “trichome team”. Muito obrigada pela ajuda e amizade em todos os momentos.

Ao Dr. Agustin Zsögön pela ajuda na correção deste trabalho.

À doutoranda Maísa de Siqueira pela condução dos experimentos de regeneração.

Ao amigo Frederico Almeida de Jesus pelo trabalho nas imagens de microscopia de varredura.

À querida Cássia Figueiredo por todo suporte que nos é oferecido.

À CAPES e FAPESP pela concessão da bolsa de estudos.

Aos amigos Marcela Notini, Stevan Bordignon, Maísa de Siqueira, Mateus Vicente, Frederico de Jesus e João Pedro Bernardes pela amizade, apoio e companheirismo que vão muito além das portas do laboratório.

Aos colegas Guilherme Oliveira, Ariadne Felício, Joni Lima, Ignácio Achon, Jonata Freschi, Luan Clemente e Mariana Azevedo pela amizade e colaboração.

Aos alunos do Laboratório de Genética Molecular de Desenvolvimento Vegetal:
Geraldo Silva, Éder Marques, João Paulo Corrêa, Ailton Carvalho, Carlos Barreira e
Antoine Gady pela amizade e discussões sempre muito produtivas.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”

(George Bernard Shaw)

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	15
1.1 Tricomas e o gênero <i>Solanum</i>	15
1.2 Mutantes e variações naturais no estudo de tricomas.....	18
Referências.....	20
2 PERDA DO TRICOMA GLANDULAR DO TIPO IV EM TOMATEIRO (<i>Solanum lycopersicum</i>) É UMA CARACTERÍSTICA HETEROCRÔNICA QUE PODE SER REVERTIDA POR GENES DE JUVENILIDADE.....	23
Resumo.....	23
Abstract.....	23
2.1 Introdução.....	24
2.2 Material e Métodos.....	26
2.2.1 Material Vegetal.....	26
2.2.2 Fenotipagem de Tricomas.....	27
2.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	28
2.2.4 Análises de Expressão Gênica Relativa.....	28
2.3 Resultados e Discussão.....	29
2.4 Conclusões.....	38
Referências.....	38
3 CARACTERIZAÇÃO E MAPEAMENTO DE <i>Galapagos enhanced trichomes</i> (<i>Get</i>), UMA VARIAÇÃO GENÉTICA NATURAL CONTROLANDO A PRESENÇA DE TRICOMAS GLANDULARES DO TIPO IV EM TOMATEIRO.....	43
Resumo.....	43
Abstract.....	43
3.1 Introdução.....	44
3.2 Material e Métodos.....	45
3.2.1 Material Vegetal.....	45
3.2.2 Fenotipagem de tricomas.....	46
3.2.3 Determinação de Massa Seca, Altura do Ramo Principal e Índice de Ramificação	47
3.2.4 Determinação da Produtividade e Conteúdo de Sólidos Solúveis (°Brix).....	47
3.2.5 Quantificação de Acilaçúcar.....	47

3.2.6 Testes de Herbivoria com <i>Bemisia tabaci</i> e <i>Tuta absoluta</i>	48
3.2.7 Caracterização do Duplo Mutante <i>GetXWo</i>	49
3.2.8 Teste de Regeneração de Raízes <i>in vitro</i>	49
3.2.9 Sequenciamento da Linhagem de plantas <i>Get</i>	50
3.2.10 Extração de DNA genômico e desenvolvimento de marcadores CAPS.....	50
3.3 Resultados e Discussão.....	53
3.4 Conclusão.....	71
Referências.....	71
4 CONCLUSÃO GERAL.....	75
ANEXOS.....	77

RESUMO

Compreendendo a via de desenvolvimento de tricoma glandular em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) utilizando mutantes e variações genéticas naturais

Os tricomas são estruturas de origem epidérmicas que podem ser classificados em dois tipos: glandulares e não glandulares (tectores) e estão relacionados, principalmente, com estratégias de defesas de plantas. Pouco se conhece sobre a via de desenvolvimento dos tricomas glandulares, já que a maior parte dos estudos é em *Arabidopsis thaliana*, modelo no qual os tricomas glandulares são ausentes. O gênero *Solanum* possui uma grande diversidade de tricomas, em especial glandulares (tipos I, IV, VI e VII). O estudo de tais estruturas vem ganhando cada vez mais destaque, já que são fontes de diversos metabólitos secundários de importância econômica e ecológica. Espécies selvagens são consideradas recursos genéticos para o tomateiro (*S. lycopersicum*), tais como *S. galapagense*, a qual possui variações genéticas naturais que lhe confere maior resistência ao ataque de herbívoros. Entre essas variações está a presença de tricomas glandulares do tipo IV, uma fonte do aleloquímico acilaçúcar. A ausência de tricomas glandulares do tipo IV é considerada uma das causas da suscetibilidade do tomateiro cultivado a insetos. No presente trabalho, foi demonstrado que o tomateiro cultivado na verdade forma tricomas do tipo IV, mas estas estruturas estão presentes somente até o primeiro par de folhas, além dos cotilédones. Desse modo, a presença de tricomas tipo IV em espécies selvagens seria considerada uma neotenia, ou seja, a manutenção de estruturas juvenis na fase adulta. Além de se determinar que mutantes de tomateiro afetando a juvenilidade (e.g. *Mouse ears* e *fasciated*) apresentam tricomas tipo IV na fase adulta, a formação dessas estruturas correlacionou-se com a expressão de *miR156*, sendo também presentes em grandes quantidades em uma linhagem transgênica superexpressando esse micro RNA relacionado à juvenilidade. Quanto à base genética da presença de tricomas tipo IV nas espécies selvagens, no presente trabalho foi criada uma linhagem quase isogênica ao modelo genético Micro-Tom (MT) contendo a variação genética natural por nós denominada *Galapagos enhanced trichomes* (*Get*). Tal variação é derivada de *S. galapagense* e condiciona a presença de tricomas tipo IV em folhas adultas, quando introgridida em tomateiro cultivado (cv. Micro-Tom). O mapeamento preliminar de *Get* no cromossomo 2 de tomateiro também foi realizado através do mapa de “single nucleotide polymorphism” (SNPs) entre MT e a linhagem MT-*Get*. A eventual clonagem de *GET* irá contribuir não somente para se desvendar a base genética da formação de tricomas glandulares, como também contribuir para se criar variedades resistentes a insetos, reduzindo o uso de agrotóxicos.

Palavras-chave: Tricomas; Tomateiro; Herbivoria; Micro-Tom

ABSTRACT

Understanding the glandular trichomes development pathway in tomato (*Solanum lycopersicum*) using mutants and natural genetic variations

Trichomes are epidermal structures that can be classified into two types: glandular or non-glandular, and they are mainly related to plant defense strategies. Little is known about the glandular trichome development pathway, since most of the studies are in *Arabidopsis thaliana*, a model in which this kind of trichome is absent. The *Solanum* genus has a wide variety of trichomes, especially glandular ones (Types I, IV, VI and VII). The study of these structures are gaining more prominence, since they are sources of several secondary metabolites of economic and ecological importance. Wild species are considered genetic resources for tomato (*S. lycopersicum*), such as *S. galapagense* which has natural genetic variations that gives resistance to herbivores attack. Among these variations is the presence of type IV glandular trichomes, a source of the acyl sugar allelochemical. The absence of type IV glandular trichomes is considered to be one of the causes of tomato susceptibility to insects. In this study, it was determined that tomato actually has type IV trichomes, but these structures are present only in the cotyledons and the first pair of leaves. Thus, the presence of type IV trichomes in wild species would be considered a neotenic feature, *i.e.* the maintenance of juvenile structures in adulthood. In addition, it was determined that tomato mutants affecting youthfulness (*e.g.* *Mouse ears* and *fasciated*) have type IV trichomes in adulthood. Moreover, the presence of these structures was correlated with the expression of *miR156*, besides the increased formation of type IV trichomes in a transgenic line overexpressing this micro RNA related to youthfulness. On the genetic basis of type IV trichomes presence in wild species, in this work it was created a near isogenic line (NIL) containing the natural genetic variation here named *Galapagos enhanced trichomes* (*Get*). This variation is derived from *S. galapagense* and harbors type IV trichomes in adult leaves, when introgressed in cultivated tomato (cv. Micro-Tom). The preliminary genetic map of *Get* in the tomato chromosome 2 was conducted through the analysis of “single nucleotide polymorphism” (SNPs) between MT and MT-*Get*. The eventual cloning of *GET* will contribute not only to unravel the genetic basis of glandular trichomes formation, but will also contribute to create varieties resistant to insects, reducing the pesticides use.

Keywords: Trichomes; Tomato; Herbivory; Micro-Tom

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Tricomas e o gênero *Solanum*

As plantas, como organismos sésseis, criaram diferentes estratégias de defesa que afastam as pragas que podem lhe causar danos (PEIFFER et al., 2009). Uma destas estratégias é a presença de tricomas que, de acordo com Levin (1973), são apêndices que se estendem da epiderme dos tecidos aéreos. Eles podem variar em densidade ou forma de uma espécie para outra. São classificados de acordo com diversas características: número de células (uni ou pluricelulares), formato (retos, espiralados, em forma de gancho, simples, peltados, ou estrelados) e, principalmente, de acordo com a presença ou ausência de glândula secretora (glandulares ou não-glandulares/ tectores) (GLAS et al., 2012).

Dentre as funções atribuídas a essas estruturas podemos citar a redução da perda de água, aumento da tolerância a condições de estresse abiótico, como temperaturas extremas e irradiação ultravioleta, e proteção contra o ataque de patógenos e pequenos insetos (YANG; YE, 2013). Com o enfoque na resistência contra a herbivoria, sabe-se que os tricomas desempenham essa tarefa por duas barreiras: a física, desempenhada pelos tricomas tectores, que dificultam desde o pouso até a locomoção de pequenos predadores; e a química, função dos tricomas glandulares que produzem substâncias repelentes e/ou tóxicas aos herbívoros (LARA, 1991).

Atualmente, muito se sabe de tricomas em *Arabidopsis thaliana*, modelo no qual o assunto encontra-se bastante elucidado. Porém, o único tipo de tricoma presente na espécie é o unicelular não-glandular ramificado, cuja formação obedece três estágios: determinação do destino celular, especificação celular e morfogênese (HÜLSKAMP et al., 1994). Essas fases são ativadas positivamente por genes de 3 famílias: proteínas WD40 (TRANSPARENT TESTA GLABRA1 -TTG1), proteínas bHLH (basic helix-loop-helix – GLABRA3, ENHANCER OF GLABRA3, TRANSPARENT TESTA e MYC-1) e fatores de transcrição do tipo MYB (GLABRA1, MYB23 e MYB5). Essas proteínas agem de maneira parcialmente redundantes, formando um complexo ativador conhecido como MYB-bHLH-WD40 (MBW) que se liga ao promotor de GLABRA2 (GL2), o qual codifica um homeodomínio requerido na fase da morfogênese (endoreduplicação, ramificação e maturação da parede celular). Alguns dos reguladores negativos já descrito são proteínas MYB single-

repeat (CAPRICE, TRIPTYCHON, ENHANCED OF TRY e CPC 1, 2, 3 e TRICHOMELESS1 e 2) (YANG; YE, 2013; HAUSER, 2014).

No entanto, pouco se conhece a respeito dos tricomas multicelulares, principalmente do tipo glandular. Os tricomas glandulares possuem células metabolicamente ativas, com a capacidade de secretar ou estocar grandes quantidades de metabólitos especializados (TISSIER, 2012). Essa característica torna os tricomas glandulares comercialmente importantes, já que esses metabólitos são utilizados por diversos segmentos industriais, tais como o farmacêutico - a droga antimalárica conhecida como artemisinina (*Artemisia annua*) e compostos canabinóides (*Cannabis sativa*); o de cosméticos e alimentícios – que usam derivados extraídos de *Mentha spicata*, *Salvia officinalis*, *Lavandula angustifolia* e *Ocimum basilicum*.

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) tem sido proposto como um dos melhores modelos atuais para o estudo do controle da identidade dos tricomas glandulares (GOFFREDA et al., 1988). Dentre as vantagens do tomateiro como modelo, temos seu genoma relativamente pequeno (950 Mb) e já sequenciado (The Tomato Genome Consortium, 2012), existência de bancos de mutantes e linhagens de introgressão (ESHED; ZAMIR, 1995; PINO-NUNES et al., 2009), disponibilidade de protocolos de transformação eficientes (SUN et al., 2006; PINO et al., 2010), vastos conhecimentos fisiológicos e bioquímicos adquiridos ao longo de muitos anos de estudos de melhoramento, além do fato de poder ser utilizada a cultivar Micro-Tom (MT), proposta como modelo por Meissener et al. (1997). Por se tratar de plantas de pequeno porte (aproximadamente 15 cm) e ciclo de vida mais curto (90-120 dias de semente a semente), a utilização dessa cultivar permitiu o trabalho em espaços limitados, proporcionando respostas relativamente mais rápidas (CAMPOS et al., 2010). Além disso, o tomateiro tem vantagens como modelo por se tratar de uma das culturas mundialmente mais importantes (CROIZER et al., 1997). Em 2013, a produção mundial de tomate de mesa e indústria totalizou 163,963 t, em área cultivada de 4,72 milhões de ha e produtividade média de 34,7 t ha⁻¹ (FAOSTAT, 2015). Porém, é considerada de grande risco, já que é alvo de pragas diversas e necessita de grandes aportes de agroquímicos na tentativa de minimizar as perdas (CAMPOS et al., 2009).

Assim, alinhado à busca de insights sobre o desenvolvimento de tricomas glandulares, estuda-se também a resistência baseada nos tricomas da planta

hospedeira, que é uma abordagem relativamente nova com potencial na redução de utilização de pesticidas, aumentando a sustentabilidade da cultura e reduzindo os efeitos negativos associados ao uso de agroquímicos (SIMMONS; GURR, 2005).

O tomateiro cultivado apresenta tipos diversos de tricomas revestindo quase que a totalidade de sua superfície externa. Porém, seus tricomas glandulares não produzem aleloquímicos em quantidades suficientes para se tornar resistente às suas principais pragas. Contudo, algumas espécies selvagens relacionadas ao tomateiro podem ser fontes de alto conteúdo de aleloquímicos, como ocorre em *Solanum habrochaites* (antigo *Lycopersicon hirsutum*), o qual produz altas quantidades de zingibereno (ZGB) e metilcetonas (MK) (SIMMONS; GURR, 2005; BLEEKER et. al., 2009), ou *Solanum pennelli* e *Solanum galapagense* (antigo *L. cheesmanii* f. *minor*), os quais possuem folhas pegajosas típicas de acúmulo de acilaçúcares (AS) (LIEDL et al, 1995; BLAUTH et al., 1998). Os tricomas do tomateiro cultivado e das espécies selvagens relacionadas apresentam considerável variação em número, tipo e tamanho. Luckwill (1943) os classificou em tectores (tipos III e V) e glandulares (tipos I, IV, VI, VII) (Tabela 1).

Tabela 1 - Descrição dos tricomas de *Solanum lycopersicum* de acordo com Luckwill (1943).

Tipo		Base	Haste	Tamanho	Glândula
I		Multicelular globular	Formada por 6-10 células	2-3 mm	Única
III		Unicelular plana	Formada por 4-8 células	0,4-1 mm	Não-glandular
IV		Unicelular plana	Formada por até 3 células	0,2-0,4 mm	Única
V		Unicelular plana	Formada por até 3 células	0,2-0,4 mm	Não-glandular
VI		Unicelular plana	Formado por 2 células	-	4 células secretoras
VII		Unicelular plana	-	0,05 mm	4-8 células secretoras

*Adaptado de GLAS et al., 2012

Em um trabalho prévio, onde diversos mutantes hormonais quase isogênicos ao modelo MT foram utilizados, verificou-se que as principais classes hormonais relacionadas com a formação de tricomas foram o ácido jasmônico e o brassinoesteróide (CAMPOS et al., 2009). Desse modo, mutantes deficientes em brassinoesteróide (BR) apresentaram alta densidade de tricomas glandulares, a qual se correlacionou com o aumento na produção do aleloquímico zingibereno (ou sesquiterpeno equivalente) e resistência à traça do tomateiro (*Tuta absoluta*). Por outro lado, o mutante insensível a ácido jasmônico apresentou fenótipo inverso, sendo epistático ao mutante deficiente em BR, como revelado em uma análise de duplos mutantes. No referido trabalho, a ausência de mutantes em tomateiro afetando citocinina, estrigolactona e ácido salicílico impediram que essas classes hormonais fossem testadas. A recente obtenção de plantas transgênicas afetando essas classes hormonais nos possibilitou testar o impacto das mesmas na produção de tricomas glandulares em tomateiro (ver Anexo 1). Contudo, tanto em Campos et al. (2009) quanto nos resultados aqui obtidos (Anexo 1), nenhuma mutação hormonal apresentou tricomas glandulares do tipo IV, já que esse tipo de tricoma não é presente no tomateiro cultivado (*S. lycopersicum*), mas somente em algumas espécies selvagens aparentadas, tais como *S. pennellii*, *S. habrochaites* e *S. galapagense* (GLAS et al., 2012). Sendo assim, uma alternativa para se conseguir linhagens de MT contendo tricomas do tipo IV, uma estrutura importante para a produção do aleloquímico acilaçúcar, seria a busca de variações genéticas naturais nas referidas espécies selvagens e introgridida em tomateiro cv. Micro-Tom.

1.2 Mutantes e variações naturais no estudo de tricomas

Atualmente, abordagens para o entendimento do desenvolvimento de um determinado órgão ou tecido vêm encontrando êxito quando mutantes são analisados (PFLIEGER et al., 2001). Um exemplo clássico foi a descoberta do modelo de identidade de órgãos florais em *Arabidopsis thaliana*, onde mutantes para caracteres homeóticos foram essenciais para a delineação do modelo ABC que determina os verticilos das flores nesta espécie (COEN; MEYEROWITZ, 1991).

Sob esta perspectiva, dentro do extenso gênero *Solanum*, é no tomateiro que se encontram mutantes que apresentam alterações bem definidas no padrão de seus tricomas. Porém, as pesquisas com abordagem genética (mutantes) em

Solanum apresentam limitações, uma vez que ao tamanho das plantas e de seus ciclos de vida relativamente longos não permitem estudos em curto prazo, gerando uma desvantagem em relação ao modelo vegetal *Arabidopsis*. Assim, a cultivar miniatura Micro-Tom (MT), criada para fins ornamentais (SCOTT; HARBAUGH, 1989), foi proposta por Meissner et al. (1997) como modelo para estudos genéticos em *Solanum lycopersicum*, pois é capaz de crescer em altas densidades devido ao pequeno porte e ciclo de vida curto.

Fazendo o uso dos benefícios desta cultivar, buscou-se, entre diversos mutantes e variações naturais (alelos introgrididos de espécies selvagens) disponíveis no background MT (www.esalq.usp.br/tomato), aqueles que demonstravam padrões alterados para densidade de tricomas e quantidade de aleloquímicos associados à defesa. Isolando mutantes candidatos, estudos visando desvendar possíveis lacunas do desenvolvimento de tricomas glandulares podem ser realizados.

Desse modo, os resultados desse trabalho vêm divididos em dois capítulos. O primeiro trata da perda do tricoma glandular do tipo IV em *S. lycopersicum* ao longo de seu desenvolvimento, a qual pode ser revertida por genes de juvenilidade. Já o segundo capítulo mostra a obtenção e caracterização de uma linhagem no background Micro-Tom que apresenta os tricomas do tipo IV em todas as fases do desenvolvimento. Tal linhagem foi obtida através de cruzamentos com *S. galapagense*, uma espécie selvagem relacionada ao tomateiro endêmica das Ilhas Galápagos. Essa é uma abordagem bastante promissora, pois as diferenças alélicas entre o tomateiro cultivado e as espécies selvagens relacionadas podem refletir divergências adaptativas e estratégias ecológicas moldadas pela gama de ambientes onde essas espécies evoluíram. A introgressão de tais alelos no modelo genético Micro-Tom e a comparação do efeito deles utilizando linhagens quase isogênicas é uma oportunidade única para se isolar o efeito de um dado alelo de outros fatores complexos, além de facilitar sua futura clonagem e manipulação genética para estender seus benefícios a outras espécies.

Referências

BLAUTH, S.L.; CHURCHILL, G.A.; MUTSCHLER, M.A. Identification of quantitative trait loci associated with acylsugar accumulation using intraspecific populations of the wild tomato, *Lycopersicon pennellii*. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 96, p. 458-467, 1998.

BLEEKER, M.P.; DIERGAARDE, J.P.; AMENT, K.; GUERRA, J.; WEIDNER, M.; SCHUTZ, S.; BOTH, T.J.M.; HARING, A.M.; SCHUURINK, C.R. The role of specific tomato volatiles in tomato-whitefly interaction. **Plant Physiology**, Rockville, v. 151, p. 925-935, 2009.

CAMPOS, M.L. **Controle Hormonal da Defesa à herbivoria em tomateiro**. 2009. 117 p. Tese (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

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**, Philadelphia, v. 5, p. 267-270, 2010.

COEN, E.S.; MEYEROWITZ, E.M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. **Nature**, London, v.353, p.31-37, 1991.

CROZIER, A.; LEAN, M.E.J.; McDONALD, M.S.; BLACK, C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, p. 590-595, 1997.

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.

GLAS, J.R.; SCHIMMEL, B.C.J; ALBA, J.M.; ESCOBAR-BRAVO, R.; SCHUURINK, R.C.; KANT, M.R. Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v.13, p. 17076-17103, 2012.

GOFFREDA, J.C.; MUTSCHLER, M.A.; TINGEY, W.M. Feeding behavior of potato aphid affected by glandular trichomes of wild tomato. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Wezep, v. 48, p. 101-107, 1988.

HAUSER, M. Molecular basis of natural variation and environmental control of trichome patterning. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, e.00320, 2014.

HÜLSKAMP, M.; MISERA, S.; JÜRGENS, G. Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. **Cell**, Philadelphia, v.76, p. 555-566, 1994.

LARA, F. M. **Princípios de resistência de plantas aos insetos**. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1991. 336 p.

LEVIN, D.A. The role of trichomes in plant defense. **The Quarterly Review of Biology**, Chicago, v. 48, p. 3-15, 1973.

LIEDL, E.; LAWSON, D.M.; WHITE, K.K.; SHAPIRO, J.A.; COHEN, D.E.; CARSON, W.G.; TRUMBLE, J.; MUTSCHLER, M.A. Acylsugars of wild tomato *Lycopersicon pennellii* alters settling and reduces oviposition of *Bemisia argentifolli* (Homoptera: Aleyrodidae). **Journal of Economic Entomology**, Annapolis, v. 88, p. 742-748, 1995.

LUCKWILL, L.C. **The genus *Lycopersicon***: historical, biological, and taxonomic survey of the wild and cultivated tomatoes. Aberden: Aberden University Press, 1943. 44 p.

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. 1465-1472, 1997.

PEIFFER, M., TOOKER, J.F.; LUTHE, D.S.; FELTON, G.W. Plants on early alert: glandular trichomes as sensors for insect herbivores. **New Phytologist**, London, v. 184, p. 644-656, 2009.

PFLIEGER, S., LEFEBVRE, V.; CAUSSE, M. The candidate gene approach in plant genetics: a review. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.7, p.275-291, 2001.

PINO-NUNES, L.E.; FIGUEIRA, A.V.O.; TULMANN NETO, A.; ZSÖGÖN, A.; PIOTTO, F.A.; SILVA, J.A. Induced mutagenesis and natural genetic variation in tomato 'Micro-Tom'. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 821, p. 63–72, 2009.

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

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

SIMMONS, A.T.; GURR, G.M. Trichomes of *Lycopersion* species and their hybrids: effects on pests and natural enemies. **Agricultural and Forest Entomology**, Oxford, v. 7, p. 265-276, 2005.

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

TISSIER, A. Glandular trichomes: what comes after expressed sequence tags? **The Plant Journal**, Oxford, v. 70, p. 51-68, 2012

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

YANG, C.; YE, Z. Trichomes as models for studying plant cell differentiation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 70, p. 1937-1948, 2013.

2 PERDA DO TRICOMA GLANDULAR DO TIPO IV EM TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum*) É UMA CARACTERÍSTICA HETEROOCRÔNICA QUE PODE SER REVERTIDA POR GENES DE JUVENILIDADE

Resumo

Tricomas glandulares são estruturas com ampla distribuição e significado ecológico. No gênero *Solanum*, um papel particularmente relevante é atribuído aos tricomas do tipo IV, pois proporcionam resistência a insetos. Essas estruturas são conspicuamente ausentes no tomateiro cultivado (*Solanum lycopersicum*), mas são presentes em algumas espécies selvagens aparentadas. No presente trabalho foram utilizadas microscopia ótica e eletrônica de varredura para verificar a possível presença de tricomas tipo IV em uma série de cultivares comerciais bem conhecidas de tomateiro: Ailsa Craig, M82, Moneymaker e VFNT Red Cherry. Embora nunca se tenha relatado a presença de tricomas do tipo IV nas folhas de plantas adultas dessas cultivares, esses foram encontrados em folhas embrionárias (cotiledonares) de todas elas. A análise de uma série de folhas na cultivar modelo Micro-Tom (MT) mostrou que a presença desse tipo de tricoma glandular é restrita aos cotilédones e ao primeiro par de folhas verdadeiras. Isso sugere que o tricoma do tipo IV é uma característica juvenil que é perdida em plantas adultas. A análise de linhagens quase isogênicas (NILs) a MT contendo as mutações clássicas *Woolly* (*Wo*), *Lanata* (*Ln*), *hair absent* (*h*) e *hairless* (*hl*) mostrou que, apesar de alguns desses mutantes (*Wo* e *Ln*) apresentarem aumento na densidade de tricomas não glandulares (tipos III e V) ou glandulares do tipo VI (*h*), nenhum deles possuía tricomas IV em folhas de plantas adultas. Por outro lado, NILs contendo as mutações que provocam alterações no desenvolvimento foliar, como os mutantes *Mouse ears* (*Me*), *fasciated* (*fas*) e uma linhagem transgênica superexpressando o micro-RNA *miR156*, apresentaram tricoma do tipo IV em folhas de plantas adultas. No genótipo controle MT, a expressão de *miR156* e seus alvos, *SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE* (*SPLs*), correlacionam-se inversamente com a idade da folha e a presença do tricoma tipo IV. Em conjunto, esses resultados mostram que, contrariamente ao conhecimento estabelecido, o tomateiro cultivado possui tricomas do tipo IV, sendo essa capacidade ontogênica perdida durante o desenvolvimento. Isso sugere que a presença desse tipo de tricoma em folhas maduras de espécies selvagens relacionadas ao tomateiro pode ser devido a alterações neotênicas, provocada por mutações em genes que promovem a juvenilidade.

Palavras-chave: Tomateiro; Tricomas; Juvenilidade; *miR156*

Abstract

Glandular trichomes are structures with widespread distribution and ecological significance. In the *Solanum* genus a particularly relevant role is ascribed to glandular trichomes type IV, providing resistance to pest insect. This trichome is conspicuously absent in cultivated tomato (*Solanum lycopersicum*) and present in some of its wild relatives. In the present study, we used optical and scanning electron microscopy to

screen a series of well-known commercial tomato cultivars: Ailsa Craig, M82, Moneymaker and VFNT Red Cherry for the presence of type-IV trichome. Although the presence of type IV trichomes has never been reported on adult leaves of these cultivars, they were found on embryonic leaves (cotyledons) of them all. The serial analysis of leaves in the model cultivar tomato Micro-Tom (MT) showed that type-IV trichome presence is restricted to cotyledons and the first pair of true leaves. This suggests that type-IV trichomes are a juvenile trait that is lost in adult plants. The analysis of near isogenic lines (NILs) in MT containing the classical mutations *Woolly* (*Wo*), *Lanata* (*Ln*), *hair absent* (*h*) and *hairless* (*hl*) showed that although some of these mutations (*Wo* e *Ln*) have increased density of non-glandular trichomes (types III and V) or glandular type VI (*h*), none had IV trichomes on leaves of adults plants. On the other hand, NILs containing mutations that cause changes in leaf developmental, such as the mutant *Mouse ears* (*Me*), *fasciated* (*fas*) and an overexpression transgenic line for micro-RNA *miR156*, presented type-IV trichomes in adult leaves. In wild-type MT, the expression of *miR156* and their targets, SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE (SPLs), was inversely correlated with leaf age and presence of type-IV trichomes. Together these results show that, contrary to established knowledge, the cultivated tomato has type-IV trichomes and lost this ontogenetic capacity during development. This suggests that the presence of type-IV trichome on mature leaves of wild tomato species may be due to changes caused by mutations in genes that promote youthfulness.

Keywords: Tomato; Trichomes; Youthfulness; *miR156*

2.1 Introdução

Tricomas (do grego “*trichos*”, que significa pelos) é a denominação dada às estruturas originadas a partir da epiderme de órgãos de origem caulinar na maioria das plantas terrestres. Os tricomas podem ser compostos por uma ou um conjunto de células e são classificados em dois tipos: glandulares e não-glandulares, sendo esses últimos também chamados de tectores (HÜLSKAMP, 2004). Essas estruturas realizam funções de proteção a diversos tipos de estresses abióticos (e.g. resistência ao congelamento, redução da perda de água e da irradiação UV), além de serem as principais ferramentas contra o ataque de insetos (MAURICIO; RAUSHER, 1997).

Arabidopsis thaliana foi o modelo mais amplamente usado nos estudos de tricomas. Essa espécie possui tricomas tectores unicelulares, que passam por seis estádios de desenvolvimento morfológico: seleção de uma célula da protoderme que se expande radialmente, desenvolvimento da haste principal, formação da ramificação, expansão dos ramos e da haste, desenvolvimento das terminações pontiagudas e maturação com a formação de uma superfície papilada (CHEN et al., 2014). O controle genético de cada fase está bem caracterizado, e sabe-se que elas

são ativadas por genes de 3 famílias: proteínas WD-repeat (TTG1), proteínas bHLH (basic helix-loop-helix – GL3 ou EGL3) e fatores de transcrição do tipo MYB (GL1); além de reguladas negativamente por proteínas MYB single-repeat (TRY, CPC, ETC1 e ETC2) (YANG; YE, 2013).

A base genética dos tricomas multicelulares, principalmente os glandulares, é, no entanto, muito pouco conhecida. Os tricomas glandulares apresentam grande interesse econômico por produzirem, secretarem e armazenarem uma grande quantidade de metabólitos secundários (SCHILMILLER et al, 2008). Tais metabólitos possuem importância ecológica na proteção contra herbivoria, além de sua relevância econômica na produção de cultivares resistentes a insetos ou na extração de compostos secundários de valor industrial (TISSIER, 2012). Por exemplo, tricomas glandulares são responsáveis pela produção da droga antimalárica artemisinina (*Artemisia annua*) (WEATHERS et al, 2011; LIU et al, 2011) e de diversos compostos das famílias Cannabaceae (*Humulus lupulus* e *Cannabis sativa*) e Lamiaceae (*Mentha spicata*, *Salvia officinalis*, *Lavandula angustifolia* e *Ocimum basilicum*) (SCHILMILLER et al., 2008).

Para tentar desvendar as bases genéticas do desenvolvimento de tricomas glandulares, o tomateiro (*Solanum lycopersicum*) vem se destacando como modelo, pois apresenta tricomas revestindo quase que a totalidade da superfície externa de folhas e caules (GOFFREDA et al., 1988; TISSIER, 2012). Os tricomas do tomateiro cultivado e das espécies selvagens relacionadas apresentam considerável variação em número, tipo e tamanho. Luckwill (1943) definiu sete tipos morfollogicamente distinguíveis de tricomas para o clado *Lycopersicum*, incluindo dois tipos tectores (III e V) e quatro tipos glandulares (tipos I, IV, VI, VII).

É consenso na literatura que o tricoma glandular do tipo IV, o qual é importante na defesa contra herbívoros (RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 2011; LUCATTI et al., 2013), é ausente em folhas de tomateiro cultivado (SIMMONS; GURR, 2005; GLAS et al., 2012). No entanto, sua presença é ubíqua em espécies selvagens interférteis com tomateiro, tais como *S. pennellii*, *S. galapagense* e *S. habrochaites* (SIMMONS; GURR, 2005; LUCATTI et al., 2013), além de alguns acessos de *S. pimpinellifolium* (FERNÁNDEZ-MUÑOZ et al., 2003).

No presente trabalho são apresentadas evidências de que o tomateiro cultivado possui tricomas glandulares do tipo IV, mas estes apenas podem ser encontrados em estágios iniciais do desenvolvimento da planta. Tais tricomas são

ausentes em mutantes clássicos de tomateiro com alterações no padrão de tricomas e presentes em mutantes ou linhas transgênicas com alterações que resultam em plantas adultas com aspectos juvenis. Esses dados apontam que as espécies de *Solanum* que retêm os tricomas tipo IV podem ser consideradas neotênicas, ou seja, com permanência na idade adulta de características típicas da sua forma jovem (BOX; GLOVER, 2010).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Material Vegetal

Todo o material vegetal utilizado nos experimentos foi cultivado na casa de vegetação do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal, pertencente ao Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ-USP. A casa de vegetação apresenta condições de temperatura controlada e irrigação automatizada. As plantas no porte MT foram cultivadas em vasos com capacidade para 150 g de substrato, constituído de uma proporção de 1:1 de Basaplant Hortaliças (Base Agro) + vermiculita expandida. Para cada 1L desta mistura foi adicionado calcário (4g) e NPK 10-10-10 (1g na semeadura e 8 g no transplântio).

Para a realização do trabalho foram utilizados o parental selvagem *Solanum pennellii* LA716, as cultivares Ailsa Craig, M82, Moneymaker, VFNT Red cherry e Micro-Tom (MT), além dos mutantes/transgênicos *miR156-ox*, *Mouse ears* (*Me*), *fasciated* (*fas*), *Lanata* (*Ln*), *Wooly* (*Wo*), *hair absent* (*h*), *hairless* (*hl*) introgrididos no background MT. A obtenção das mutações *Me*, *fas*, *Ln*, *Wo*, *h* e *hl* no background MT foi realizada utilizando-se o procedimento de introgressão, conforme anteriormente descrito (PINO et al., 2010). As plantas transgênicas *miR156-ox* foram obtidas utilizando protocolo de transformação estabelecido em nosso laboratório (PINO et al., 2010) e descritas em publicação anterior (SILVA et al., 2014). Todos os genótipos utilizados encontram-se descritos na Tabela 1, de acordo com informações do site do laboratório (www.esalq.usp.br/tomato).

Tabela 1 - Genótipos utilizados no presente trabalho.

Genótipo	Efeito/ Função gênica	Origem	Referências
<i>Solanum pennellii</i> LA716	Espécie selvagem de tomateiro, oriunda do Peru.	TGRC*	Correll, 1962
Ailsa Craig	Cultivar de <i>S. lycopersicum</i> .	LA2838A	Maxon-Smith; Ritchie, 1983
M82	Cultivar de <i>S. lycopersicum</i> .	LA3475	-
MoneyMaker	Cultivar de <i>S. lycopersicum</i> .	LA2706	-
VFNT Red Cherry	Cultivar de <i>S. lycopersicum</i> .	LA2088	-
Micro-Tom (MT)	Cultivar de <i>S. lycopersicum</i> .	LA3911	Scott, 1999
<i>miR156-ox</i>	Transgênico em <i>S. lycopersicum</i> cv. MT	-	Silva et al., 2014
<i>Mouse ears</i>	Fator de transcrição do tipo Homeobox relacionado com extensão da atividade meristemática. Plantas com os alelos mutados apresentam maior quantidade de folíolos.	LA0715	Chen et al., 1997
<i>Fasciated</i>	Peptídeo sinal do tipo CLAVATA3	cv. Caqui	Xu et al. 2015
<i>Lanata</i>	Função gênica desconhecida. Apresenta excesso de tricomas no caule, folhas e frutos.	LA3128	-
<i>Wooly</i>	Homeodomínio leucina zíper (HD-zip) relacionado com o gene de Arabidopsis GL2 e PDF2 que regulam uma ciclina – SICyCB2. Seu fenótipo apresenta aumento de tricomas nas partes vegetativas da planta.	LA0715	YANG et al., 2011
<i>Hair absent</i>	Função gênica desconhecida. Ausência de tricomas tectores longos no hipocótilo e em pontos de crescimento.	LA1221 cv. VFNT cherry	-
<i>hairless</i>	Função gênica desconhecida. Planta frágil e tricomas deformados e escassos.	LA1109	KANG et al., 2010

*Tomato Genetics Resource Center

2.2.2 Fenotipagem de Tricomas

De folhas de diferentes idades foram retirados pequenos pedaços, no formato de fitas, que foram fixados em lâminas de vidro com esmalte incolor. Essas fitas foliares foram fotografadas perpendicularmente utilizando um suporte de isopor (para fixar a lâmina) e a lupa Leica S8AP0, em um aumento de 50x.

Para o experimento de quantificação das estruturas, fez-se a contagem dos tricomas a partir das imagens geradas. Foram utilizadas 10 plantas por genótipo,

com 4 repetições por planta para cada uma das faces foliares (n=40). Os dados foram analisados estatisticamente com o Teste - T pareado. A metodologia aqui utilizada difere da habitual contagem feita observando a superfície da folha, pois os tricomas só podem ser corretamente diferenciados a partir de sua observação por inteiro, o que somente é possível observando em vista lateral (VENDEMIATTI, 2012).

2.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras foliares foram fixadas em solução de Karnovsky por 24 horas, a 4 °C. Após esse período, o material foi lavado por 2 vezes em solução de cacodilato 0,05M por 10 minutos e novamente fixado em tetróxido de ósmio, por 1 hora. Posteriormente, as amostras foram lavadas com água destilada e desidratadas em uma série de acetona: 30% (15 minutos), 50% (15 minutos), 70% (150 minutos), 90% (15 minutos), 100% (15 minutos, por 3 vezes). As amostras desidratadas foram submetidas à secagem ao ponto crítico. Após essa etapa, as amostras foram revestidas com ouro e as observações foram realizadas em um microscópio de eletrônico de varredura LEO 435 VP (SEMTechSolutions, Massachusetts).

2.2.4 Análises de Expressão Gênica Relativa

O RNA total foi extraído usando o reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante, e tratado com DNase I (Invitrogen). O RNA tratado com DNase I (1,0 ug) foi reverso-transcrito para gerar a primeira cadeia de cDNA, como descrito por VARKONYI-GASIC et al., (2007). Um oligo (dT) primer também foi adicionada à reação para detectar o RNAm alvo e os controles internos. A análise foi realizada utilizando PCR em tempo real StepOnePlus (AppliedBiosystems). Resumidamente, 5 µL de 1:20 v/v de cDNA foram adicionados a 6,25 µL de GoTaqPCR Master Mix 2x (Promega), 0,15 µL de cada primer (10µM), e 0,95 µL de água deionizada para um volume final de 12,5 mL. As reações foram amplificadas durante 2 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos e 60 °C durante 30 segundos. O gene CAC (Solyc08g006960.2.1) foi utilizado como um controle interno (EXPOSITO-RODRIGUEZ et al., 2008). Os produtos de PCR para cada conjunto de primers foram submetidos a análise de curva de Melt, confirmando

a presença de apenas um pico na dissociação térmica gerada pelo protocolo de desnaturação térmica. Três repetições técnicas foram analisadas para cada uma das três amostras biológicas (cada uma composta por 10 cotilédones ou cinco 4ª folhas vindas de cinco plantas), juntamente com reações livres de DNA como controles negativos. O ciclo limiar (CT) foi determinado automaticamente pelo instrumento, e as alterações para cada gene foram calculados usando a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

2.3 Resultados e Discussão

No presente trabalho é descrita pela primeira vez a presença de tricomas do tipo IV em cotilédones de plântulas de vários acessos de *S. lycopersicum* (Fig. 1), representantes de cultivares de tomateiro comercial normalmente utilizadas tanto para o processamento industrial (M82) quanto para comercialização *in natura* (Ailsa Craig, Moneymaker, VFNT Red Cherry). Utilizando a cv. modelo Micro-Tom (MT), a qual também apresenta tricoma tipo IV em grandes quantidades nos cotilédones, foi observado que a densidade dessa estrutura diminui progressivamente até a segunda folha (Fig. 2). Esse padrão, que é especialmente marcado na superfície abaxial das folhas (Fig. 2c), é oposto ao do tricoma não-glandular do tipo V (Fig. 2d). A correlação negativa existente entre os tricomas dos tipos IV e V coincide com relatos anteriores (FERNÁNDEZ-MUÑOZ et al., 2003) e sugere uma relação ontogênica (*i.e.* os dois tipos de tricomas podem possuir uma origem de desenvolvimento comum). Alternativamente, cada tricoma pode estar relacionado a um estágio de desenvolvimento em particular, ou seja, os do tipo IV são encontrados em estádios juvenis e os do tipo V em tecidos maduros. Essa segunda hipótese pode explicar o porquê dos tricomas tipo IV nunca terem sido descritos anteriormente em tomateiro cultivado, já que a maioria dos estudos caracteriza folhas de plantas adultas ou posteriores aos primeiros pares de folhas.

Nenhum padrão claro pôde ser discernido em outros tipos de tricomas (Fig. 2), mas a distribuição preferencial do tipo I na superfície adaxial da folha se destaca. O fato da presença de tricomas tipo IV seguir claramente uma distribuição dependente da ordem cronológica das folhas e o tricoma I, ao contrário, estarem mais ligado a uma distribuição dorsiventral (abaxial-adaxial) das folhas contraria a idéia de equivalência entre esses dois tricomas, sugerida com base em seus perfis

metabólicos (McDOWELL et al., 2011). Além disso, enquanto o tricoma do tipo I é muito raro em qualquer tipo foliar, o tipo IV é abundante nas folhas onde ele ocorre (Fig. 2a e c).

Figura 1 - Tricomas encontrados na superfície abaxial dos cotilédones em plântulas de 10 dias de idade. **(a)**. Ailsa Craig; **(b)**. Moneymaker; **(c)**. M82; **(d)**. VFNT Red Cherry. A seta branca aponta o tricoma do tipo IV e a seta preta aponta o tricoma do tipo VI. Barra = 200 μ m

Figura 2 - Contagem dos tipos de tricomas nas superfícies adaxial (histograma negro) e abaxial (histograma branco) de cotilédones, primeira, segunda, terceira e quarta folhas na cultivar Micro-Tom (MT), com 25 dias de idade. Barras representam a média $\pm$ SE, $n=40$ para cada face

A análise de imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em cotilédones e folhas de tomateiro cultivado e da espécie selvagem *S. pennellii* (Fig. 3) mostram tricomas que coincidem com a descrição clássica para tricomas do tipo IV (LUCKWILL, 1943): base unicelular com haste bicelular e uma glândula unicelular na ponta (Fig. 3). Uma comparação entre cotilédones e folhas totalmente expandidas de duas cultivares de tomateiro (M82 e MT) e a espécie selvagem *S. pennellii* confirma que o tricoma do tipo IV é o tipo de tricoma predominante em *S. pennellii*. Em ambas cultivares, o tricoma IV foi observado em cotilédones e primeiras folhas, mas se encontraram totalmente ausentes na quinta folha, na qual os tricomas predominantes são os dos tipos V e VI, além da presença do tipo VII. Esses resultados confirmam que a presença do tricoma tipo IV está associada com

estádios juvenis do desenvolvimento da planta do tomateiro cultivado e está presente em folhas de estágios mais maduros da espécie selvagem.

Figura 3 - Sequência ontogenética de tricomas tipo IV em cotilédones, primeira e quinta folha de plantas representativas de *Solanum pennellii* e tomateiro (cultivares M82 e Micro-Tom). Em cotilédones e na primeira folha verdadeira, tricomas tipo IV são evidentes nos três genótipos. Na quinta folha apenas a espécie selvagem *S. pennellii* apresenta tricomas tipo IV, que são conspicuamente ausentes nas duas cultivares de tomateiro. Em vez disso, os tricomas tipo V, VI e VII são observados. Imagens de microscopia eletrônica de varredura na face abaxial de cotilédones de 10 dias e folhas de plantas com 40 dias de idade. Barra de escala = 200 mm para os cotilédones, 100 mm para *S. pennellii* primeira folha, 300 mm para M82 e MT primeira folha e 200 mm para a quinta folha de todos os genótipos

O seguinte passo foi à busca do tricoma glandular do tipo IV em mutantes com alterações no padrão de tricomas. Para tanto, foram analisados os mutantes *Lanata* (*La*) e *Woolly* (*Wo*), que apresentam um fenótipo caracteristicamente piloso, e *hair absent* (*h*) e *hairless* (*hl*) que são plantas com folhas glabras. Todos os quatro mutantes se encontram introgrididos no *background* genético da cultivar MT como

linhagens quase isogênicas (NILs). Embora em nenhum dos mutantes de tricoma analisados foram encontrados os tricomas glandulares do tipo IV em folhas de plantas adultas, esses mutantes apresentaram diferenças específicas quanto a densidade de tricomas glandulares e, principalmente, não glandulares. Desse modo, *Wo* apresentou uma redução significativa na densidade do tricoma glandular do tipo VI em ambas as superfícies foliares, quando comparado com MT (Fig 4). Em contraste com MT, tanto *Wo* quanto *Ln* carecem de tricoma do tipo VII na face adaxial. A densidade de tricomas tectores do tipo III se encontra elevada na face adaxial de *Wo* e *Ln*, porém com uma redução significativa no lado abaxial em *Ln*. Os tricomas do tipo V se encontram em maior densidade em ambas as faces da folha em *Wo* e *Ln*. Um número importante de tricomas ramificados, ausentes em MT, foi encontrado em ambas as faces das folhas de *Wo* e *Ln*. Já no mutante *hl*, ambos os tipos de tricomas, glandulares e tectores, apresentam deformação morfológica, dado que corrobora as descrições de REEVES (1977) e KANG et al. (2010). Os tricomas glandulares dos tipos I e VII estão ausentes em *hl*, porém, os tricomas do tipo VI são abundantes, principalmente na face adaxial das folhas. Encontra-se uma quantidade reduzida de tricomas tectores do tipo III e os do tipo V estão em quantidades semelhantes ao controle MT. Em *h*, os tricomas do tipo I estão ausentes, há uma quantidade elevada de tricomas do tipo VI e os do tipo VII aparecem em quantidades diminutas, porém estão presentes nas duas superfícies foliares, diferenciando-se do MT, o qual só apresenta tais tricomas na face adaxial. Nesse genótipo, os tectores do tipo III são escassos, e os do tipo V aparecem em maior número na face abaxial das folhas.

Yang et al. (2011), ao estudarem o mutante *Wo*, afirmaram que o genótipo possui uma grande quantidade de tricomas glandulares do tipo I. Apesar de não citarem a idade na qual as plantas foram analisadas, as imagens mostram plântulas do mutante com somente dois pares de folhas. Além disso, as micrografias apresentadas mostram grande quantidade de tricomas glandulares do tipo IV, segundo a classificação canônica de Luckwill (1943) e revisadas por Channarayappa et al. (1992), e que foram erroneamente descritos como sendo do tipo I no referido artigo. Desse modo, Luckwill (1943) propôs que os tricomas do tipo I eram formados por um conjunto de 6-10 células, podendo atingir de 2-3 mm de comprimento, com base multicelular globular e uma pequena glândula redonda no topo do tricoma; já o tricoma do tipo IV é muito menor que o tricoma I, chegando até a 0,5mm, com base

unicelular plana e uma glândula no topo do tricoma, que é maior quando comparada à glândula do tricoma I. (GLAS et al., 2012). Sendo assim, é provável que a grande quantidade de tricomas tipo I observados por Yang et al. (2011) sejam na verdade do tipo IV, dado o fato de terem feitos suas análises em plantas juvenis de *Wo*. Essa constatação, aliada à presença de grande quantidade de tricomas do tipo V em plantas adultas de *Wo* (Fig. 4), sugere que esse mutante não está realmente controlando a formação de específica de tricomas do tipo IV, mas que pode contribuir para a alta densidade de diferentes tipos de tricomas, conforme o estágio de desenvolvimento. Tal hipótese é coerente com o fato do gene *WOOLY* codificar uma HD-Zip relacionado ao ciclo celular, um processo não específico de tricomas do tipo I ou IV, mas comum a todos os tipos de tricomas pluricelulares.

Figura 4 - Contagem dos tipos de tricomas nas faces adaxial (a) e abaxial (b) da quinta folha madura (45 dias) nos genótipos *Wooly* (Wo), *Lanata* (Ln), *hairs absent* (h) e *hairless* (hl) no background Micro-Tom (MT). Os genótipos são descritos na tabela 1. Barras representam a média $\pm$ SE, n=40 para cada face

Tomando como base a associação do tricoma IV com juvenilidade, também analisou-se a quinta folha de MT e as folhas equivalentes de mutantes e linhagens transgênicas, que afetam o desenvolvimento temporal em tomateiro, no mesmo *background* genético (Tabela 1). Tricomas do tipo IV foram encontrados na superfície abaxial dos três genótipos analisados: *miR156-ox*, *Me* e *fas*, e na superfície adaxial dos dois primeiros (Fig 5). Esses genótipos também mostraram alterações na distribuição de outros tipos de tricomas, em particular a redução na quantidade de tricomas do tipo V (com exceção da superfície adaxial de plantas *miR156-ox*).

Figura 5 - Contagem dos tipos de tricomas nas faces adaxial (a) e abaxial (b) da quinta folha madura (45 dias) nos genótipos *Mouse ears* (*Me*), *fasciated* (*fas*) e uma linhagem superexpressando o micro-RNA 156 (*miR156*) no background Micro-Tom (MT). Os genótipos são descritos na tabela 1. Barras representam a média $\pm$ SE, n=40 para cada face

A abundância de tricomas do tipo IV em plantas *miR156-ox* nos conduziu à hipótese de que a expressão do *microRNA 156* e seus alvos poderiam estar correlacionados com a presença do tricoma do tipo IV. Tal hipótese baseia-se no fato da expressão de *miR156* ser associada com juvenildade, possuindo altos níveis de expressão nos estádios iniciais do desenvolvimento e diminuindo progressivamente nas folhas maduras, em diversas espécies vegetais (WANG et al., 2011; POETHIG, 2013). O envolvimento do *miR156* e das *SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE* (SPLs) alvos com a distribuição temporal de tricomas unicelulares já foi comprovada em *Arabidopsis* por Yu et al. (2010). Nesse

trabalho, observa-se que plantas superexpressando o microRNA 156 produziam tricomas ectópicos, ou seja, em locais onde o controle negativo (wild-type) era glabro. Já plantas com níveis elevados de SPLs produziam poucos tricomas.

Assim, a expressão relativa de *miR156* e dos alvos *SBP3* e *SBP15* foi determinada e correlacionada com a presença do tricoma do tipo IV nos cotilédones e na quarta folha, da cultivar MT (Fig. 6). Os resultados corroboram a hipótese apresentada, já que nos cotilédones, onde se encontra maior quantidade de tricomas do tipo IV (Fig. 6a), o nível de *miR156* é maior do que na quarta folha (Fig. 6c), na qual o tricoma IV é ausente (Fig. 6b). O contrário é observado com os níveis das SPLs (Fig. 6d-e).

Figura 6 - Expressão do micro-RNA 156 e dois de seus genes-alvo *SQUAMOSA BINDING PROTEIN* 3, 15 (*SBP3*, *SBP15*) e cotilédones e folhas de tomateiro cv. Micro-Tom. Note que tricomas tipo IV são abundantes nos cotilédones, mas ausente na quarta folha, a qual apresenta uma elevada densidade de tricomas tipo V. Micrografias representativas do lado abaxial do cotilédones com 10 dias e da quarta folha com 25 dias. O RNA total para a análise de expressão foi extraído de cotilédones/ folhas na mesma idade. Barra de escala = 500 µm

2.4 Conclusões

Este trabalho mostra que o tomateiro cultivado, contrariamente ao descrito na literatura, possui tricomas glandulares do tipo IV em estádios iniciais do desenvolvimento. Também é provada a ocorrência dessa estrutura em folhas maduras de plantas com padrões juvenis, o que sugere que o controle do desenvolvimento desse tipo de tricoma pode estar relacionado com a juvenilidade em tomateiro. Uma primeira aproximação ao controle genético do desenvolvimento do tricoma tipo IV é a evidência de uma forte correlação com a expressão do *microRNA 156* e dois dos seus alvos, *SBP3* e *SBP15*.

Referências

BOX, M.S.; GLOVER, B.J. A plant developmentalist's guide to paedomorphosis: reintroducing a classic concept to a new generation. **Cell**, Philadelphia, v. 15, p. 241–246, 2010.

CHANNARAYAPPA, S.G.; MUNIYAPPA, V.; FRIST, R.H. Resistance of *Lycopersicum* species to *Bemisia tabaci*, a tomato leaf curl virus vector. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.70, p. 2184-2192, 1992.

CHEN, J.J.; JANSSEN, B.J.; WILLIAMS, A.; SINHA, N. A gene fusion at a homeobox locus: Alterations in leaf shape and implications for morphological evolution. **Plant Cell**, Baltimore, v. 9, p. 1289-1304, 1997.

CHEN, C.; LIU, M.; JIANG, L.; LIU, X.; ZHAO, J.; YAN, S.; YANG, S.; REN, H.; LIU, R.; ZHANG, X. Transcriptome profiling reveals roles of meristem regulators and polarity genes during fruit trichome development in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 65, p. 4943-4958, 2014.

CORRELL, D.S. The potato and its wild relatives. Contributions from the **Texas Research Foundation Botanical Studies**, Austin, v.4, p. 1-606, 1962.

EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M.; BORGES, A. A.; BORGES-PÉREZ, A.; PÉREZ, J. A. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biology**, London, v. 8, doi:10.1186/1471-2229-8-131, 2008.

FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; SALINAS, M.; ALVAREZ, M.; CUARTERO, J. Inheritance of resistance to two-spotted spider mite and glandular leaf trichomes in wild tomato *Lycopersicum pimpinellifolium* (Jusl.) Mill. **Journal of American Society of Horticultural Science**, Geneva. v.128, p. 188-195, 2003.

GLAS, J.R.; SCHIMMEL, B.C.J; ALBA, J.M.; ESCOBAR-BRAVO, R.; SCHUURINK, R.C.; KANT, M.R. Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 13, p. 17076-17103, 2012.

GOFFREDA, J.C.; MUTSCHLER, M.A.; TINGEY, W.M. Feeding behavior of potato aphid affected by glandular trichomes of wild tomato. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Wezep, v. 48, p. 101-107, 1988.

HÜLSKAMP, M. Plant trichomes: A model for cell differentiation. **Nature Reviews, Molecular Cell Biology**, London, v. 5, p. 471-480, 2004.

KANG, J.H.; SHI, F.; JONES, D.A.; MARKS, D.M.; HOWER, G.A. Distortion of trichome morphology by the hairless mutation of tomato affects leaf surface chemistry. **Journal of Experimental Botany**. Lancaster, v. 6, p. 1053-1064, 2010.

LIU, B.; WANG, H.; DU, Z.; LI, G.; YE, H. Metabolic engineering of artemisin in biosynthesis in *Artemisia annua* L. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 30, p. 689-694, 2011.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, London, v. 25, p. 402–408, 2001.

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

LUCKWILL, L.C. **The genus *Lycopersicon***: historical, biological, and taxonomic survey of the wild and cultivated tomatoes. Aberdeen: Aberdeen University Press, 1943. 44 p.

MAURICIO, R.; RAUSCHER, M.D. Experimental manipulation of putative selective agents provides evidence for the role of natural enemies in the evolution of plant defense. **Evolution**, Lawrence, v. 51, p. 1435-1444, 1997

MAXON-SMITH, J.W.; RITCHIE, D.B. A collection of near-isogenic lines of tomato: Research tool of the future? **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v.1, p. 41–45, 1983.

McDOWELL, E.T.; KAPTEYN, J.; SCHMIDT, A.; LI, C.; KANG, J.H.; DESCOUR, A.; SHI, F.; LARSON, M.; SCHILMILLER, A.; AN, L.; JONES, D.A.; PICHERSKY, E.; SODERLUND, C.; GANG, D.R. Comparative functional genomic analysis of *Solanum* glandular trichome types. **Plant Physiology**, Rockville, v. 155, p. 524–539, 2011.

PINO, L.E.; LOMBARDI-CRESTANA, S.; AZEVEDO, M.S.; SCOTTON, D.C.; BORGIO, L.; QUECINI, V.; FIGUEIRA, A.; PERES, L.E.P. The Rg-1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato Micro-Tom model system. **Plant Methods**, London, v.6, n. 23. doi:10.1186/1746-4811-6-23 2010.

POETHIG, R.S. Vegetative phase change and shoot maturation in plants. **Current Topics in Developmental Biology**, New York, v.105, p.125–152, 2013.

REEVES, A.F. Tomato trichomes and mutations affecting their development. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 64, p. 186-189, 1977.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, M.J.; GARZO, E.; BONANI, J.P.; FERERES, A.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; MORIONES, E. Whitefly resistance traits derived from the wild tomato *Solanum pimpinellifolium* affect the preference and feeding behaviour of *Bemisia tabaci* and reduce the spread of Tomato yellow leaf curl virus. **Phytopathology**, Lancaster, v. 101, p. 1191–201, 2011.

SCHILLMILLER, A.L.; LAST, R.L.; PICHERSKY, E. Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. **The Plant Journal**, Oxford, v. 54, p. 702-711, 2008.

SCOTT, I.M. Plant hormone response mutants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 78, p. 147-152, 1990.

SILVA, G.F.F.E.; SILVA, E.M.; AZEVEDO, M.S.; GUIVIN, M.A.C.; RAMIRO, D.A.; FIGUEIREDO, C.R.; CARRER, H.; PERES, L.E.P.; NOGUEIRA, F.T.S. microRNA156-targeted SPL/SBP box transcription factors regulate tomato ovary and fruit development. **The Plant Journal**, Oxford, v. 78, p. 604–618, 2014

SIMMONS, A.T.; GURR, G.M. Trichomes of *Lycopersicum* species and their hybrids: effects on pests and natural enemies. **Agricultural and Forest Entomology**, New York, v. 7, p. 265-276, 2005.

TISSIER, A. Glandular trichomes: what comes after expressed sequence tags? **The Plant Journal**, Oxford, v. 70, p. 51-68, 2012

VARKONYI-GASIC, E., WU, R., WOOD, M., WALTON, E.F.; HELLENS, R.P. Protocol: a highly sensitive RT–PCR method for detection and quantification of microRNAs. **Plant Methods**, London, v.3, doi:10.1186/1746-4811-3-12, 2007

VENDEMIATTI, E. **Compreendendo o desenvolvimento de tricomas glandulares em mutantes e variações genéticas naturais de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom)**. 2012. Monografia (Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

WANG, J.W.; PARK, M.Y.; WANG, L.J.; KOO, Y.; CHEN, X.Y.; WEIGEL, D. et al. miRNA control of vegetative phase change in trees. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 7 (2), e1002012, 2011

WEATHERS, P.J.; ARSENAULT, P.R.; COVELLO, P.S.; McMICKLE, A.; TEOH, K.H.; REED, D.W. Artemisinin production in *Artemisia annua*: studies in planta and results of a novel delivery method for treating malaria and other neglected diseases. **Phytochemistry Reviews**, Amsterdam, v. 10, p. 173-183, 2011.

XU, C.; LIBERATORE, K.L.; MACALISTER, C.A.; HUANG, Z.; CHU, Y.H.; JIANG, K.; BROOKS, C.; OGAWA-OHNISHI, M.; XIONG, G.; PAULY, M.; VAN ECK, J.; MATSUBAYASHI, Y.; VAN DER KNAAP, E.; LIPPMAN, Z.B. A cascade of arabinosyltransferases controls shoot meristem size in tomato. **Nature Genetics**, New York, v. 47, p. 784-792, 2015.

YANG, C.; YE, Z. Trichomes as models for studying plant cell differentiation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 70, p. 1937-1948, 2013.

YANG, C.; LI, H.; ZHANG, J.; WANG, T.; YE, Z. Fine-mapping of the *woolly* gene controlling multicellular trichome formation and embryonic development in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.123, n.4, p. 625-633, 2011.

YU, N.; CAI, W.J.; WANG, S.; SHAN, C.M.; WANG, L.J.; CHEN, X-Y. Temporal control of trichome distribution by *microRNA156*-targeted *SPL* genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell**, Baltimore, v. 22, p. 2322–2335, 2010.

3 CARACTERIZAÇÃO E MAPEAMENTO DE *Galapagos enhanced trichomes* (*Get*), UMA VARIAÇÃO GENÉTICA NATURAL CONTROLANDO A PRESENÇA DE TRICOMAS GLANDULARES DO TIPO IV EM TOMATEIRO.

Resumo

Tricomas são estruturas epidérmicas relacionadas com a proteção das plantas contra a herbivoria. O gênero *Solanum* tem sido usado como um modelo para o estudo da diferenciação de tricomas, por conter uma gama de diferentes tipos dessas estruturas, incluindo os tipos glandulares. Tricomas glandulares são conhecidos como “fábricas químicas biológicas”, já que produzem e acumulam metabólitos especializados. O tomateiro cultivado (*S. lycopersicum*) não possui o tricoma glandular do tipo IV na fase madura, porém este é presente em algumas espécies selvagens (ex. *S. galapagense*) e é considerado uma fonte do inseticida natural acilaçúcar. No presente trabalho foi caracterizada uma nova variação genética natural vinda de *S. galapagense* que produz o tricoma do tipo IV. Este locus foi denominado “*Galapagos enhanced trichomes*” (*Get*) e introgridido no modelo genético Micro-Tom (MT), uma cultivar de tomateiro de pequeno porte e ciclo curto. A linhagem quase isogênica (NIL) a MT carregando o alelo de *S. galapagense* (MT-*Get*) possui tricomas glandulares tipo IV em ambas as faces das folhas. As plantas MT-*Get* mostraram serem menores, mais ramificadas e apresentaram uma pequena diminuição na produtividade, quando comparadas com MT. Com os dados de mapeamento através de SNPs, determinou-se que o locus *Get* está posicionado na região terminal do cromossomo 2, não sendo, contudo, descartada totalmente a possibilidade de uma epistasia devido a presença de alelos de *S. galapagense* localizados no cromossomo 6. A futura clonagem do gene (ou genes) relacionados a esta característica irá aumentar nosso entendimento sobre as bases moleculares do desenvolvimento de tricomas glandulares, além de ser uma ferramenta útil para a criação de novas variedades resistentes com utilização reduzida de pesticidas.

Palavras-chave: Micro-Tom; Tricoma; Herbívoros; Acilaçúcar

Abstract

Trichomes are specialized epidermic structures mostly responsible for plant herbivory protection. The *Solanum* genus has been used as a model to study trichome differentiation. The genus contains a large range of different types of trichomes, including the glandular ones. Glandular trichomes have been called “biological chemical factories”, since they produce and accumulate specialized metabolites. Cultivated tomato (*S. lycopersicum*) does not have the type IV glandular trichome in the mature phase, which are present in some wild species (e.g. *S. galapagense*) and are the main sources of the natural insecticide acyl sugar. In the present work we characterized a novel natural genetic variation from *S. galapagense* producing type-IV trichomes. This locus was named *Galapagos enhanced trichomes* (*Get*) and introgressed into the genetic model Micro-Tom (MT), a tomato cultivar with small size and short life cycle. The near isogenic line (NIL) harboring the *S.*

galapagense allele (MT-*Get*) has glandular trichomes IV in both sides of the leaves. The MT-*Get* plants are smaller, more branched and has a small decrease in productivity, when compared to MT. Genetic mapping using SNPs positioned the *Get* locus at the terminal region of chromosome 2. However, we could not rule out the possibility of an epistasis due to the presence of *S. galapagense* alleles located on chromosome 6. The future cloning of gene (or genes) related to this trait will increase our understanding of the molecular basis of glandular trichome development, besides being a useful tool for the creation of new resistant varieties with reduced use of pesticides.

Keywords: Micro-Tom; Trichome; Herbivory; Acyl sugar

3.1 Introdução

Tricomas glandulares são estruturas epidérmicas especializadas e estão particularmente relacionadas com a proteção das plantas contra herbívoros. Apesar de apresentarem uma grande variedade de formatos e estruturas, os tricomas glandulares possuem em comum a capacidade de secretar e/ ou estocar diversos metabólitos especializados, sendo considerados “fábricas bioquímicas naturais” (CAMPOS et al., 2009; TISSIER, 2012).

O gênero *Solanum*, em especial a espécie *Solanum lycopersicum* (tomateiro) e seus parentais selvagens, tem sido proposto como um modelo de estudo na diferenciação de tricomas, especialmente os glandulares. Cabe ressaltar que *Arabidopsis thaliana*, o modelo vegetal mais utilizado em diversos tipos de estudo, possui apenas tricomas unicelulares não-glandulares (GLAS et al., 2012; TISSIER, 2012). Além disso, a cultura do tomate tem importância de ordem mundial, o que favoreceu muitos estudos em melhoramento, fisiologia e desenvolvimento. Tais estudos multidisciplinares em tomateiro resultaram em muitas ferramentas disponíveis, tais como: genoma sequenciado, coleção de mutantes, linhagens de introgressão e protocolos eficientes de transformação. Além disso, em 1997, Meissner et al. propuseram a cultivar Micro-Tom (MT) como modelo genético de tomateiro, já que, por possuir porte pequeno e rápido ciclo de vida, permite screenings genéticos em espaços limitados (PINO et al., 2009; TISSIER, 2012).

O tomateiro cultivado (*S. lycopersicum*) é pouco eficiente na defesa contra herbivoria, pois, apesar de possuir tricomas tectores (não glandulares) dos tipos III e V, e glandulares do tipo VI, possui baixa quantidade de tricomas glandulares do tipo I e não produz tricomas glandulares do tipo IV (GLAS et al., 2012). Os tricomas do tipo IV vêm sendo descritos como as principais estruturas que promovem a

resistência a herbívoros em tomateiro (RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 2011; LUCATTI et al., 2013). Esse tipo de tricoma está presente em algumas espécies selvagens (ex: *S. galapagense*, *S. pennellii*, *S. pimpinellifolium*) e constitui a principal fonte de acilaçúcar, considerado um inseticida natural, já que é extremamente pegajoso, criando uma armadilha para insetos e pequenos artrópodes (FOBES et al., 1985; GOFFREDA et al., 1989; HAWTHORNE et al., 1992).

O presente trabalho tem como objetivo a caracterização genética e agrônômica e molecular de uma nova variação genética natural originada de *S. galapagense* e introgridida em *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom (MT). Essa linhagem quase isogênica produz o tricoma do tipo IV e foi denominada de *Galapagos enhanced trichomes* (*Get*).

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material Vegetal

Todo o material vegetal utilizado nos experimentos foi cultivado na casa de vegetação do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal, pertencente ao Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ-USP. A casa de vegetação apresenta condições de temperatura controlada e irrigação automatizada. As plantas no porte MT foram cultivadas em vasos com capacidade para 100 g de substrato, constituído de uma proporção de 1:1 de Basaplant Hortaliças (Base Agro) + vermiculita expandida. Para cada 1L desta mistura foi adicionado calcário (4g) e NPK 10-10-10 (1g na semeadura e 8 g no transplantio).

Para a realização do trabalho foi utilizada a cultivar miniatura de tomateiro Micro-Tom (MT) e a variação genética natural *Get* e o mutante *Wo*, introgrididos na mesma cultivar. Os genótipos encontram-se descritos na Tabela 1, de acordo com informações do site do laboratório (www.esalq.usp.br/tomato).

Tabela 1 - Genótipos utilizados no presente trabalho.

Genótipo	Efeito/ Função gênica	Origem	Referências
<i>Solanum galapagense</i> LA1401	Espécie selvagem de tomateiro, oriunda das Ilhas Galápagos. Possui frutos alaranjados, entrenós curtos, densa pilosidade nas folhas e no caule, folhas altamente dissecadas e sementes muito pequenas de difícil germinação	TGRC*	RICK, 1956
<i>Galapagos enhanced trichomes</i> (Get)	Função gênica desconhecida. Plantas baixa, mais ramificadas e com maior quantidade de tricomas do tipo IV.	LA1401	-
<i>Wooly</i> (Wo)	Homeodomínio leucina zíper (HD-zip) relacionado com o gene de <i>Arabidopsis</i> GL2 e PDF2 que regulam uma ciclina – SICyCB2. Seu fenótipo apresenta aumento de tricomas tectores nas partes vegetativas da planta.	LA0715	YANG <i>et al.</i> 2011

*Tomato Genetics Resource Center

As introgressões dos materiais *Get* e *Wo* na cv. MT foram feitas utilizando a linhagem que possuíam o gene de interesse como doadora de pólen e o MT como receptor do mesmo. Em F2, as plantas recombinantes, ou seja, com porte pequeno e característica de interesse do outro parental (maior número de tricomas tectores para *Wo* e de glandulares para *Get*) foram utilizadas para realização de 6 retrocruzamentos e mais 6 ciclos de autofecundação, seguindo o mesmo procedimento descrito em PINO *et al.* (2010).

3.2.2 Fenotipagem de tricomas

Folhas de plantas maduras, 45 dias após a germinação, foram coletadas do terço médio das plantas. Dessas folhas foram retirados pequenos pedaços, no formato de fitas, que foram fixados em lâminas de vidro com esmalte incolor. Essas fitas foliares foram fotografadas perpendicularmente utilizando um suporte de isopor (para fixar a lâmina) e a lupa Leica S8AP0, em um aumento de 50x. A partir das imagens geradas, fez-se a contagem dos tricomas. Foram utilizadas 10 plantas por genótipo, com 4 repetições por planta para cada uma das faces foliares (n = 40). Os dados foram analisados estatisticamente com o Teste - T pareado. A metodologia aqui utilizada difere da habitual contagem feita observando a superfície da folha, pois os tricomas só podem ser corretamente diferenciados a partir de sua

observação por inteiro, o que somente é possível observando em vista lateral (VENDEMIATTI, 2012)

3.2.3 Determinação de Massa Seca, Altura do Ramo Principal e Índice de Ramificação

Plantas com 48 dias de idade foram separadas em parte aérea (folhas e caule) e raízes; da parte aérea retirou-se as folhas, mediu-se a altura do ramo principal (até primeira inflorescência) e realizou-se a determinação do índice de ramificação, que consiste na soma dos comprimentos dos ramos secundários dividida pelo comprimento do ramo principal. Posteriormente, essas partes foram ensacadas separadamente (caule + folhas e raízes) para secagem em estufa com circulação de ar forçada ($\pm 70\text{ }^{\circ}\text{C}$), até atingirem peso constante (aproximadamente 30 horas) para nova pesagem, a fim de se obter a massa seca.

Para determinação do índice de ramificação dividiu-se a soma dos comprimentos dos ramos secundários pelo comprimento do ramo principal.

Nessas análises, foram realizadas 15 repetições por genótipo e os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando-se o Teste –T pareado.

3.2.4 Determinação da Produtividade e Conteúdo de Sólidos Solúveis (°Brix)

A produtividade dos genótipos foi avaliada com base nos parâmetros de peso total de frutos por planta e peso médio dos frutos no final da primeira floração, sendo utilizado 10 repetições por genótipo. Já o conteúdo de sólidos solúveis dos frutos (°Brix) foi determinado com auxílio de um refratômetro digital (Atago PR-101 α , Bellevue, WA). Foram realizadas 10 repetições por genótipos, utilizando-se 3 frutos por planta. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando-se o Teste T – pareado.

3.2.5 Quantificação de Acilaçúcar

A quantificação de acilaçúcares seguiu método proposto por Resende et al. (2002), salvo modificações. O protocolo baseia-se na extração do composto por diclorometano e tratamento com NaOH 0,1M solvido em metanol, que promove a saponificação dos grupos acilados dos acilaçúcares, liberando o açúcar presente.

No produto desse processo adicionou-se água e HCl 0,04M, que tem como objetivo inverter os açúcares não redutores para açúcares redutores. A quantificação de açúcares redutores foi feita utilizando o reagente de DNS em espectrofotômetro ajustado a 540nm. Foram realizadas quantificação em 24 plantas de cada genótipo e os dados obtidos serão analisados estatisticamente utilizando-se o Teste T – pareado.

3.2.6 Testes de Herbivoria com *Bemisia tabaci* e *Tuta absoluta*

Os experimentos foram conduzidos na Estação de Pesquisa da Empresa Nunhems, localizada no município de Uberlândia, estado de Minas Gerais.

Os genótipos controle MT e *Get* foram semeadas em bandejas de plástico de 128 células, utilizando substrato à base de fibra de coco, e permaneceram em estufas adequadas para o crescimento até período de transplante. Posteriormente, as plântulas foram transplantadas para vasos de 8 litros, utilizando-se substrato adequado para o desenvolvimento dos tomateiros. Cada vaso recebeu 5 plantas do mesmo genótipo. As plantas foram mantidas em casa de vegetação até completarem 23 dias após transplante. Durante o intervalo entre o transplante e o início da inoculação as plantas receberam os tratos culturais adequados, e a adubação através de fertirrigação, utilizando os adubos: MAP, uréia, Krista-K e calcinite.

Após os 23 dias, os vasos foram alocados aleatoriamente em casa de vegetação (7m x15m) infestada com alta população de mosca-branca (*Bemisia tabaci*), onde os insetos são criados e mantidos exclusivamente para os testes de resistência dos tomateiros a geminivírus, virose da qual esse inseto é o vetor. Os vasos permaneceram ali por 7 dias para que ocorresse a postura dos ovos nas folhas das plantas. Após o período de inoculação, foram coletados ao acaso um vaso de cada genótipo, sendo que cada um deles continha 5 plantas, e enviados para o laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento da ESALQ/USP. Dessas plantas, foram coletadas 30 amostras de cada genótipo, a fim de realizar a contagem de ovos após oviposição. Após mais 7 dias, outras 30 amostras foram colhidas a fim de realizar a contagem de ninfas eclodidas. As amostras foram fotografadas em lupa, em aumento de 40x e a análise estatística foi realizada através do Teste T - pareado.

Para o teste com *Tuta absoluta*, após a etapa de germinação e transplântio, os vasos foram alocados aleatoriamente em casa de vegetação (7m x15m) infestada com alta população do herbívoro, onde os insetos são criados e mantidos exclusivamente para os testes de resistência dos tomateiros. Os vasos permaneceram por 3 dias para a postura dos ovos nas folhas das plantas. Após 10 dias de inoculação, as plantas foram avaliadas, observando-se a área foliar com minas causadas pela lagarta, utilizando-se de uma escala de 0-100% (0: folhas sem danos; 100%: folhas totalmente danificadas).

3.2.7 Caracterização do Duplo Mutante *GetXWo*

De uma população F2 vinda do cruzamento *Get* x *Wo* foram escolhidas 10 plantas que em uma primeira análise visual possuíam fenótipo característico tanto de *Wo* (aspecto piloso a olho nú) e *Get* (plantas mais ramificadas). Nessas plantas se fez a quantificação de tricomas segundo metodologia descrita em item anterior.

3.2.8 Teste de Regeneração de Raízes *in vitro*

Sementes de MT e *Get* foram desinfestadas superficialmente em 100 mL de uma solução 30% (v/v) de alvejante comercial (o qual continha 2,7% de hipoclorito de sódio) com duas gotas de detergente comercial, durante 15 minutos de agitação, seguido de três lavagens com água esterilizada em autoclave. As sementes foram colocadas para germinar em meio de cultura com metade dos nutrientes MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), metade de vitaminas B5 (GAMBORG; MILLER; OJIMA, 1968); 15 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar (Merck, Darmstadt, Alemanha), com pH ajustado para 5,8 antes da esterilização em autoclave. Os frascos foram mantidos no escuro, a 25±1 °C, por 4 dias. Após 8 dias em fotoperíodo de 16 h (12 dias após semeadura), as folhas cotilédones foram divididos em explantes e colocados em meio de cultura para indução de raízes (RIM), composto por sais de MS com vitaminas B5, 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar e 0,4 µM Ácido Naftaleno Acético ou ANA (Sigma, St Louis, EUA). As placas foram vedadas e mantidas sob fotoperíodo de 16h, a 25±1 °C, por 3 semanas. A avaliação foi realizada contando o número de raízes completamente formadas por explante. Os dados foram avaliados estatisticamente utilizando o Teste – T pareado.

3.2.9 Sequenciamento da Linhagem de plantas *Get*

O DNA isolado da sub-linhagem #1 (BC6F3) de plantas MT-*Get* foi submetido para o sequenciamento de genoma total no Marshall University Genomics Core Facility em parceria com o Prof. Dr. Vagner Benedito (West Virginia University), que utiliza a plataforma Illumina HiSeq 2000. Foram gerados 15.6 Mb de dados raw (90.4% $\geq$ Q30), que cobrem 16X o genoma do tomateiro. As análises de bioinformática foram realizadas no West Virginia University Genomics Core Facility, utilizando computadores de High Performance lá disponível.

A montagem do *Reference-based* genoma de *Get* consistiu no alinhamento das sequências de *Solanum galapagense* LA1401, Micro-Tom (Wageningen University, Holanda) e *Get* utilizando-se como base comparativa dados genômicos da cv. Heinz 1706 com SNPs de MT (Osaka Prefecture University, Japão), a fim de se buscar regiões de introgressões de SNPs de *Solanum galapagense* em MT.

3.2.10 Extração de DNA genômico e desenvolvimento de marcadores CAPS

O protocolo de extração de DNA genômico foi realizado segundo Fulton *et al.* (1995), salvo modificações. Tecidos vegetais jovens foram macerados com nitrogênio líquido e a extração é realizada utilizando-se TMP (Tampão de Micro-Prep composto de tampão de Extração de DNA (TED), Tampão de Lise (TL) - FULTON *et al.*, 1995), clorofórmio/isoamílico (24:1), isopropanol gelado e etanol 70% para lavagem. O DNA é ressuspendido em 50 μ L de Tampão TE e colocado a 65 °C por 15 min, sendo novamente centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm e armazenado a -20 °C, para posteriores análises de mapeamento gênico.

Marcadores CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences), baseiam-se em polimorfismos que criam ou eliminam um sítio de restrição de uma endonuclease (KONIECZNY; AUSUBEL, 1993). Esses marcadores foram desenhados e testados em uma população BC7F2 (n=46) de plantas *Get*. Para o desenvolvimento de tais marcadores, regiões de interesses dentro dos cromossomos 2 e 6 foram selecionadas e dentro delas buscou-se por SNPs (Polimorfismos de Nucleotídeo Único) utilizando a plataforma JBrowser (<http://www.tomatogenome.net>). Cada um desses SNPs foram testados na plataforma CAPS Designer (<http://solgenomics.net/tools/index.pl>) a fim de se observar se formam sítios para

enzimas de restrição. Foram selecionados alguns desses SNPs para o desenvolvimento de primers

(<http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3> www.cgi). Os marcadores CAPS desenvolvidos encontram-se descritos na tabela 2. Os PCRs para os marcadores CAPS foram realizados utilizando-se 1.2 µl de buffer, 1.5 µl de MgCl₂, 0.2 µl de dNTPs, 0.5 µl de solução de primers (Forward + Reverse), 0.3 µl de *Taq* DNA polimerase, 6.0 µl de DNA template e 2.3 µl de água.

O programa de reação consiste em um ciclo a 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos + 59°C por 30 segundos + 72°C por 60 segundos, 72°C por 5 minutos e o produto mantido a 4°C. A digestão do produto de PCR é realizada utilizando-se 3.2 µl de água, 2.0 µl de buffer, 0.6 µl de enzima e 10 µl de template. No resultado da digestão é misturado Syber Green e visualizado em gel de agarose a 1,7% (p/v).

Tabela 2 - Descrição dos Marcadores do tipo CAPS utilizados no mapeamento

CAPS		Sequência do Primer	Amplicon	T°C de Anelamento	Enzima de Restrição	Fragmentos	
						MT	<i>S. galapagense</i>
1_CH2	-	TGTGCATGAGTTGTTTGGTG AACCAGGGGATACAGAGGCATT	575 pb	59 °C	XhoI	406/ 169	575
2_CH2	-	AACAGGAATGCAGAGCAGTACA TTCACCTTTCCACCAACCAT	638 pb	59 °C	DraI	638	138/ 500
4_CH2	Solyc02g092340	CGGGTTTTCACAGGCATACAT TTCAGCGGATAATTGTGTCG	569 pb	59 °C	ApaLI	406/ 125/ 38	531/ 38
6_CH2	Solyc02g093370	CACTCACTCCTCTTCTGTCACG TTGGTAAAGTGTGGTTGTGGA	586 pb	61 °C	BstNI	141/ 445	141/ 194/ 251
A-CH2	Solyc02g092390	CCATTGCGGTCATTACTTGA GTTTGGTCGCTTGACTCCTC	626 pb	59 °C	MspI	154/ 472	626
C-CH2	Solyc02g093030	GCACAACATCCACCCTTCTT CAAGCACATACGATTGCAGA	646 pb	59 °C	EcoRV	646	219/ 427
D-CH2	Solyc02g093330	CAAGCACATACGATTGCAGA GCTGCTGACCAACTCCTTGT	597 pb	59 °C	PstI	390/ 79/128	469/ 128
E-CH2	Solyc02g093860	TTCTAAGCGGATTGGGAGAA CAAGAAGGCCACCAAAGAAA	601 pb	59 °C	BstNI	236/ 365	601
F-CH2	Solyc02g094160/ 170	TGAAACCGACCCATTTCTTA AAGCTGATTGGCTACAACACAA	612 pb	59 °C	Hinfl	207/ 405	612
G-CH2	Solyc02g094500	GAAGGGTCGGGTACAAGGTAA CCACTCTCTTAGCCTGAATGG	613 pb	59 °C	TaqI	613	533/ 80
2_CH6	Solyc06g009730	TGTTGTTTCCCTTGTTGCAG GCCAGTTTGAACCAGACCAG	619 pb	59 °C	EcoRI	619	350/ 269
4_CH6	Solyc06g048460	AGCTAAGATGGAGGGAGATGC CCCGAGGTGTAAACTGTAACG	598 pb	59 °C	Hinfl	44/ 418/ 136	44/ 554

3.3 Resultados e Discussão

A partir da observação de que plantas BC1Fn, originadas de um cruzamento entre *Solanum galapagense* LA1401 e a cultivar MT, eram mais “grudentas” que o controle MT, iniciou-se a busca por fatos que explicassem tal característica. Segundo a literatura, *S. galapagense* (anteriormente denominada *Lycopersicon cheesmanii* f. *minor*), uma espécie selvagem intimamente relacionada com o tomateiro cultivado, possui baixa densidade de tricomas dos tipos I, V, VI e VII e uma grande quantidade de tricomas do tipo IV (SIMMONS; GURR, 2004; FIRDAUS et al., 2013), como também pode ser observado na figura 1A. Nos tricomas do tipo IV, os quais são ausentes na espécie cultivada (LUCKWILL, 1943, CHANNARAYAPPA et al., 1992), é produzido e exudado uma substância tóxica denominada acilaçúcar (GOFFREDA et al., 1989), a qual confere o caráter pegajoso das folhas.

Figura 1 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de tricomas em *Solanum galapagense* (A), Micro-Tom (B) e *Galapagos enhanced trichomes* (C). Imagens feitas a partir da superfície abaxial de plantas com 45 dias

Usando esse material BC1Fn, fez-se a introgressão da presença de tricomas tipo IV através de mais cinco gerações de retrocruzamentos com a cultivar MT e seleção de homozigotos. Assim, obtivemos uma linhagem quase isogênica (NIL) onde as plantas apresentam folhas pequenas e com grande quantidade de tricomas glandulares do tipo IV (Fig. 1C). A segregação de plantas com tricomas IV observada durante os vários cruzamentos no processo de introgressão levou a crer que essa característica é provavelmente monogênica e dominante, sendo que o locus foi denominado *Galapagos enhanced trichomes* (*Get*).

A quantificação de tricomas segundo os tipos mostrou que, quando comparado com MT, a NIL MT-*Get* apresenta redução significativa na densidade dos

tricomas tectores III e V em ambas as faces da folha, e do tricoma glandular do tipo VI na face abaxial. Porém, o tricoma glandular do tipo IV, que não aparece no controle MT (Fig. 2B), ocorre em grande quantidade no mutante, em ambas as faces. Esses dados, reforçam a hipótese de uma correlação negativa entre as quantidades de tricomas IV e V, como também foi observado por Fernández-Muñoz et al. (2003), quando trabalhavam na caracterização de plantas que continham tricoma do tipo IV oriundas de cruzamento com um genótipo de *S. pimpinellifolium*.

Figura 2 - Quantificação de tricomas na linhagem quase isogênica (NIL) contendo o alelo *Galapagos enhanced trichomes* (*Get*), comparado com o controle Micro-Tom (MT) nas faces adaxial (A) e abaxial (B) da quinta folha de plantas com 45 dias de idade. Barras de erros representam a média $\pm$ SE, $n=40$ para cada face. Os asteriscos representam a análise de acordo com o Teste - T pareado ($P < 0,05$)

Assim, obteve-se NIL ao MT com alta concentração do tricoma glandular do tipo IV, até então só existentes em espécies selvagens de *Solanum*. Essas plantas mostraram um aspecto *bushy*, ou seja, apresentaram tamanho reduzido (Fig. 3A) e maior índice de ramificação (Fig. 3B). Tal característica pode ser um efeito pleiotrópico de genes controlando a formação de tricomas ou o resultado da presença de alelos de *S. galapagense* em outros loci ligados a *Get*. Como o excesso de ramificações laterais (essencialmente ramos ladrões) é uma característica

detrimental em tomaticultura, avaliou-se a produtividade de *Get*, a qual mostrou-se significativamente menor (Fig. 4A). No entanto, não há diferenças significativas em relação ao peso médio de frutos produzidos (Fig. 4B) e no conteúdo de sólidos solúveis - °Brix (Fig. 4C). Observou-se também que apesar dessas plantas serem mais ramificadas que o controle MT, elas possuem menor massa seca de parte aérea (Fig. 5A) e maior massa seca de raiz (Fig. 5B), sendo esse último dado um parâmetro agrícola importante. Essa maior quantidade de raízes provavelmente deve-se a uma maior capacidade de formar esses órgãos, o que foi comprovada por teste de regeneração *in vitro*, no qual plantas *Get* apresentaram resultados significativamente superiores ao controle MT (Fig 5C).

Figura 3 - A- Aspecto vegetativo de plantas Micro-Tom (MT) e a NIL contendo o alelo *Galapagos enhanced trichomes* (*Get*) com 35 dias após semeadura. B- Altura do ramo principal de, MT-*Get* comparado com o controle MT. C- Valores de índice de ramificação. As barras de erros representam a média $\pm$ SE, $n=10$. Os asteriscos indicam a estatística de acordo com o Teste – T pareado ($P < 0,05$)

Figura 4 - Parâmetros de produtividade em Micro-Tom (MT) e na NIL contendo o alelo *Galapagos enhanced trichomes* (*Get*). A- Produtividade total de frutos na primeira florada; B- Peso total de frutos da primeira florada; C- Quantificação de sólidos solúveis totais (Brix). As barras de erros representam a média $\pm$ SE, n=10. Os asteriscos indicam a estatística de acordo com o Teste - T pareado ($P < 0,05$)

Figura 5 - A e B: Valores de massa seca de Micro-Tom e da NIL contendo o alelo *Galapagos enhanced trichomes* (*Get*) em plantas com 35 dias de idade. As barras de erros representam a média $\pm$ SE, n=10. C- Teste de regeneração *in vitro* utilizando meio indutor de raiz. Os asteriscos representam a análise de acordo com o Teste – T pareado ($P < 0,05$)

A partir dessa caracterização, observou-se que o *locus Get* tem como principal característica a formação e manutenção de tricomas do tipo IV, uma

estrutura associada a defesa a insetos ausente em MT. Isso nos impulsionou a tentar mapear este *locus* para futuros trabalhos de clonagem e caracterização funcional do mesmo, ferramentas que seriam de fundamental importância para o melhoramento genético em tomateiro.

Com os arquivos de sequenciamento de genoma total de plantas *Get*, sequências BAC-end e dados de mapeamento de Micro-Tom, além do genoma de *Solanum galapagense* LA1401, gentilmente cedidas pelos grupos dos professores Dr. Aoki Koh (Japão), Dr. Andrew Thompson (Reino Unido) e Dr. Sanders Peters (Holanda), iniciou-se a montagem *Reference-based* do genoma de MT-*Get*. Como resultados, obtivemos picos de SNPs nos cromossomos 2 e 6 (Fig. 6). Esses dados corroboram, em parte, o trabalho de Firdaus et al. (2013), que descreveram dois QTLs (Quantitative trait locus) de resistência a mosca-branca em tomateiro: um associado ao cromossomo 2, que explica 81,5% da ocorrência de tricomas do tipo IV; e um QTL menor no cromossomo 9, que também está associado com a sobrevivência de moscas adultas e caracteres associados ao tricoma. Assim, acredita-se que a formação de tricomas do tipo IV em MT-*Get* pode ser o resultado de uma epistasia entre alelos de *S. galapagense* presentes nos cromossomos 2 e 6. De fato, a análise de 200 plantas F2 vindas do cruzamento MT x MT-*Get* mostrou uma segregação de 167 plantas apresentando tricomas IV contra 33 plantas sem o tricoma IV, sendo esta uma segregação próxima de uma epistasia dominante recessiva. O fato de não termos introgridido o QTL presente no cromossomo 9, descoberto por Firdaus et al. (2013), indica que essa região provavelmente não é importante para a diferenciação de tricomas do tipo IV, mas provavelmente para biossíntese de acilaçúcar.

Figura 6 - Comparativo da distribuição dos SNPs de *Solanum galapagense*, Micro-Tom (MT) e da NIL contendo o alelo *Galapagos enhanced trichomes* (Get) ao longo dos cromossomos 2 e 6. O eixo vertical representa o número de SNPs e o horizontal a posição cromossomal de acordo com a versão 2.4 do genoma do tomateiro. Cada genótipo teve seu genoma montado tendo como referência os dados da cv. Heinz 1706 com SNPs de MT (Osaka Prefecture University, Japão). Os resultados de Get plotados foram filtrados, ou seja, deles foram retirados todos os SNPs em comum com MT

Tendo em mãos tais resultados, tentou-se compreender se a condição “presença de tricomas” estaria relacionada com locus apenas do cromossomo 2, apenas do cromossomo 6 ou seria relacionada com loci presentes em ambos os cromossomos (epistasia). Para responder tal questão, desenharam-se marcadores do tipo CAPS para regiões com os picos de SNPs apresentadas anteriormente. Dos marcadores desenhados para o cromossomo 2, dez mostraram polimorfismo entre

MT e *S. galapagense*. Dos marcadores desenhados para o cromossomo 6, apenas dois mostraram tal polimorfismo, sendo a maioria monomórficos.

Esses marcadores foram testados em uma população composta por 46 indivíduos BC7F2 e os resultados obtidos encontram-se representados na tabela 3.

Tabela 3 - Resultados obtidos com mapeamento utilizando os marcadores CAPS

Tricoma Tipo IV			Cromossomo 2										Cromossomo 6	
0 (MT)	1* (Get)	2* (Get)	1	2	4	A	C	D	6	E	F	G	2	4
#1	X		MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT
#2	X		MT	MT	MT	MT	F1	F1	F1	F1	F1	F1	F1	F1
#3		X	MT	MT	MT	MT	F1	F1	F1	F1	F1	F1	SG	SG
#4		X	MT	MT	MT	MT	F1	F1	F1	F1	F1	F1	F1	F1
#5	X		MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT	SG	SG
#6		X	MT	MT	MT	MT	SG	SG	SG	SG	SG	SG	SG	SG
#7		X	MT	MT	MT	MT	SG	SG	SG	SG	SG	SG	SG	SG
#8	X		MT	MT	MT	MT	MT	MT	F1	F1	F1	F1	F1	F1
#9	X		MT	MT	MT	MT	F1	F1	F1	F1	F1	F1	MT	MT
#10	X		MT	MT	MT	MT	F1	F1	F1	F1	F1	F1	MT	MT
#11		X	MT	MT	MT	MT	F1	F1	MT	F1	F1	F1	MT	MT
#12	X		MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT	SG	SG
#13		X	MT	MT	MT	MT	SG	SG	SG	SG	SG	SG	MT	MT
#14	X		MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT
#15	X		MT	MT	MT	MT	MT	MT	F1	MT	MT	MT	F1	F1
#16		X	MT	MT	MT	MT	F1	F1	F1	F1	F1	F1	MT	MT
#17	X		MT	MT	MT	MT	F1	F1	F1	F1	F1	F1	SG	SG
#18	X		MT	MT	MT	MT	SG	SG	SG	SG	SG	SG	MT	F1
#19	X		MT	MT	MT	MT	F1	F1	F1	F1	F1	F1	MT	MT
#20		X	MT	MT	MT	MT	F1	F1	F1	F1	F1	F1	MT	MT
#21	X		MT	MT	MT	MT	F1	F1	F1	F1	F1	F1	F1	F1
#22	X		MT	MT	MT	MT	F1	MT	F1	MT	F1	F1	F1	F1
#23		X	MT	MT	MT	MT	SG	SG	SG	SG	SG	SG	F1	F1
#24	X		MT	MT	MT	MT	SG	SG	SG	SG	SG	SG	F1	F1
#25	X		MT	MT	MT	MT	F1	F1	F1	F1	F1	F1	MT	MT
#26		X	MT	MT	MT	MT	SG	SG	SG	SG	SG	SG	F1	F1
#27	X		MT	MT	MT	MT	F1	F1	F1	F1	F1	F1	SG	SG
#28	X		MT	MT	MT	MT	F1	F1	F1	SG	SG	SG	F1	F1
#29		X	MT	MT	MT	MT	SG	SG	SG	SG	SG	SG	F1	F1
#30	X		MT	MT	MT	MT	MT	MT	F1	MT	MT	MT	F1	F1
#31		X	MT	MT	MT	MT	F1	F1	F1	F1	F1	F1	F1	F1
#32	X		MT	MT	MT	MT	F1	F1	F1	F1	F1	F1	SG	SG
#33	X		MT	MT	MT	MT	F1	F1	F1	F1	F1	F1	F1	F1
#34		X	MT	MT	MT	MT	F1	F1	F1	F1	F1	F1	SG	MT
#35		X	MT	MT	MT	MT	F1	SG	SG	SG	SG	SG	F1	F1
#36		X	MT	MT	MT	MT	SG	SG	SG	SG	SG	SG	F1	F1
#37	X		MT	MT	MT	MT	F1	F1	MT	F1	F1	F1	F1	F1
#38	X		MT	MT	MT	MT	MT	MT	F1	MT	MT	MT	F1	F1
#39		X	MT	MT	MT	MT	F1	F1	F1	F1	F1	F1	MT	MT
#40		X	MT	MT	MT	MT	F1	F1	F1	F1	F1	F1	F1	F1
#41	X		MT	MT	MT	MT	F1	SG	SG	SG	SG	SG	F1	F1
#42	X		MT	MT	MT	MT	MT	MT	F1	MT	MT	MT	MT	MT
#43		X	MT	MT	MT	MT	SG	SG	SG	F1	F1	F1	MT	MT
#44		X	MT	MT	MT	MT	F1	F1	MT	F1	F1	F1	SG	SG
#45		X	MT	MT	MT	MT	SG	SG	SG	F1	SG	SG	MT	MT
#46		X	MT	MT	MT	MT	F1	F1	F1	SG	F1	F1	SG	SG

*As plantas *Get* foram classificadas de acordo com a quantidade de tricomas presentes, as plantas classificadas como 1 tinham poucos tricomas, já as classificadas como 2 apresentavam tricomas em abundância

Os resultados preliminares de mapeamento parecem indicar o seguinte: i) A planta #5 sugere que a presença de alelos de *S. galapagense* no cromossomo 6 não

é suficiente para conferir tricomas tipo IV, ii) A correlação entre fenótipo e presença ou não de alelos de *S. galapagense* para os marcadores C, D, e 6 sugerem que o locus *Get* está próximo desses marcadores. Tal localização levaria a uma lista de 34 genes candidatos para *Get*, como descrito na tabela 4. Contudo, essa análise será refeita em BC7F3 buscando plantas recombinantes homozigotas para alelos de MT ou *S. galapagense* para os marcadores C, D, 6, E, F e G.

Tabela 4 - Genes descritos na região compreendida entre os marcadores C e 6 do cromossomo 2

ITAG	Descrição
Solyc02g093030	Peptidyl-tRNA hydrolase family protein.
Solyc02g093040	Cathepsin B-like cysteine proteinase
Solyc02g093050	WRKY transcription factor 26
Solyc02g093060	tRNA-dihydrouridine synthase 1-like protein
Solyc02g093070	2OG-Fe(II) oxygenase
Solyc02g093080	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
Solyc02g093090	Expressed protein (Fragment)
Solyc02g093100	Receptor like kinase, RLK
Solyc02g093110	Ubiquitin-conjugating enzyme E2
Solyc02g093120	RNA binding protein
Solyc02g093130	Ethylene-responsive transcription factor 5
Solyc02g093140	CBS domain-containing protein-like
Solyc02g093150	AP2-like ethylene-responsive transcription factor At1g16060
Solyc02g093160	Filament-like plant protein (Fragment)
Solyc02g093170	Cyclin delta-3
Solyc02g093180	N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase 3
Solyc02g093190	MEDEA (Fragment)
Solyc02g093200	Histone-lysine N-methyltransferase MEDEA
Solyc02g093210	MAPprotein kinase-like protein
Solyc02g093220	F-box/LRR-repeat protein 2
Solyc02g093230	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase
Solyc02g093240	Caffeoyl-CoA-O-methyltransferase
Solyc02g093250	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase
Solyc02g093260	Unknown Protein
Solyc02g093270	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase
Solyc02g093280	Transcription factor EB
Solyc02g093290	Nicotinate phosphoribosyltransferase-like protein
Solyc02g093300	DNA polymerase
Solyc02g093310	MAP-like protein kinase
Solyc02g093320	DNA mismatch repair protein-like
Solyc02g093330	Nup98 (Fragment)
Solyc02g093340	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3
Solyc02g093350	Homology to unknown gene
Solyc02g093360	Ribosomal protein S6 kinase
Solyc02g093370	Sucrose cleavage protein-like

Como mostrado no capítulo 1, o tricoma glandular do tipo IV é uma característica neotênica vegetal, ou seja, está associado com a manutenção de tecidos juvenis na fase adulta da planta. Sendo assim, ainda que não tenhamos conhecimento sobre a identidade gênica de *Get*, é provável que esse alelo de *S.*

galapagense seja capaz de “transformar” tricomas tectores em tricomas glandulares pela manutenção da característica de juvenilidade. Para testar tal hipótese, fez-se um duplo mutante com plantas *Wooly* (*Wo*), o qual possui tricomas do tipo I em folhas de plantas jovens (YANG et al., 2011) e expressiva formação de tricomas tectores (III e V) em folhas de plantas adultas (ver capítulo 1). Em uma população F2 foram analisadas plantas que possuíam fenótipo característico tanto de *Wo* (aspecto piloso a olho nú) e *Get* (plantas mais ramificadas). Dessas plantas, todas apresentaram tricomas glandular do tipo IV, que é ausente em *Wo* (Fig. 7). Das plantas analisadas, 70% apresentaram mais tricoma IV na face abaxial (Fig. 8C) e 80% mais tricomas IV na face adaxial do que as controle *Get* (Fig. 8B). Além disso, 90% das plantas analisadas apresentaram mais tricoma do tipo I, se comparadas com *Get* e *Wo* (Fig. 8A). Ao correlacionar o dado observou-se que as plantas 8, 20, 24, 25, 26 e 27 possuem mais tricomas I e IV do que as parentais que as deram origem. Esses resultados sugerem que tais plantas devem ser homozigotas para pelo menos um dos alelos (*Wo* ou *Get*).

Levando-se em conta que alguns duplos mutantes *GetXWo* F2 apresentaram até 10x mais tricomas IV (Fig. 8B e 8C), sugere-se uma ferramenta biotecnológica em potencial, a qual permitiria a produção de plantas com uma extrema densidade de tricomas para produção de aleloquímicos em grande quantidade. Porém, ainda é necessário a introgressão da via metabólica do acilaçúcar, já que as plantas *Get*, mesmo tendo muito tricomas IV, possuem uma quantidade significativamente menor de acilaçúcar, quando comparado ao controle MT (Fig. 9). Isso leva-nos a acreditar que, mesmo com a presença do tricoma, falta o *locus* (ou *loci*) para a produção de aleloquímico, ou seja, é necessário não somente os genes de diferenciação de tricomas, mas também aqueles codificando enzimas ou genes regulatórios da via metabólica. Uma tentativa de introgressão de tais *loci* está em curso em nosso laboratório, sendo os resultados preliminares apresentados no Anexo 2.

Figura 7 - Caracterização dos duplos *Get* x *Wo*. A- Face abaxial de plantas *Get* apresentando tricomas glandulares VI e IV; B- Face abaxial de plantas *Wo* apresentando tricomas tectores V e III; C- Face abaxial de duplo mutante *Wo,Get* apresentando tricomas I e grande quantidade de tricomas IV

Figura 8 - Quantificação de tricomas glandulares dos tipos I e IV nos duplos mutantes *Get* x *Wo*. A- Tricoma do tipo IV na face adaxial; B- Tricoma do tipo IV na face abaxial; C- Tricoma do tipo I na face adaxial

Figura 9 - Quantificação de acilaçúcar *Galapagos enhanced trichomes* (*Get*). As barras de erros representam a média $\pm$ SE, $n=24$. O asterisco indica a estatística de acordo com o Teste - T pareado ($P < 0,05$).

Essa menor quantidade de acilaçúcar, um metabólito secundário capaz de conferir resistência a insetos (LIEDI et al., 1995; MUIGAI et al., 2002) interferiu diretamente no teste de herbivoria com mosca-branca (*Bemisia tabaci*), no qual *Get* mostrou-se mais suscetível que MT quanto à deposição de ovos (Fig. 10A). Já nos testes com *Tuta absoluta*, verificou-se que as plantas *Get* mostraram-se significativamente mais resistentes à lagarta (Fig. 10C). Esses resultados mostram-se robustos, por terem sido feitos em situação real com plantas de todos os genótipos, uma ao lado das outras, onde o inseto tem liberdade de escolha. A suscetibilidade das plantas *Get* à mosca-branca pode ser explicada pelo fato desses insetos possuírem o comportamento de depositar seus ovos de maneira irregular por toda face abaxial das folhas (LACERDA; CARVALHO, 2008), a qual possui uma grande quantidade de tricomas do tipo IV. Como esses tricomas possuem tamanho variando entre 0,2 – 0,4 mm (GLAS et al., 2012) e as moscas possuem tamanho médio de $1,03 \pm 0,17$ mm (LIMA et al., 2001), os tricomas IV seriam incapazes de prejudicar as moscas por dano mecânico. Além disso, a menor quantidade de acilaçúcar em *Get* (Fig. 9) deve ter contribuído também para sua suscetibilidade. Acredita-se que essas plantas seriam mais resistente se também tivessem o(s) *locus* (*loci*) para maior quantidade de acilaçúcar, pois esse composto é capaz de causar a morte por aprisionamento, diminuindo a capacidade de oviposição (SIMMONS; GURR, 2005). Quanto à resistência de *Get* a *Tuta*, mais experimentos precisam ser realizados para esclarecer esses resultados.

Figura 10 - Testes de herbivoria em Micro-Tom (MT) e na NIL *Galapagos enhanced trichomes* (Get).
A - Quantificação de ovos de *Bemisia tabaci*; B- Quantificação de ninfas de *Bemisia tabaci*; C- Quantificação de dano foliar causado por *Tuta absoluta*

3.4 Conclusão

Os resultados obtidos confirmam que o alelo *Get* é o responsável pela formação e manutenção do tricoma do tipo IV, uma estrutura associada à defesa inexistente em MT. Uma linhagem quase isogênica para esse locus foi caracterizada, sendo observado que as plantas MT-*Get* são menores, mais ramificadas e apresentam uma pequena diminuição na produtividade, embora não diferiram do controle em relação ao peso médio dos frutos, e conteúdo de sólidos solúveis (°Brix). Com os dados de mapeamento através de SNPs, acredita-se que o locus *Get* esteja posicionado no cromossomo 2, entre os marcadores Solyc02g093030 e Solyc02g093370, não sendo, contudo, descartada totalmente a possibilidade de uma epistasia devido a presença de alelos de *S. galapagense* localizados no cromossomo 6.

As próximas etapas são a identificação de genes candidatos para a futura clonagem do(s) gene(s) *GET*, que será uma importante ferramenta para o desenvolvimento de variedades resistentes a herbívoros com uso reduzido de pesticidas

Referências

- CAMPOS, M.L.; ALMEIDA, M.; ROSSI, M. L.; MARTINELLI, A.P; LITHOLDO, C.G.; FIGUEIRA, A.; RAMPELOTTI-FERREIRA, F. T.; VENDRAMIM, J.D.; BENEDITO, V.A.; PERES, L.E.P. Brassinosteroids interact negatively with jasmonates in the formation of anti-herbivory traits in tomato. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.60, p. 4347–4361, 2009.
- CHANNARAYAPPA, S.G.; MUNIYAPPA, V.; FRIST, R.H. Resistance of *Lycopersicum* species to *Bemisia tabaci*, a tomato leaf curl virus vector. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.70, p. 2184-2192, 1992.
- FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; SALINAS, M.; ALVAREZ, M.; CUARTERO, J. Inheritance of resistance to two-spotted spider mite and glandular leaf trichomes in wild tomato *Lycopersicum pimpinellifolium* (Jusl.) Mill. **Journal of American Society of Horticultural Science**, Geneva. v.128, p. 188-195, 2003.
- FIRDAUS, S.; HEUSDEN, A.W.V.; HIDAYATI, N.; SUPENA, E.D.J.; MUMM, R.; VOS, R.C.H.; VISSER, R.G.F.; VOSMAN, B. Identification and QTL mapping of whitefly resistance components in *Solanum galapagense*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.126, p. 1487-1501, 2013.

- 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, 13:207-209, 1995.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, v.50, p. 151-158, 1968.
- GLAS, J.R.; SCHIMMEL, B.C.J; ALBA, J.M.; ESCOBAR-BRAVO, R.; SCHUURINK, R.C.; KANT, M.R. Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v.13, p. 17076-17103, 2012.
- GOFFREDA, J.C.; MUTSCHLER, M.A.; TINGEY, W.M. Feeding behavior of potato aphid affected by glandular trichomes of wild tomato. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Wezep, v. 48, p. 101 – 107, 1989.
- HAWTHORNE, D.J.; SHAPRIO, J.A.; TINGEY, W.M.; MUTSCHLER, M.A. Trichomes-borne and artificially applied acylsugars of wild tomato deter feeding and oviposition of leafminer *Liriomyza trifolii*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Wezep, v.65, p. 65-73, 1992.
- KONIECZNY, A.; AUSUBEL, F.M. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. **The Plant Journal**, Oxford, v.4(2), p. 403-410, 1993.
- LACERDA, J. T.; CARVALHO, R.A. Descrição e manejo integrado da mosca-branca (*Bemisia* spp.) transmissora de *geminivirus* em culturas econômicas. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.2, n.2, p. 15-22, 2008.
- LIEDL, E.; LAWSON, D.M.; WHITE, K.K. Acylsugars of wild tomato *Lycopersicon pennellii* alters settling and reduces oviposition of *Bemisia argentifolli* (Homoptera: Aleyrodidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.88, p. 742-748, 1995.
- LIMA, A.C.S.; LARA, F.M.; SANTOS, E.J.M. Morfologia da mosca branca, *Bemisia tabaci* biótipo “B” (Hemiptera: Aleyrodidae), encontrada em Jaboticabal, SP, com base em elétron – micrografias de varredura. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, Madrid, N. 27, p. 315-322, 2001.
- 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.
- LUCKWILL, L.C. The genus *Lycopersicon*: historical, biological, and taxonomic survey of the wild and cultivated tomatoes. **Aberdeen University Press**, Aberdeen, 44p., 1943.

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

MUIGAI, S.G.; SCHUSTER, D.J.; SNYDER, J.C.; SCOTT, J.W.; BASSETT, M.J.; MCAUSLANE, H.J. Mechanisms of resistance in *Lycopersicon* germplasm to the whitefly *Bemisia argentifolii*. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, 30, p. 347–360, 2002.

MURASHIGUE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p. 473-497, 1962.

PINO, L.E.; LOMBARDI-CRESTANA, S.; AZEVEDO, M.S.; SCOTTON, D.C.; BORGIO, L.; QUECINI, V.; FIGUEIRA, A.; PERES, L.E.P. The Rg-1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato Micro-Tom model system. **Plant Methods**, London, v.6, doi:10.1186/1746-4811-6-23, 2010.

RESENDE, J. T. V.; CARDOSO, M. G.; MALUF, W. R.; SANTOS, C. D.; GONÇALVES, L. D.; RESENDE, L. V.; NAVES, F. O. Método colométrico para quantificação de açúcares em genótipos em tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, p. 1024-1028, 2002.

RICK, C.M. The tomato. **Scientific American**, New York, v. 239, n. 2, p. 67-76, 1978.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, M.J.; GARZO, E.; BONANI, J.P.; FERERES, A.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; MORIONES, E. Whitefly resistance traits derived from the wild tomato *Solanum pimpinellifolium* affect the preference and feeding behaviour of *Bemisia tabaci* and reduce the spread of Tomato yellow leaf curl virus. **Phytopathology**, Lancaster – PA, v. 101, p. 1191–201, 2011.

SCOTT, I.M. Plant hormone response mutants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 78, p. 147-152, 1990.

SIMMONS, A.T.; GURR, G.M.; McGRATH, D.; NICOL, H.I.; MARTIN, P.M. Trichomes of *Lycopersicum* spp. and their effect on *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). **Australian Journal of Entomology**, Brisbane, v.42, p. 373-378, 2003.

SIMMONS, A.T.; GURR, G.M. Trichomes of *Lycopersion* species and their hybrids: effects on pests and natural enemies. **Agricultural and Forest Entomology**, Oxford, v. 7, p. 265-276, 2005.

TISSIER, A. Glandular trichomes: what comes after expressed sequence tags? **The Plant Journal**, Oxford, v. 70, p. 51-68, 2012.

VENDEMIATTI, E. **Compreendendo o desenvolvimento de tricomas glandulares em mutantes e variações genéticas naturais de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom)**. 2012. Monografia (Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

YANG, C.; LI, H.; ZHANG, J.; WANG, T.; YE, Z. Fine-mapping of the *woolly* gene controlling multicellular trichome formation and embryonic development in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.123, n.4, p. 625-633, 2011.

YANG, C.; LI, H.; ZHANG, J.; LUO, Z.; GONG, P.; ZHANG, C.; LI, J.; WANG, T.; ZHANG, Y.; LU, Y.; YE, Z. A regulatory gene induces trichome formation and embryo lethality in tomato. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 108, p. 11836-11841, 2011

4 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados desse trabalho revelam que *Solanum lycopersicum*, diferente do que até então foi descrito, possui tricomas glandulares do tipo IV, porém apenas em fases iniciais do desenvolvimento (cotilédones e primeiro par de folhas). A perda desse tricoma com o desenvolvimento da planta ainda não pode ser explicada, porém pode ser revertida por genes de juvenilidade, principalmente o microRNA 156.

O cruzamento da espécie selvagem *S. galapagense* LA1401 com o modelo genético Micro-Tom (MT) provou ser possível a introgressão de variações alélicas controlando a presença de tricomas tipo IV em folhas adultas de tomateiro. Embora ainda não se saiba a identidade gênica do alelo (ou alelos) introgridido(s), os resultados apresentados nos permitem concluir que tais genes podem ter um certo impacto negativo na produtividade, talvez por produzirem plantas mais juvenis e ramificadas, além de não terem, por si só, impacto positivo na produção de acilaçúcar. Sendo assim, pode se concluir também que a produção de acilaçúcar provavelmente depende de outros loci portando genes de vias metabólicas e não de desenvolvimento de tricomas. Isso posto, uma perspectiva apontada pelo presente trabalho é a futura clonagem de genes controladores do desenvolvimento de tricomas glandulares para estendê-los a outras espécies vegetais, além de fornecer marcadores moleculares para a seleção assistida e piramidação conjunta com genes controladores da via metabólica da produção de acilaçúcar.

ANEXOS

Anexo A - Atuação dos hormônios citocinina, estrigolactona e ácido salicílico no desenvolvimento dos tricomas glandulares

Introdução

Em 2009, Campos et al. estudou o papel de diversas classes hormonais na defesa contra herbivoria em tomateiro. No referido artigo, constatou-se que mutantes deficientes em brassinoesteróides (BR) e ácido jasmônico (JA) possuem fenótipos opostos, sendo o primeiro enriquecido em tricomas e o segundo deficiente na formação dessas estruturas e nos aleloquímicos a eles associados. Também foi constatado que BR se integra à via de JA na sinalização para formação de tricomas (CAMPOS et al., 2009). Assim, pode-se dizer que o JA é a principal classe hormonal envolvida nessa resposta. Essa constatação está de acordo com o já conhecido efeito do JA na produção de metabólitos secundários e de inibidores de proteases e aumento da atividade de polifenol oxidase (LI et al., 2004, CHEN, JONES; HOWE, 2006, CREELMAN; MULLET, 1996, THALER et al., 1996).

Embora o trabalho anterior não tenha achado alterações significativas na formação de tricomas em mutantes afetando auxina, giberelina, ácido abscísico e etileno, essa resposta até então não foi analisada em genótipos com alterações nos hormônios citocinina, estrigolactona e ácido salicílico. Sabe-se que a citocinina tem papel na regulação gênica de inibidores de proteinase (KERNAN; TORNBURG, 1989). Além disso, observamos recentemente que plantas transgênicas de tomateiro com baixos níveis de citocininas possuem aspecto glabro. Quanto ao hormônio estrigolactona (UMEHARA et al., 2008), o qual tem atuação já conhecida na arquitetura de diversos órgãos vegetais (RUYTER-SPIRA et al., 2013), possui papel preponderante em resposta a organismos diversos, com micorrizas e plantas parasitas (GOMEZ-ROLDANE et al., 2008, AKIYAMA; HAYASHI, 2006), levando a crer que possa ter também alguma função na interação com herbívoros. Já sobre o ácido salicílico, sabe-se que, juntamente com o JA, é um regulador global de diversos genes relacionados com o ataque de patógenos e insetos diversos (REYMOND; FARMER, 1998, SHAH, 2003).

Desse modo, buscamos encontrar relações entre a formação dos tricomas glandulares, os quais influenciam a resistência contra herbívoros, e a resposta aos hormônios citocinina, estrigolactona e ácido salicílico, além da confirmação do já descrito efeito do ácido jasmônico nesse processo. Para esse estudo, fez-se uso de

plantas transgênicas, as quais são ferramentas poderosas em trabalhos de desenvolvimento, pois criam uma alternativa de variação genética para aqueles temas onde não há mutantes naturais disponíveis. Utilizou-se plantas transformadas que apresentam níveis hormonais alterados, devido a mudanças em genes que codificam enzimas nas vias de biossíntese/ degradação ou em genes que codificam os componentes da via de transdução de sinal. Assim, é possível testar os efeitos epistáticos ou não da via de produção hormonal com o desenvolvimento dos tricomas, ao realizarmos o cruzamento da planta transgênica para determinado hormônio e o mutante de tricoma.

Material e Métodos

1. Materiais Vegetais

Para a realização do trabalho foi utilizada a cultivar Micro-Tom (MT) e os genótipos que encontram-se descritos na Tabela 1, de acordo com informações do site do laboratório (www.esalq.usp.br/tomato). As condições de cultivo foram as mesmas descritas no item descritas anteriormente.

Tabela 1 - Descrição dos transgênicos utilizados no trabalho.

	Função gênica	Morfologia	Ref.
35S::CKX2	Superexpressão de uma citocinina oxidase. Plantas com baixos níveis do hormônio.	Plantas mais ramificadas tanto em raízes quanto em partes aéreas.	PINO et al., 2010
35S::asCCD7	Antisense de RNA codificando enzima necessária para biossíntese de estrigolactona. As plantas possuem níveis reduzidos de SL	Plantas com muitas ramificações laterais e defeituosa para a colonização micorrízica nas raízes.	VOGEL et al., 2010, KOLTAI et al., 2010
35S::NahG	Plantas transgênicas têm níveis reduzidos de ácido salicílico (AS), devido à degradação pela enzima superexpressa.	Folhas maduras com lesões necróticas devido ao acúmulo de catecol (produto da degradação de AS).	BRADING et al., 2000
35S:: <i>Prosisteminina</i>	Superexpressão de prosisteminina, regulador positivo da via de sinalização de JA		MCGURL et al., 1994

2. Quantificação de tricomas

Folhas de plantas maduras, 45 dias após a germinação, foram coletadas do terço médio das plantas. Dessas folhas foram retirados pequenos pedaços, no

formato de fitas, que foram fixados em lâminas de vidro com esmalte incolor. Essas fitas foliares foram fotografadas perpendicularmente utilizando um suporte de isopor (para fixar a lâmina) e a lupa Leica S8AP0, em um aumento de 50x. A partir das imagens geradas, fez-se a contagem dos tricomas. Foram utilizadas 10 plantas por genótipo, com 4 repetições por planta para cada uma das faces foliares ($n = 40$). Os dados foram analisados estatisticamente com o Teste - T pareado. A metodologia aqui utilizada difere da habitual contagem feita observando a superfície da folha, pois os tricomas só podem ser corretamente diferenciados a partir de sua observação por inteiro, o que somente é possível observando em vista lateral (VENDEMIATTI, 2012).

Resultados e Discussão

Para estudo do transgênico 35S::CKX2 fez-se o uso de três eventos transgênicos independentes, nos quais os níveis de expressão do transgene variam amplamente, como descrito por Pino et al. (2010). Na linhagem B01 o transgene possui baixo nível de expressão relativa, já as linhagens A01-05 e A02-70 possuem alto nível de expressão relativa do transgene.

Os resultados obtidos apontam que a citocinina estaria relacionada com a via de desenvolvimento do tricoma glandular do tipo I, já que não se encontra esse tipo de estrutura na face adaxial de plantas com maior expressão de CKX2, o que leva a menores níveis endógenos de citocinina (Fig. 1A). Vale ressaltar que esse tipo de tricoma praticamente não é encontrado na face abaxial de *Solanum lycopersicum*.

Nos transgênicos também se notou uma variação no número de tricomas/superfície foliar: é o caso do tricoma glandular do tipo VI, que se mostra em quantidade aumentada na superfície adaxial (Fig 1A) de transgênicos com menores quantidades de citocinina.

Figura 1. Quantificação de tricomas glandulares nas linhagens transgênicas CKX2, comparadas com o controle Micro-Tom (MT). Barras de erros representam a média $\pm$ SE, $n=40$ para cada face. Os asteriscos representam a análise de acordo com o Teste - T pareado (* $< 0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$).

Em relação ao demais hormônios (Fig. 2), notou-se uma tendência de que baixas quantidades de estrigolactona e ácido salicílico influenciam negativamente a via de desenvolvimento do tricoma VI. Já a via do tricoma I e do tricoma VII também podem ser afetadas negativamente pelos baixos níveis de estrigolactona e ácido salicílico, respectivamente.

Em relação ao transgênico que superexpressa a prosistemina, regulador positivo da via de ácido jasmônico, obteve-se resultados que corroboram com os dados já publicados por Campos et al. (2009). No trabalho citado, o autor trabalhou com mutantes insensíveis a JA, que possui menores quantidades de tricomas VI quando comparados com o controle MT. O contrário ocorre no transgênico que possui níveis endógenos elevados de prosistemina, em consequentemente de JA: uma maior quantidade tricomas VI foram encontrados quando comparados com o controle MT.

Figura 2. Quantificação de tricomas glandulares nas linhagens transgênicas *35S::CCD7*, *35S::NahG* e *35S::Prosistemina*, comparadas com o controle Micro-Tom (MT). Barras de erros representam a média $\pm$ SE, $n=40$ para cada face. Os asteriscos representam a análise de acordo com o Teste – T pareado (* $< 0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$).

Anexo B – Introgressão de variações genéticas naturais controlando a produção de aleloquímicos e novos tipos de tricomas glandulares

1) Introgressão da variação genética natural *galapagos acyl sugar* (*gas*)

Introdução

Sabe-se que a resistência baseada em tricomas é constituída de três pilares principais: existência de tricomas adequados ao tipo de herbívoro a ser combatido, presença desse tricoma na face foliar adequada e acoplamento do tricoma à via de produção de aleloquímico.

Durante a caracterização da linhagem MT-Get (*Galapagos enhanced trichomes*), uma linhagem quase isogênica (NIL) ao modelo Micro-Tom (MT), notou-se a grande densidade de tricomas do tipo IV na superfície abaxial das plantas. Esse tricoma vem sendo apontado como principal responsável da resistência de espécies selvagens a mosca-branca (*Bemisia tabaci*), já que produz acilaçúcar: um metabólito secundário pegajoso, capaz de aprisionar pequenos insetos.

Porém, durante a caracterização das plantas MT-Get, constatou-se que mesmo tendo uma grande quantidade de tricomas IV, eles estavam desacoplados da via de produção do aleloquímico. Assim, decidiu-se cruzar esse material novamente com a espécie selvagem *Solanum galapagense*, visando selecionar linhagens com alto teor de AS. Dessa forma, vem sendo obtido o material denominado *gas* (*galapagos acyl sugar*).

Material e Métodos

1. Material Vegetal

Para a obtenção da linhagem fez-se o cruzamento de MT-Get com a espécie selvagem *Solanum galapagense* LA1401, seguindo o procedimento descrito por Pino et al. (2010). Na caracterização do material obtido utilizou-se como controle a cultivar MT e linhagem quase isogênica MT-Get, bem como plantas *gas* geração BC4F2.

2. Quantificação dos tricomas

Mesma descrita anteriormente.

3. Avaliação teores de açúcares via Rhodamine B

As medições foram realizadas na Embrapa Hortaliças (CNPq), situado no Distrito Federal.

Os folíolos foram mergulhados em 10 mL de acetonitrila 100% por 20 segundos para a remoção do exudato dos tricomas e sua área determinada mediante o uso do medidor portátil CI-202 (CID Inc, Camas, WA, USA). A acetonitrila foi evaporada a vácuo, em seguida foi colocados 5 mL de Rhodamine B 0,5% diluída em água destilada por 10 minutos. Posteriormente, frascos de vidro foram lavados cinco vezes com 10 mL de água destilada, sem agitação. Após a lavagem, foram colocados 2 mL de acetonitrila a 50% em cada frasco para a remoção de resíduos dos açúcares. A solução resultante foi então colocada em cubeta para análise química com absorvância de 550 nm (Espectrofotômetro UV-VIS - marca 220-2000UV, Shimadzu) (Lin; Wagner 1994). Uma curva padrão foi gerada utilizando-se concentrações conhecidas de solução de glicose em água. Para tanto, foi preparada uma solução padrão de glicose 80 mg/L e depois foram efetuadas diluições por 10 vezes, para se obter cada concentração desejada. Com os dados de absorvância das soluções de glicose calculou-se uma curva de regressão para o teor total de açúcares, de forma que as concentrações indicadas para cada ponto da curva foram expressas no seu equivalente em nanomol/cm² (nMol/cm²) de área foliar.

Foram analisadas 8 amostras de cada genótipo, sendo os dados avaliados estatisticamente através do Teste-T pareado.

4. Teste de Herbivoria com *Bemisia tabaci* (Mosca-branca).

O experimento foi conduzido na Estação de Pesquisa da Empresa Nunhems, localizada no município de Uberlândia, estado de Minas Gerais.

As mudas dos genótipos a serem avaliados foram semeadas em bandejas de plástico de 24 células, utilizando substrato à base de fibra de coco, e permaneceram em estufas adequadas para o crescimento até atingirem a idade de 30 dias. Posteriormente, as bandejas foram alocadas aleatoriamente em casa de vegetação (7m x15m) infestada com alta população de mosca-branca (*Bemisia tabaci*), onde os insetos são criados e mantidos exclusivamente para os testes de resistência em tomateiro. As plantas permaneceram ali por 7 dias para que ocorresse a postura dos ovos nas folhas das plantas. Após o período de inoculação, as bandejas foram enviados para o laboratório da Universidade de São Paulo – ESALQ. Após 7 dias,

30 plantas foram escolhidas aleatoriamente. De cada uma dessas plantas, 3 amostras foram retiradas a fim de realizar a contagem de ninfas eclodidas. As amostras foram fotografadas em lupa, em aumento de 40x e a análise estatística foi realizada através do Teste T - pareado.

Resultados e Discussão

A contagem de tricomas teve como controle a linhagem MT-*Get*, já que foi a partir dela que se fez o cruzamento com *S. galapagense* LA1401 para a introgressão da via metabólica do acilaçúcar. Percebe-se pelos resultados obtidos que não há diferenças significativas quando se leva em conta a face abaxial das plantas (Fig. 1B), mas o mesmo não ocorre na face adaxial das mesmas (Fig. 1A): nessa superfície foliar encontra-se uma quantidade significativamente superior de tricomas do tipo V em detrimento do tricoma glandular do tipo IV na linhagem *gas*. Essa correlação entre esses tipos de tricomas já foi observada no capítulo I desse trabalho. Também se observa uma diminuição do tricoma do tipo VI. Uma interpretação para menor formação de tricomas tipo IV em *gas*, quando comparada com *Get*, seria o fato de *Get* possivelmente estar em heterozigose na linhagem *gas*.

Figura 1. Quantificação de tricomas na linhagem *gas*, comparada com o controle *Get*. Barras de erros representam a média $\pm$ SE, $n=40$ para cada face. Os asteriscos representam a análise de acordo com o Teste - T pareado (* < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001).

Em relação a quantidade de acilaçúcar produzido, a linhagem *gas* mostrou-se significativamente superior aos controles MT e *Get*. O resultado foi um pouco mascarado pela alta variação entre as plantas segregantes, já que a linhagem analisada foi um BC4F2, o que gerou um erro elevado na análise estatística (Fig. 2A). Esse dado confirma a introgressão da via de acilaçúcar, pois mesmo com um número menor de tricomas glandulares do tipo IV (Fig. 1), a linhagem apresenta mais metabólito secundário que os controles.

Já em relação a resistência a mosca-branca (*Bemisia tabaci*), no experimento montado tanto *Get* quanto *gas* mostraram-se resistentes ao ataque do inseto, quando comparados ao controle MT no qual não existe a presença dos tricomas tipo IV (Fig 2B).

Figura 2. Caracterização da linhagem *gas* quanto ao teor de acilacúcar presente nas folhas (A) e a resposta das plantas em um teste de herbivoria com mosca-branca (B).

2) Introgressão da variação natural *Pincushion-like* (*Pik*)

Introdução

Sabe-se que o tomateiro cultivado representa apenas uma pequena porção do pool gênico em tomateiro. Uma das características que podem ter sido perdidas durante o processo de domesticação, está a ausência de um tipo especial de tricoma do tipo VI que está presente na espécie selvagem *Solanum habrochaites f. glabratum* (FRIDMAN et al., 2005). Este subtipo de tricoma apresenta as quatro células formadoras da glândula envoltas por uma cutícula, o que lhe confere o aspecto mais globular (Fig. 3). E especificamente nesse tipo de tricoma IV encontra-se a via de biossíntese de metilcetonas (MK), entre elas a 2-Tridecanona (2TD) e a 2-Undecanona (2UD) que controlam diversos tipos de pragas, entre elas o ácaro rajado (*Tetranychus urticae*) e a traça do tomateiro (*Tuta absoluta*) (BARBOSA; MALUF, 1996, FRIDMAN et al., 2005, TISSIER, 2012).

Figura 3. Diferenças morfológicas entre os tipos de tricomas VI em *Solanum lycopersicum* (esquerda) e *Solanum habrochaites* f. *glabratum* (direita). Extraído e adaptado de TISSIER, 2012.

Sendo assim, buscou-se a introgressão desse tipo especial de tricoma VI em *Solanum lycopersicum* cv. MT e para essa linhagem deu-se o nome de *Pincushion-like* (*Pik*), já que o padrão desses tricomas nas folhas observadas remetem a um alfineteiro (*pincushion*, em inglês).

Material e Métodos

1. Material Vegetal

Para a obtenção da linhagem fez-se o cruzamento de plantas Micro-Tom com a espécie selvagem *Solanum habrochaites* PI127826, seguindo o procedimento descrito por PINO et al. (2010). Na caracterização do material obtido utilizou-se como controle a cultivar MT e as plantas *Pik* geração BC6F3.

2. Caracterização morfológica dos tricomas

De folhas de, aproximadamente, 40 dias foram retirados pequenos pedaços, no formato de fitas, que foram fixados em lâminas de vidro com esmalte incolor. Essas fitas foliares foram fotografadas perpendicularmente utilizando um suporte de isopor (para fixar a lâmina) e a lupa Leica S8AP0, em um aumento de 50x.

3. Resultados e Discussão

Durante o processo de introgressão foram enfrentadas algumas dificuldades, como a baixa produção de pólen em algumas gerações e a baixa taxa de germinação dos indivíduos heterozigotos, o que fez com que o trabalho atrasasse. Mesmo estando na geração BC6F3 é ainda muito difícil realizar o teste de progênie, ou seja, encontrar plantas cujos indivíduos de uma autofecundação sejam todos

homozigotos, já que esses produzem frutos partenocárpicos. Assim, não se conseguiu, ainda, uma linhagem isogênica para a característica de tricomas tipo VI vindo do parental selvagem, o que impossibilitou uma caracterização mais profunda.

Porém, ao analisar algumas linhagens heterozigotas isolou-se plantas que apresentavam tricomas do tipo VI com a morfologia alterada, como mostrado na figura 4C. O tricoma apresenta-se com tamanho reduzido, se comparado com *Solanum habrochaites* PI134417 (Fig. 4A) e com a glândula mais arredondada do que o parental Micro-Tom (Fig. 4B).

Figure 4. Tipos de tricoma VI. (A) *S. habrochaites* PI134417. (B) *S. lycopersicum* cv Micro-Tom. (C) *Pincushion-like (Pik)* BC6F3

Referências

AKIYAMA, K.; HAYASHI, H. Strigolactones: chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. **Annals of Botany**, England, v. 97, p. 925 - 931, 2006.

BARBOSA, L.V.; W.R. MALUF. Heritability of 2-tridecanone mediated arthropod resistance in an interspecific segregating generation of tomato. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, p. 465–468, 1996.

BRADING, P.A., HAMMOND-KOSSACK, K.E., PARR, A.; JONES, J.D.G. Salicylic acid is not required for *Cf-2*- and *Cf-9*-dependent resistance of tomato to *Cladosporium fulvum*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 23, p. 305-318, 2000.

CAMPOS, M.L. **Controle Hormonal da Defesa à herbivoria em tomateiro**. 2009. 117 p. Tese (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

CAMPOS, M.L.; ALMEIDA, M.; ROSSI, M.L.; MARTINELLI, A.P.; LITHOLDO, C.G.; FIGUEIRA, A.; RAMPELOTTI-FERREIRA, F.T.; VENDRAMIM, J.D.; BENEDITO, V.A.; PERES, L.E.P. Brassinosteroids interact negatively with jasmonates in the formation of anti-herbivory traits in tomato. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.60, p. 4347–4361, 2009.

CHEN, H.; JONES, D.; HOWE, G.A. Constitutive activation of jasmonate signaling pathway enhances the production of secondary metabolites in tomato. **FEBS Letters**, Heidelberg, v.580, p.2540-2546, 2006.

CREELMAN, R.A.; MULLET, J.E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.48, p.355-381, 1997.

FRIDMAN, E.; WANG, J.; IJIMA, Y.; FROELICH, J.E.; GANG, D.R.; OHLROGGE, J.; PICHERSKY, E. Metabolic, genomic and biochemical analyses of glandular trichomes from the wild tomato species *Lycopersicon hirsutum* identify a key enzyme in the biosynthesis of methyl ketones. **Plant Cell**, Baltimore, v. 17, p. 1252–1267, 2005.

GOMEZ-ROLDAN, V.; FERMAS, S.; BREWER, P.; PUECH-PAGÈS, V.; DUN, E.A.; PILLOT J.P.; LETISSE, F.; MATUSOVA, R.; DANOUN, S.; PORTAIS, J.C.; BOUWMEESTER, H.; BÉCARD, G.; BEVERIDGE, C.A.; RAMEAU, C.; ROCHANGE, S.F. Strigolactone inhibition of shoot branching. **Nature**, London, v. 455, p. 189 – 194, 2008.

KERNAN, A.; THORNBURG, R.W. Auxin Levels Regulate the Expression of a Wound-Inducible Proteinase Inhibitor II-Chloramphenicol Acetyl Transferase Gene Fusion *in Vitro* and *in Vivo*. **Plant Physiology**, Rockville, v.91, p.73-78, 1989.

KOLTAI, H.; DOR, E.; HERSHENHORN, J.; JOEL, D.M.; WEININGER, S.; LEKALLA, S.; SHEALTIEL, H.; BHATTACHARYA, C.; ELIAHU, E.; RESNICK, N. Strigolactones' effect on root growth and root-hair elongation may be mediated by auxin-efflux carriers. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 29, p. 129–136, 2010.

LI, L.; ZHAO, Y.; MCCAIG, B.C.; WINGERD, B.A.; WANG, J.; MARK, E.W.; PICHERSKY, E.; HOWE, G.A. The tomato homolog of COROTINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. **The Plant Cell**. Baltimore, v. 16, p. 126-143, 2004.

LIN, Y.; WAGNER, G.J. Rapid and Simple Method for Estimation of Sugar Ester. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 42, p. 1709-1712, 1994.

McGURL, B.; OROZCO-CARDENAS, M.; PEARCE, G.; RYAN, C. A. Over-expression of the prosystemin gene in transgenic tomato plants generates a systemic signal that constitutively induces proteinase inhibitor synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington – DC, v. 91, p. 9799-9802, 1994.

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**, London, v. 6, 2010.

REYMOND, P.; FARMER, E. E. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 1, p. 404-411, 1998.

RUYTER-SPIRA, C.; AL-BABILI, S.; KROL, S.; BOUWMEESTER, H. The biology of strigolactones. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 18, p. 72–83, 2013.

SHAH, J. The SA loop in plant defense. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 6, p. 365-371, 2003.

THALER, J.S.; STOUT, M.J.; KARBAN, K.; DUFFEY, S.S. Exogenous jasmonates simulate insect wounding in tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in the laboratory and field. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.22, p.1767-1781, 1996.

VOGEL, J. T.; WALTER, M. H.; GIAVALISCO, P.; LYTOVCHENKO, A.; KOHLEN, W.; CHARNIKHOVA, T.; SIMKIN, A.J.; GOULET, C.; STRACK, D.; BOUWMEESTER, H.J.; FERNIE, A.R.; KLEE, H.J. SICCD7 controls strigolactone biosynthesis, shoot branching and mycorrhiza-induced apocarotenoid formation in tomato. **The Plant Journal**, Oxford, v. 61, p. 300–311, 2010.

TISSIER, A. Glandular trichomes: what comes after expressed sequence tags? **The Plant Journal**, Oxford, v. 70, p. 51-68, 2012

UMEHARA, M.; HANADA, A.; YOSHIDA, S.; AKIYAMA, K.; ARITE, T.; TAKEDA-KAMIYA, N.; MAGOME, H.; KAMIYA, Y.; SHIRASU, K.; YONEYAMA, K.; KYOZUKA, J.; YAMAGUCHI, S. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. **Nature**, London, v.455, p. 195-200, 2008.

VENDEMIATTI, E. **Compreendendo o desenvolvimento de tricomas glandulares em mutantes e variações genéticas naturais de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom)**. 2012. Monografia (Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.