**Caracterização de determinantes genéticos envolvidos na qualidade
industrial e nutricional do fruto de tomate**

Luisa Fernanda Bermúdez Salazar

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para a
obtenção de Título de Doutor em Ciências, na área de Botânica.

Orientadora: Profa. Dra. María Magdalena Rossi

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Carrari

São Paulo
2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Bermúdez, Luisa Fernanda

Titulo da tese: Caracterização de determinantes genéticos envolvidos na qualidade industrial e nutricional do fruto de tomate.

Número de páginas: 222

Tese (Doutorado Direto) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Botânica.

1. tomate. 2. *Solanum lycopersicum*. 3. qualidade de fruto. 4. metabolismo.

A comissão julgadora dos trabalhos de defesa da tese de doutorado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou

Aprovado () Reprovado()

COMISSÃO JULGADORA

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). María Magdalena Rossi

A los amores de mi vida

Jaime, Gilma y Camila

Dedico

AGRADECIMENTOS

Este doutorado além do crescimento profissional representou uma experiência de vida inigualável. Conheci países maravilhosos entre eles o Brasil e a Argentina que agora amo quase como a minha querida Colômbia. Levo comigo famílias, amigos e irmãos, além de muitas experiências que mudaram minha vida para sempre. É a vocês que agradeço por ter me acompanhado neste caminho e ter feito isto possível!

NO BRASIL...

Ao Brasil por me receber e permitir continuar a minha formação acadêmica.

Ao Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo pelo suporte acadêmico e estrutural.

A Magda... Son tantas cosas que quisiera agradecerte que no alcanzaría a plasmarlo aquí. Primero, gracias por la confianza brindada tantas veces, por oírme y empujarme a dar pasos que probablemente nunca los hubiera dado sola y que cambiaron mi vida. Mil gracias por haber sido mi orientadora, amiga y hasta mamá cuando fue necesario. Gracias por compartir conmigo tu familia, amigos, casa y viajes... Enloqueciste conmigo para intentar "entender" esto, acompañándome en este proceso científico, para al final darnos cuenta que cuanto más aprendemos percibimos que cada vez nos queda más por saber. Eres un ejemplo de mujer en la ciencia y esto se ve reflejado aquí y en el equipo de "chicas" científicas que vienes formando. En fin, se que este es solo uno de los tantos logros que tendremos juntas. Te adoro mi vieja de 42!!

À Profa. Dra. Marie-Anne Van Sluys por ter sempre as portas abertas.

Às meninas do GMP – Silvia, Dani, Junia, Juliana e Fabi, pelo apoio incondicional brindado, amizade e por ter feito este novo grupo de científicas o melhor lugar para trabalhar. À Silvia pela imensa ajuda com os experimentos de última hora, compras e por fazer tudo mais fácil no lab. À Dani que esteve sempre disponível para nos ajudar. À Junia pelas dicas agronômicas. À Ju pela amizade, ajuda com as clonagens, discussões muito ricas, companhia na Argentina em momentos muito especiais e claro por todas as milhares de correções do meu portunhol.

À Fa, meu querido babelito de Godoy. Você sabe que esta tese é tanto minha quanto sua, você fez parte de tudo e sempre esteve ao meu lado (seja presencialmente, ou via skype/gmail) para me apoiar e acompanhar... pensamos y comemoramos juntas, mas também estive aí quando as coisas não estavam tão certas. Agradeço à vida por ter me dado a melhor parceira científica que além de tudo é minha irmã. Foi muito lindo ter você ao meu lado nesta etapa tão importante na minha vida. Te amo!!

À Nati, você foi um suporte muito importante tanto no âmbito científico como pessoal. Fez com que a "evolução dos tomates" fosse digerível e até legal! Teve a paciência suficiente para me escutar sempre, seja falando de Schauer, chaperonas e tocoferóis, até para conversar da vida. Obrigada pela sua amizade, por tantas conversas e

“desconexões” e por me receber na tua casa sempre com os braços abertos e, mais ainda, nesta última etapa.

Ao pessoal do “antigo” e “novo” GaTE lab - Alessandro, Andrés, Breno, Bruno, Cushla, Dani Q, Dani Milstein, Douglas, Érika, Guilherme, Hana, Jonas, Juliana Nico, Juliane, Kleber, Leonor, Marcelo, Marisa, Mayra, Myna, Nathalia, Nilo, Robson, Tatiana, Úrsula, Vivian e Wanessa.

À Úrsula e Dani Milstein pelo treinamento científico e amizade que me brindaram no começo deste projeto, foram parte fundamental do mesmo.

Ao Robson, Alessandro, Marcelito, Gui e Andrés pelo suporte e por ter me acompanhado na minha entrada no mundo bioinformático. Fizeram tudo mais fácil e até divertido!!

Ao Duggy, Muchachito Marcelito, Andrés e Gui por fazer tantas tardes-noites mais divertidas e sempre me fazer sorrir. No final a minha cuca não ficou tão bagunçada assim!!!

À Maria Elisa pela sua amizade, conversas e cafecitos que tanto bem me fizeram.

Ao Gerson e o Santiago por me receber na sua casa e agüentar esses dias de loucura finais. Fizeram tudo melhor nesses momentos críticos!

À Pati, minha cunhis, que foi mais que uma irmã para mim, você fez parte de tudo isto, me trouxe até a USP e me acompanhou até o final. Obrigada pela companhia, amor e família que me deu, além da minha afilhadinha maravilhosa. Obrigada por tantos momentos lindos que me fez passar e por estar ao meu lado quando mais eu precisei, me cuidar, desde o meu dengue brasileiro até quando meu coração mais precisava de alguém. Você, o Marcio e as minhas hermosas princesas são a minha família brasileira que ficara para sempre no meu coração. Amo vocês!

Ao Renato por ter me permitido conhecer o Brasil, foi muito importante sua companhia e apoio no começo deste projeto.

Aos “Monticellis” e “Ferreiras” por me receber como uma integrante mais da família e me aconchegar quando mais batiam saudades de casa.

Especialmente ao Tio Luiz, Gê, Bê e Gaby, por me receber tantas vezes na sua casa, me dar todo o amor nesses abraços apertados, soupinhas e claro, cervejinhas! Obrigada mesmo.

Ao Marcio, Aline, Edu, Lu, Cristian e Pati, por comemorar comigo todas as festas do tomate e me brindar sua amizade ao longo destes anos.

EN ARGENTINA

Al Instituto de Biotecnología del INTA- Castelar por el soporte brindado.

A Fer, gracias por todo el apoyo académico y personal que me ofreciste. Ha sido una experiencia gratificante tu orientación. Hiciste subir mi autoestima científica cuando ya no creía en nada y me enseñaste nuevas formas de hacer ciencia. Fue tanto tu apoyo que hasta recorriste conmigo 2,600 Km en auto en 3 días! Pero bueno, hasta fue divertido! Espero que esto sea solo el comienzo de un largo camino científico a recorrer con el grupo y que vengan muchos éxitos más! Tu amistad y la de Trixi son muy importantes para mí, amé compartir y disfrutar con ustedes mi linda Colombia!

A Ramón, Santi y Vir por todo el apoyo brindado durante las maratonas de tocoferoles en Córdoba.

A Ceci Vasquez, Sebas, Mariana y Fabiana Bigi, por todas las discusiones y oír mis telenovelas de fugitiva colombiana.

A Oscar por su buena energía todos los días, es lindo comenzar el día con una sonrisa. Ya tengo casi un armario lleno de bolitas de papel!

A Cintia, Sandra y Perla por toda su ayuda y buena onda.

Muy especialmente a los chicos del Invernáculo - Agustín, Martín, Nacho y Mati, por su ayuda, siempre buena disposición y excelente trabajo que hicieron parte vital de todo esto.

A las chicas del TEM, GRACIAS!! Por las enseñanzas, cariño y apoyo que me brindaron durante los largos días de repiques y mas repiques, además de cuidarme mis plantitas cuando estaba en algún lugar del mundo.

A los tomateros – Gabriel, Guada, Julia, Lau K., Lean, Mari Conte, Mari Lopez y Tomás, por las tantas discusiones enriquecedoras, ayuda y por toda la buena onda para hacer cada vez mejor este grupo.

A Lean por tantas conversaciones científicas y por las otras también, en aquellas tardes pelando tomates. Por su amistad y estar siempre ahí para oír y ayudarme con mis nudos cerebrales!

A Lau Ramos por todo el cariño que siempre me brindó y estar siempre con una sonrisa dispuesta a ayudar.

A los chicos del lab, Ceci, Mari C, Carlos, Guada, Gabi y Lean por las tantas terapias grupales, facturas, chocolates y hacer con que el día a día sea más fácil de llevar.

A Gabi Conti y Vanessita por su apoyo y amistad! Gracias por estar siempre dispuestas a oírme.

A Fede por siempre, sea como sea, sacarme una sonrisa! Alegraste hasta los días más oscuros "Intianos"... Gracias por tu cariño y apoyo!!!

A Natalia, Diego, Guille, Vanessa, Gaby LLauger, Cori, Lucila por toda su ayuda!

A Guille por todas las "terapias de carro", por su compañía durante tantos días...

A Grace, por ser mi embajada Colombiana en Argentina y disfrutar conmigo los triunfos de los tomatos! Te amo amiguita!

A Carli, por ser mi compañera durante tanto tiempo, oír todas mis telenovelas colombo-brasileras, fue muy lindo haber podido compartir este tiempo contigo y Alimañas!

A Carla, Lu y Caro por tantas noches locas y cuidarme al nene en mi ausencia! Y, obviamente, ser mis amigas y compartir conmigo esta etapa hermosa de mi vida! Las adoro!

A Pili y Willy por adoptarme como la nena de casa, oír todas mis descargas tomateras y consentirme siempre. Gracias por todo su apoyo, por brindarme su casa como la mía y sobre todo por "prestarme" su hijo maravilloso!

A ti "José" Ignacio... el mejor regalo que me pudo haber dejado la querida jefa tía en este doctorado. Muchas veces creo que la vida conspiró todo esto solo para que nos encontráramos. Gracias por llegar a mi vida y hacerme feliz, por acompañarme en los momentos más críticos de este proyecto, por intentar entender con todo el amor del mundo desde el ADN hasta las chaperonas y tocoferoles. Por apoyarme y darme ánimo en mis miles de crisis "becarias". Sé que esta es solo una de las metas que vamos a conquistar en nuestra vida juntos. Te amo chuic.

EN COLOMBIA

A mis papás y hermanita Camila, por ser mi ejemplo y motor de vida. Sin su apoyo y amor incondicional nada de esto hubiera sido posible. Por entender mi ausencia en estos cuatro años que espero poder recompensar, aunque sea en parte. Sabemos lo difícil que ha sido, pero también tenemos certeza que el amor supera todas las barreras de tiempo y espacio. Gracias por estar siempre ahí para darme todo el amor telefónicamente y hacerme sentir que estaban ahí a mi lado. Los amo requete... hasta el cielo infinito.

A mi hermanita, especialmente, por toda su ayuda de *design* por toda la paciencia con los tomates de todas las formas, tamaños y colores. Viste que lindos eran? Te amo!

A mi tío Mauricio, por ser mi ángel de la guarda, guiarme y protegerme durante toda mi vida.

A mis amigas de vida - Mónica, Ana, Grace, Figue, Kolo, Sandy y Luisa, ni siquiera 10 años, miles de kilómetros de distancia y dos continentes nos han separado! Gracias por estar acompañándome vía skype y compartir conmigo todas las etapas de este proyecto! Las amo amigas.

Gracias a la vida que me ha dado tanto...
Violeta Parra

ABREVIATURAS E NEOLOGISMOS

AA – aminoácidos
ADPGlc – ADP-Glicose
AGPase – ADP-Glicose pirofosforilase
AMP – adenosina monofosfato
APT – antranilato fosforribosiltransferase
ATP – adenosina trifosfato
ATPase – adenosina trifosfato pirofosfatase
BAC – cromossomos artificiais bacterianos (*Bacterial Artificial Chromosomes*)
BHT – hidroxitolueno butilado
bin – fragmento cromossômico delimitado por marcadores moleculares
BLAST – ferramenta básica de busca de alinhamentos locais (*Basic Local Alignment Search Tool*)
bp – pares de bases
Brix – índice da concentração de sólidos solúveis
CaMV: vírus do mosaico da couve-flor
cDNA – DNA complementar
CHL – clorofilase
cM – centimorgan
Ct – threshold cycle
CWIN – invertase de parede celular
DEPC – dietilpirocarbonato
DMPQ - 2,3-dimetil-5-fetil-1,4-hidroquinol
 D_N – distância não-sinônima
DNA – ácido desoxirribonucleico
DNAse – desoxirribonuclease
dNTP – desorribonucleotídeo trifosfatado
 D_s – distância sinônima
EDTA – ácido etilenodiamonotetracético
EST – fragmentos de sequências expressas (*Expressed Sequence Tag*)
F26BP – frutose-2,6-bifosfato
FBPase – Frutose-1,6-bifosfatase
FPGS – folilpoliglutamato sintase
Fru-frutose
Fru6P – frutose-6-fosfato
G6DPH – glicose-6-difosfato desidrogenase
GABA – ácido gama-aminobutírico
GC-MS – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (*Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*)
GFP – proteína fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein*)
Glc1P-glicose-1-fosfato
Glc6P-glicose-6-fosfato
Glc-glicose
GGDP - geranil geranil difosfato
GPPS – geranil pirofosfato sintase
GUS – β -glucoronidase
HEPES – ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfônico
HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)
HPPD – 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase

HPT/ VTE2 – homogenisato fitil transferase
IL – linhagem introgridida (*introgressed line*)
indels – *inserções/deleções*
IRGA - infrared gas analyser
Kb – kilo pares de base
LB - meio de Luria-Bertani
LTRs – longas terminações repetidas (*Long Terminal Repeats*)
LYCB – licopeno β -ciclase
MAA: milhões de anos atrás
Mb – mega pares de base
MEP – metileritritol fosfato
MES – ácido 2-morfolinoetanosulfônico monohidratado
MPQ - 2-metil-6-fitol-1,4-hidroquinol
MSS - meio Murashige-Skoog com 20% sacarose
NADP – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido
Nc – número efetivo de codons
nt – nucleotídeos
3-PGA – fosfo-gliceraldeido-trifosfato
PCR – reação em cadeia da polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)
PFD – densidade de fluxo de fótons (*Photon Flux Density*)
Pi – fosfato inorgânico
PPM - partes por milhão
PRAI – fosforribosilantranilato isomerase
PSI – fotossistema I
PSII- fotossistema II
QML – locos para caracteres metabólicos quantitativos (*Quantitative Metabolic Loci*)
qPCR - reação em cadeia da polimerasa quantitativa (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*)
QTL – locos para caracteres quantitativos (*Quantitative Trait Loci*)
RNA – ácido ribonucleico
RNAi – RNA de interferência
RNA_m – ácido ribonucleico mensageiro
RNAse - ribonuclease
ROS – espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)
rpm – revoluções por minuto
SK –rota do chiquimato
SnRK1 – proteínas quinases relacionadas a sacarose não-fermentativa
SPS- sacarose fosfato sintase
SuSy – sacarose sintase
TAE – tampão tris-acetato-EDTA
TAT – tirosina aminotransferase
TyrA – arogenato desidrogenase
Unigene – consenso de sequências de cDNA segundo a Solanaceae Genomics Network
UTR – região não traduzida (*Untranslated Region*)
VTE – vitamina E
VTE1 – tocoferol ciclase
VTE3 – dimetil-fitolquinol metil transferase
VTE4 – γ -tocoferol C-metil transferase
VTE5 – fitol quinase
YAL – locos para caracteres associados ao rendimento (*Yield Associated Loci*)

RESUMO

A presente tese aborda o estudo do metabolismo dos frutos de tomate a partir de três estratégias complementares: *i)* a identificação de genes candidatos co-localizados com QTL, previamente descritos a partir do perfil metabólico de *S. lycopersicum* (cv. M82) e linhagens introgridas de *S. pennellii*, associados ao conteúdo de metabólitos de interesse industrial e nutricional; *ii)* a análise estrutural das regiões genômicas portadoras desses genes; e *iii)* a análise funcional dos genes *chaperona DnaJ* e *sec14* por meio de genética reversa mediante o silenciamento por RNAi. A análise de marcadores moleculares previamente mapeados nas regiões portadoras dos QTL permitiu identificar 127 genes candidatos cujos produtos foram mapeados nas rotas metabólicas correspondentes. Um subgrupo desses genes apresentou diferenças alélicas entre os progenitores da população utilizada para a identificação dos QTL. A análise de microsítios revelou um alto grau de conservação na estrutura genômica, apresentando polimorfismos nas regiões codificantes e regulatórias, assim como no padrão de inserção de elementos de transposição. Baseado nessas diferenças, análises de expressão e funcionalidade putativa, dois genes foram escolhidos para a análise funcional utilizando a estratégia de RNA de interferência. Os resultados obtidos da avaliação fenotípica das plantas deficientes em *chaperona DnaJ* permitiram concluir que esta proteína, localizada nos cloroplastos, participa da regulação do metabolismo de açúcares, em particular na síntese de amido, controlando assim, a exportação de fotoassimilados. Já, a caracterização das linhagens silenciadas para o gene *sec14*, levou a postular que os conteúdos de tocoferol (VTE) nos frutos de tomate, não só dependem da regulação cinética das enzimas envolvidas na sua síntese, mas também da função da proteína do SEC14, não caracterizada em plantas até o momento. Essa proteína estaria envolvida no transporte de VTE entre os diferentes compartimentos do cloroplasto tendo impacto no equilíbrio oxidativo, na estrutura do plastídeo e, consequentemente, na biossíntese desta vitamina. Os resultados obtidos nesta tese reforçam a hipótese que o germoplasma selvagem constitui uma fonte de variabilidade a ser explorada para a identificação de determinantes genéticos que viabilizem novas estratégias de melhoramento de tomate por meio da manipulação do metabolismo central dos frutos.

ABSTRACT

This thesis addresses tomato fruit metabolism analysis by using three complementary approaches: *i)* the identification of candidate genes co-located with QTL previously described from metabolic profiles of *S. lycopersicum* (cv. M82) and *S. pennellii* introgressed lines, associated with industrial and nutritional quality traits; *ii)* the structural analyses of the genomic regions harboring the identified genes and ; *iii)* the functional analysis of the *chaperone DnaJ* and *sec14* genes through reverse genetics mediated by iRNA silencing. The analysis of the molecular markers previously mapped onto the QTL-associated regions allowed the identification of 127 candidate genes whose products were mapped in the corresponding metabolic pathways. A subset of these genes showed allelic differences between the parental genotypes used for QTL identification. Based on these differences, together with the expression profile analysis and their putative function, two genes were selected for functional analysis using RNA interference approach. The phenotypic profile of the *chaperone DnaJ* deficient plants allowed to conclude that this protein, located in chloroplasts, participates in sugar metabolism, in particular, starch synthesis, controlling assimilates partitioning. The characterization of *sec14*-silenced transgenic lines leads to propose that fruit tocopherol (VTE) contents not only depend on the kinetic regulation of the biosynthesis-involved enzymes, but also on the SEC14 action, not yet characterized in plants. This protein might be involved in VTE transport between the different plastidial compartments thus, affecting oxidative balance, chloroplast structure and, consequently, VTE biosynthesis. All together these results support the hypothesis that wild germoplasm represents a remarkable source of variability to be explore aiming the identification of genetic determinants to develop new breeding approaches for tomato through metabolic engineering.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	19
1. TOMATE	21
1.1. A FAMÍLIA SOLANACEAE E RECURSOS GENÉTICOS	21
1.2. ESPÉCIE MODELO	22
1.3. A CULTURA DO TOMATE E A IMPORTÂNCIA NA SAÚDE HUMANA	23
1.4. RECURSOS GENÉTICOS E MELHORAMENTO	25
1.5. ANTECEDENTES DO PROJETO	27
2. REFERÊNCIAS	29
HIPÓTESE E OBJETIVOS	33
CAPÍTULO I: BUSCA DE GENES CANDIDATOS ASSOCIADOS AOS QTL QUE AFETAM A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO FRUTO DE TOMATE.....	37
1. RESUMO	39
CAPÍTULO II: ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÔMICA ENTRE O TOMATE CULTIVADO, SOLANUM LYCOPERSICUM, E A ESPÉCIE SELVAGEM SOLANUM PENNELLII.	71
1. INTRODUÇÃO	73
2. OBJETIVOS.....	76
3. MATERIAIS E MÉTODOS	77
3.1. SEQUENCIAMENTO DO CLONE DE BAC.....	77
3.2. ANOTAÇÃO	77
3.3. ANÁLISES EVOLUTIVAS	78
4. RESULTADOS	80
4.1. ANOTAÇÃO E ANÁLISE DE MICROSSINTENIA.....	80
4.2. ANÁLISES EVOLUTIVAS	84
5. DISCUSSÃO	86
6. CONCLUSÕES.....	88
7. REFERÊNCIAS	89
CAPÍTULO III: CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO FUNCIONAL DO GENE CHAPERONA DNaJ.....	93
1. INTRODUÇÃO	95
2. OBJETIVOS.....	99
3. MATERIAIS E MÉTODOS	100
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	100
3.2. CEPAS BACTERIANAS E PLASMÍDEOS.....	100
3.3. OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DOS ALELOS DO GENE <i>CHAPERONA DNaJ</i> , ANÁLISE DA ESTRUTURA GÊNICA E FILOGENIA	101
3.4. OBTENÇÃO DAS CONSTRUÇÕES PARA O ESTUDO DA ATIVIDADE DAS REGIÕES PROMOTORAS DOS ALELOS DE <i>S. LYCOPERSICUM</i> E <i>S. PENNELLII</i>	102
3.5. OBTENÇÃO DA CONSTRUÇÃO PARA ESTUDO DA LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA PROTEÍNA CHAPERONA DNaJ	103
3.6. OBTENÇÃO DA CONSTRUÇÃO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SILENCIAMENTO GÊNICO POR RNA DE INTERFERÊNCIA	104
3.7. INFILTRAÇÃO E ENSAIO HISTOQUÍMICO DE FOLHAS DE <i>N. BENTHAMIANA</i> PARA O ESTUDO DA ATIVIDADE DAS REGIÕES PROMOTORAS DOS ALELOS DE <i>S. LYCOPERSICUM</i> E <i>S. PENNELLII</i>	105
3.8. INFILTRAÇÃO DE FOLHAS DE <i>N. BENTHAMIANA</i> PARA O ESTUDO DA LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA PROTEÍNA CHAPERONA DNaJ	105
3.9. OBTENÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE TOMATE	106

3.9.1. Transformação genética	106
3.9.2. Verificação da presença do transgene	106
3.9.3. Análise de expressão do gene <i>chaperona DnaJ</i> nas linhagens transgênicas obtidas.....	107
3.10. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS LINHAGENS TRANSGÊNICAS	107
3.10.1. Cultivo e parâmetros de produção.....	107
3.10.2. Verificação do nível de silenciamento nas linhagens transgênicas.....	108
3.10.3. Medição dos parâmetros fotossintéticos	108
3.10.4. Extração e quantificação de pigmentos	109
3.10.5. Extração e quantificação de aminoácidos, açúcares solúveis e amido	110
3.10.6. Análise estatística.....	112
4. RESULTADOS	113
4.1. A PROTEÍNA CHAPERONA DnaJ AGRUPA EM UM CLADO DIFERENTE DAS CHAPERONAS PREVIAMENTE DESCRITAS ...	113
4.2. OS PROMOTORES DOS ALELOS SELVAGEM E CULTIVADO APRESENTAM ATIVIDADE TRANSCRITORIAL DIFERENCIAL ...	115
4.3. A PROTEÍNA DnaJ É DIRECIONADA A CLOROPLASTO	116
4.4. OBTENÇÃO DAS PLANTAS SILENCIADAS PARA O GENE <i>CHAPERONA DnaJ</i>	116
4.5. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS LINHAGENS TRANSGÊNICAS	118
4.5.1. Verificação do nível de silenciamento nas linhagens transgênicas.....	118
4.5.2. O silenciamento do gene <i>chaperona DnaJ</i> não impacta os parâmetros fotossintéticos	119
4.5.3. O silenciamento do gene <i>chaperona DnaJ</i> altera os conteúdos de clorofilas e carotenóides em tecidos verdes	120
4.5.4. O silenciamento do gene <i>chaperona DnaJ</i> altera o conteúdo de açúcares e amido.....	121
4.5.5. O silenciamento do gene <i>chaperona DnaJ</i> não altera o conteúdo de aminoácidos totais	122
4.5.6. O silenciamento do gene <i>DnaJ</i> não altera os indicadores de produção das linhagens transgênicas	123
5. DISCUSSÃO	124
6. CONCLUSÕES.....	130
7. REFERÊNCIAS.....	131
CAPÍTULO IV : CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO FUNCIONAL DO GENE SEC14	135
1. INTRODUÇÃO	137
1.1. VITAMINA E, BIOSÍNTESE E FUNÇÃO	137
1.2. ANTECEDENTES DO PROJETO.....	139
2. OBJETIVOS.....	143
3. MATERIAIS E MÉTODOS	144
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	144
3.2. CEPAS BACTERIANAS E PLASMÍDEOS.....	144
3.3. OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DOS ALELOS DO GENE <i>SEC14</i> , ANÁLISE DA ESTRUTURA GÊNICA E FILOGENIA	145
3.4. OBTENÇÃO DA CONSTRUÇÃO PARA ESTUDO DA LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA PROTEÍNA SEC14	146
3.5. OBTENÇÃO DA CONSTRUÇÃO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SILENCIAMENTO GÊNICO POR RNA DE INTERFERÊNCIA	147
3.6. INFILTRAÇÃO DE FOLHAS DE <i>N. BENTHAMIANA</i> PARA ESTUDO DA LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA PROTEÍNA SEC14	148
3.7. OBTENÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE TOMATE	149
3.7.1. Transformação genética	149
3.7.2. Verificação da presença do transgene	149
3.7.3. Análise de expressão do gene <i>sec14</i> nas linhagens transgênicas obtidas	149
3.8. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS LINHAGENS TRANSGÊNICAS	150
3.8.1. Cultivo e parâmetros de produção	150
3.8.2. Verificação do nível de silenciamento nas linhagens transgênicas.....	151
3.8.3. Avaliação da expressão dos genes da rota central de biossíntese do tocoferol	151
3.8.4. Medição dos parâmetros fotossintéticos	151

3.8.5. Extração e quantificação de pigmentos.....	152
3.8.6. Extração e quantificação de aminoácidos, açúcares solúveis e amido	153
3.8.7. Extração e quantificação de tocoferóis.....	155
3.8.8. Análise estatística.....	155
4. RESULTADOS	157
4.1. A PROTEÍNA SEC14 POSSUI O DOMÍNIO CRAL/TRIO E UM PEPTÍDEO DE DIRECIONAMENTO A CLOROPLASTOS.....	157
4.2. A PROTEÍNA SEC14 É DIRECIONADA A CLOROPLASTO.....	158
4.3. OBTENÇÃO DAS PLANTAS SILENCIADAS PARA O GENE <i>SEC14</i>	159
4.4. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS LINHAGENS TRANSGÊNICAS	161
4.4.1. Verificação do nível de silenciamento nas linhagens transgênicas.....	161
4.4.2. O silenciamento do gene <i>sec14</i> altera o funcionamento da maquinaria fotossintética	162
4.4.3. O silenciamento do gene <i>sec14</i> não altera o conteúdo de pigmentos.....	164
4.4.4. O silenciamento do gene <i>sec14</i> altera parcialmente o conteúdo de açúcares e amido.....	164
4.4.5. O silenciamento do gene <i>sec14</i> não altera o conteúdo de aminoácidos totais.....	165
4.4.6. O silenciamento do gene <i>sec14</i> altera os conteúdos de tocoferóis em folha fonte e fruto maduro	166
4.4.7. A expressão dos genes que codificam para as enzimas da rota central de VTE não foi alterada	168
4.4.8. O silenciamento do gene <i>sec14</i> não altera os indicadores de produção das linhagens transgênicas	169
5. DISCUSSÃO	170
6. CONCLUSÕES.....	175
7. REFERÊNCIAS.....	176
CONSIDERAÇÕES GERAIS	181
ANEXO 1	185
ANEXO 2	203

Introdução geral

1. TOMATE

1.1. A família Solanaceae e recursos genéticos

O tomate cultivado (*Solanum lycopersicum* L.) pertence à família Solanaceae. A mesma compreende mais de 3.000 espécies adaptadas aos mais diversos ambientes em termos de temperatura, altitude e disponibilidade de água. Essa família se apresenta como a terceira em importância econômica e a mais cultivada para produção de hortaliças, tendo espécies de alta relevância como a batata, berinjela, tabaco e pimenta. Mais ainda, suas espécies se apresentam como plantas modelo para o estudo do desenvolvimento de tubérculos (Kolomiets *et al.*, 2001, Fernie *et al.*, 2001), da resposta de defesa em plantas (Martin *et al.*, 1993, Rossi *et al.*, 1998, Rathjen *et al.*, 1999, Bogdanove e Martin, 2000; Gebhardt *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001; Hui *et al.*, 2003; Pedley *et al.*, 2003; Chung *et al.*, 2011), do metabolismo de flavonóides e antocianinas (Olsen *et al.*, 2010; Yamagishi *et al.*, 2010) e do desenvolvimento de frutos carnosos (Alexander e Grierson, 2002; Tanksley, 2004; Giovanonni, 2004; Carrari *et al.*, 2006a, 2006b).

Solanaceae divergiu há 40 milhões de anos de um ancestral diplóide com $x=12$ cromossomos e, embora apresente ampla diversidade fenotípica, os estudos desenvolvidos até hoje indicam que a maioria das espécies mantém este número cromossômico, além de uma alta conservação da estrutura genômica. Desta forma, Solanaceae se consolida como um excelente modelo para estudar a diversidade subjacente à adaptação a ambientes diversos (Wikstrom *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2008; Wu e Tanksley, 2010).

As espécies de *Solanum* seção *Lycopersicon*, são nativas do oeste de América do Sul com uma distribuição ao longo dos Andes, desde a região central do Equador até o norte do Chile, incluindo as Ilhas Galápagos. Essa seção compreende treze espécies, algumas das quais estão apresentadas na Figura 1. Acredita-se que o tomate cultivado tenha sido domesticado a partir de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*, o qual apresenta uma maior distribuição desde o México até o sul do continente americano (Peralta e Spooner, 2007).

Figura 1. Fenótipo de folhas (A) e frutos (B) de espécies de tomate.

I: *S. chmielewskii*. II: *S. habrochaïtes*. III: *S. lycopersicum*. IV: *S. pimpinellifolium*. V: *S. neorickii*. VI: *S. pennellii*. Adaptado de Schauer *et al.* (2005).

1.2. Espécie modelo

O tomate possui genoma diplóide e relativamente pequeno (950 Mb), e representa um modelo de estudo alternativo a *Arabidopsis thaliana*, principalmente com relação aos processos de formação e amadurecimento de frutos carnosos e climatéricos (Giovannoni, 2004; Carrari *et al.*, 2006a, 2006b). Dessa forma, diversos recursos genéticos e genômicos têm sido desenvolvidos para esta espécie: *i*) genoma totalmente sequenciado em fase final de anotação e montagem; *ii*) bibliotecas genômicas; *iii*) coleções de sequências de cDNA; *iv*) mapas genéticos de alta densidade e *v*) coleções de populações de mapeamento e mutantes. Adicionalmente, diversas abordagens tecnológicas foram bem estabelecidas e continuam sendo aplicadas com sucesso em tomate, como por exemplo, a transformação genética estável e o silenciamento gênico induzido por vírus (Barone *et al.*, 2008; Quadrana *et al.*, 2011).

O fruto de tomate é composto pela epiderme, um grosso pericarpo e a placenta, que recobre as sementes. O desenvolvimento do fruto pode ser dividido em quatro estágios esquematizados na Figura 2: *i*) início da floração até a antese (duas a três semanas); *ii*) intensa divisão celular (duas a três semanas a partir da fertilização); *iii*) expansão celular (duas a três semanas após o final do estágio de divisão) e finalmente, *iv*) amadurecimento que, pela sua importância na cadeia produtiva, especialmente na pós-colheita, tem sido exaustivamente estudado tanto ao nível

genético como bioquímico (Alexander e Grierson, 2002; Alba *et al.*, 2005; Barry *et al.*, 2005; de Jong *et al.*, 2009; Bapat *et al.*, 2010). Este estágio final do desenvolvimento do fruto de tomate se inicia com a parada do crescimento, aumento da respiração e das concentrações de etileno, que por sua vez, desencadeiam uma complexa e rápida alteração no perfil metabólico (Figura 2). O amadurecimento está relacionado à modificação no acúmulo de carotenóides e clorofilas, concomitante à diferenciação de cloroplastos a cromoplastos (Bartley *et al.*, 1994; Bramley, 2002; Waters *et al.*, 2004), determinando assim a cor do fruto maduro. Por outro lado, a alteração no turgor celular e estrutura da parede modificam a textura. Neste sentido, a matriz péctica sofre uma série de alterações na composição e organização das pectinas, hemiceluloses e polissacarídeos celulósicos. Essas mudanças, que levam à perda da integridade do tecido, encontram-se mediadas pela ação de hidrolases específicas de parede (Rose *et al.*, 2004; Duan *et al.*, 2008; Meli *et al.*, 2010, Almeida e Huber, 2011). Por fim, ocorrem mudanças no metabolismo de açúcares, ácidos e compostos voláteis que afetam a qualidade nutricional, aroma e sabor do fruto (Tieman *et al.*, 2006; Carrari *et al.*, 2006b). Porém, mesmo que os processos mencionados anteriormente tenham sido amplamente estudados, só recentemente estão sendo realizados trabalhos que estudam a sua integração e impacto no conteúdo de metabólitos primários e secundários relacionados com a qualidade do fruto (Carrari *et al.*, 2006a, 2006b).

Um aspecto muito interessante que ainda abre questionamentos é o papel da fotossíntese do fruto durante os três primeiros estágios de desenvolvimento descritos anteriormente. Os poucos dados publicados a respeito indicam que os frutos verdes possuem cadeia de transporte de elétrons e ciclo de Calvin ativos, mas embora fixem carbono, a taxa respiratória é muito alta mascarando a fixação líquida. Assim o fruto apresentaria um metabolismo fotossintético, mas não autossuficiente, até o começo do amadurecimento e, então, sofreria uma transição ficando totalmente heterotrófico, dependente principalmente da respiração (Piechulla *et al.*, 1987; Carrara *et al.*, 2001).

1.3. A cultura do tomate e a importância na saúde humana

O tomateiro é cultivado nos cinco continentes, em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Sua produção anual alcança 152 milhões de toneladas (FAO Base de dados estatísticos, última atualização 2009; <http://faostat.fao.org>), sendo que a China e os Estados Unidos destacam-se como principais produtores. O Brasil ocupa a nona posição com uma produção de 4,3 milhões de toneladas por ano. 65% da

produção mundial de tomate se destina para consumo fresco, e o restante é processado industrialmente com os seguintes fins: 40% para produção de extratos, 30% para molhos e purês, 15% para pasta e 15% para ketchup (USDA 2009).

Devido a sua facilidade e versatilidade na utilização, o tomate é a hortaliça mais consumida no mundo, tanto em forma fresca como processada. Adicionalmente é conhecido como um alimento nutracêutico, já que, além das bem conhecidas características organolépticas do fruto, o tomate é também valorizado pelo seu alto teor nutricional e a presença de diversos compostos com características antioxidantes que têm sido associadas à prevenção de doenças crônicas (Beecher, 1998; Demmig-Adams e Adams, 2002; Giovannucci, 2005; Chang *et al.*, 2006; Periago e Garcia, 2009) (Tabela 1).

Figura 2. Esquema do desenvolvimento do fruto de tomate.
dpa: dias pós-antese. Adaptado de Tanksley (2004).

Tabela 1. Valor nutricional do tomate.

Nutriente	TOMATE CRU		TOMATE PROCESSADO		Aporte do tomate à dieta diária*
	Quantidade/100 g	% Valores Diários	Quantidade/100g	% Valores Diários	
Calorias	18 (kcal)	1%	102 (kcal)	5%	4.5%
Proteínas	0.9 g	2%	3.2 g	6%	5.6%
Carboidratos totais	3.9 g	1%	21.3g	7%	6.2
Vitaminas					
Vitamina A	833 IU	17%	1298 IU	26%	26%
Vitamina C	12.7 mg	21%	32 mg	53%	50%
Vitamina E (α-tocoferol)	0.5 mg	3%	4.2 mg	21%	19%

IU: Unidades Internacionais. Fonte: Nutritive value of foods USDA.2002.

*baseado no consumo de tomate cru e processado.

1.4. Recursos genéticos e melhoramento

Como em todas as espécies cultivadas, um dos objetivos mais importantes no melhoramento é aumentar o rendimento, além disso, busca-se a obtenção de variedades resistentes a fatores bióticos e abióticos limitantes dos cultivos. Porém, o melhoramento genético do tomate nos últimos anos ampliou sua atuação baseado nas demandas geradas pelo mercado de consumo. Para a indústria, busca-se aumentar o grau *Brix*, que representa o conteúdo de sólidos solúveis, especialmente açúcares e ácidos orgânicos. Para o mercado de consumo fresco, busca-se melhorar principalmente os metabólitos determinantes do aroma e sabor do fruto, assim como, da qualidade nutricional.

No entanto, para atingir estes desafios, os programas de melhoramento se deparam com a restrição da estreita base genética existente, devido à utilização histórica de espécies ou variedades filogeneticamente próximas. Atualmente só 2% da variabilidade observada no antigo gênero *Lycopersicon* se encontra na espécie cultivada *Solanum lycopersicum* (Fray e Grierson, 1993). Frente a esse panorama, fontes de germoplasma selvagens têm se apresentado muito úteis para a incorporação de novos caracteres no tomate. Neste sentido, existem vários exemplos da incorporação de genes de espécies selvagens no tomate cultivado que, por exemplo, conferem resistência a diferentes patógenos limitantes do cultivo (Seah *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 1993; Rathjen *et al.*, 1999).

Em 1995, Eshed e Zamir desenvolveram uma coleção de 76 linhagens introgrididas (ILs) nas quais segmentos definidos do genoma de *Solanum pennellii* (LA716) substituem regiões homólogas em um fundo genético de *S. lycopersicum* (cv. M82) (Figura 3A). Essas linhagens cobrem todo o genoma da espécie *S. lycopersicum* e os fragmentos estão bem delimitados por meio de marcadores moleculares (<http://www.sgn.cornell.edu/maps/pe.pl>), o qual permite que o genoma seja segmentado em 107 *bins* (Eshed e Zamir 1995; Pan *et al.*, 2000) (Figura 3B).

Essa coleção de linhagens tem sido amplamente caracterizada com o intuito de identificar diferenças para caracteres de interesse, sendo mapeados mais de 2.000 QTL (*Quantitative Trait Loci*) (Lippman *et al.*, 2007). Por exemplo, Rousseaux *et al.* (2005) estudaram metabólitos relacionados à qualidade nutricional e presença de antioxidantes no fruto das 76 ILs. Além desse estudo, Causse *et al.* (2002, 2004) mapearam 130 QTL para 38 caracteres relacionados à qualidade organoléptica e 81 QTL associados ao tamanho, conteúdo de ácidos orgânicos e açúcares de fruto. Devido

à sua estrutura genômica, as ILs se apresentam como uma ferramenta muito interessante para desvendar os determinantes genéticos por trás dos caracteres quantitativos, já que todas as diferenças fenotípicas entre as linhagens e *S. lycopersicum* (cv. M82) estão determinadas apenas pelo fragmento de *S. pennellii* introgridido. Isto foi claramente demonstrado pelo estudo realizado por Fridman *et al.* (2000, 2004), no qual foi identificado que a IL 9-2-5 apresentava um incremento de 25% no *Brix*. Após o mapeamento genético e físico de alta resolução, um fragmento da região introgridida de *S. pennellii* foi sequenciada. Nela foi identificado um gene que codifica para uma invertase de parede celular, *lin5*. A comparação dos alelos selvagem e cultivado permitiu concluir que o QTL estava determinado pela mudança de um único nucleotídeo no terceiro éxon do gene, sendo que essa mudança modificava as propriedades cinéticas da enzima. Essa invertase é chave no carregamento de sacarose no floema, sendo esse o maior fator envolvido no incremento do conteúdo de açúcar no fruto (Baxter *et al.*, 2005).

Figura 3. Representação esquemática da população das ILs de *S. pennellii* em fundo genético *S. lycopersicum*, desenvolvidas por Eshed e Zamir (1995).

(A) esquema geral das ILs. As linhas pretas representam o fragmento de *S. pennellii* contido em cada linhagem. Junto aos fragmentos se indica o nome da linhagem. Fonte: Lippman *et al.* (2007). (B) ILs que abrangem o cromossomo 1. As letras indicam os bins, nos quais é possível dividir o cromossomo 1 de acordo à sobreposição dos diferentes fragmentos introgrididos.

Historicamente, a caracterização de QTL, como o exemplo descrito acima, era realizada por meio de longos processos de mapeamento genético, seguidos de

mapeamentos físicos para finalmente chegar à clonagem posicional. Com o aumento da quantidade de informação sobre sequências genômicas e expressas, assim como a disponibilidade de mapas de alta densidade, surgiu a estratégia de “genes candidatos” como uma alternativa à clonagem posicional. Essa abordagem consiste na identificação de genes que cossegregam com os caracteres de interesse e que, pela função dos seus produtos, podem contribuir ou determinar as variações observadas. A candidatura de um gene pode ser reforçada de diferentes maneiras, entre elas: *i)* se o gene é expresso nas mesmas condições temporais e espaciais que o QTL; *ii)* se os alelos presentes nos genitores da população de mapeamento apresentam padrões de expressão diferenciais ou; *iii)* se os alelos genitores apresentam polimorfismos não silenciosos. Finalmente, o envolvimento do gene candidato no carácter de interesse deve ser testado por meio de análises funcionais utilizando diversas ferramentas de genética reversa, muitas delas baseadas em mutagênese ou no silenciamento gênico específico por meio de tecnologias baseadas em RNAi (RNA de interferência) (Rothan e Causse, 2007).

1.5. Antecedentes do projeto

Recentemente, nas 76 linhagens introgridas desenvolvidas por Eshed e Zamir (1995), Schauer *et al.* (2006) identificaram e quantificaram 74 metabólitos, entre eles, aminoácidos, ácidos orgânicos e graxos, açúcares e vitaminas E e C, assim como diversos caracteres morfológicos associados ao rendimento da planta, como peso e altura de planta, largura e peso de fruto, grau *Brix* e índice de colheita. Esse trabalho resultou na descrição de 889 QML (*Quantitative Metabolic Loci*) e 326 YAL (*Yield Associated Loci*). Tendo como base esse estudo e em colaboração com a equipe do Dr. Alisdair Fernie do Max-Planck-Institut (Gölm, Alemanha) e do Dr. Fernando Carrari do INTA (Castelar, Argentina), nosso grupo trabalha para identificar e caracterizar os determinantes genéticos responsáveis por essas mudanças.

Assim, partindo dos 1.215 QTL identificados por Schauer *et al.* (2006) na população de ILs de *S. pennellii* foram selecionados 106 QML e 20 YAL segundo os seguintes critérios: *i)* no mínimo uma variação significativa de 100% no conteúdo do metabólito quando comparado com o genitor *S. lycopersicum* e *ii)* uma posição cromossômica claramente definida dentro do contexto dos *bins*. Os QTL selecionados encontram-se localizados em 16 *bins* (1J, 2F, 4E, 4I, 5D, 5E, 5F, 7B, 7F, 7H, 9B, 9D,

9E, 9J, 10B, 11C) distribuídos ao longo de 8 dos 12 cromossomos do tomate e compreendem 52 metabólitos diferentes e 9 caracteres associados ao rendimento.

Para identificar as possíveis diferenças entre *S. lycopersicum* e *S. pennellii* determinantes das mudanças observadas, foram utilizadas inicialmente duas abordagens: a de genes candidatos (para os *bins* 1J, 2F, 4E, 4I, 5D/5E/5F, 7B, 7F, 7H, 9B/9D/9E, 9J, 10B, 11C) com o intuito de identificar diferenças em produtos gênicos (ex. mudanças de aminoácidos) e o mapeamento físico (para os *bins* 4I, 7H, 11C) para avaliar a colinearidade e identificar diferenças em promotores, padrão de inserção de elementos de transposição ou possíveis rearranjos.

Neste contexto, a presente tese aborda a caracterização de genes candidatos nas regiões genômicas selecionadas, assim como uma análise da diversidade genômica entre as duas espécies para a região do *bin* 4I. Adicionalmente, foram realizados estudos funcionais para dois genes candidatos. A *chaperona DnaJ* localizada no *bin* 4I, associada a mudanças no conteúdo de açúcares a qual demonstrou alterar a relação fonte – dreno, modificando a distribuição de fotossintetizados na planta. Finalmente, o gene *sec14* que co-localiza com um QTL para vitamina E (VTE), demonstrou participar do controle da biossíntese e acúmulo de tocoferol em tomate.

2. REFERÊNCIAS

- Alba R, Payton P, Fei Z, McQuinn R, Debbie P, Martin GB, Tanksley SD, Giovannoni JJ. 2005. Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *Plant Cell* 17, 2954-65.
- Alexander L, Grierson D. 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany* 53, 2039-2055.
- Almeida DPF, Hube DJ. 2011. Autolysis of cell walls from polygalacturonase-antisense tomato fruit in simulated apoplastic solutions. *Plant Physiology and Biochemistry* 49, 617-622.
- Bapat VA, Trivedi PK, Ghosh A, Sane VA, Ganapathi TR, Nath P. 2010. Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnology Advances* 28, 94-107.
- Barone A, Chiusano ML, Ercolano MR, Giuliano G, Grandillo S, Frusciante L. 2008. Structural and functional genomics of tomato. *International Journal of Plant Genomics* 2008, 820274.
- Barry CS, McQuinn RP, Thompson AJ, Seymour GB, Grierson D, Giovannoni JJ. 2005. Ethylene insensitivity conferred by the Green-ripe and Never-ripe 2 ripening mutants of tomato. *Plant Physiology* 138, 267-75.
- Bartley GE, Scolnik PA. 1994. Molecular biology of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45, 287-301.
- Baxter C, Carrari F, Bauke A, Overy S, Hill S, Quick P, Fernie A, Sweetlove L. 2005. Fruit Carbohydrate Metabolism in an Introgression Line of Tomato with Increased Fruit Soluble Solids. *Plant Cell Physiology* 46, 425-437.
- Bramley PM. 2002. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *Journal of Experimental Botany* 377, 2107-13.
- Beecher GR. 1998. Nutrient content of tomatoes and tomato products. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 218, 98-100.
- Bogdanove AJ, Martin GB. 2000. AvrPto-dependent Pto interacting proteins and AvrPto-interacting proteins in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 8836-8840.
- Carrara S, Pardossi A, Soldatini GF, Tognoni F, Guidi L. 2001. Photosynthetic Activity of Ripening Tomato Fruit. *Photosynthetica* 39, 75-78.
- Carrari F, Fernie AR. 2006a. Metabolic regulation underlying tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany* 57, 1883-97.
- Carrari F, Baxter C, Usadel B, Urbanczyk-Wochniak E, Zanol MI, Nunes-Nesi A, Nikiforova V, Centero D, Ratzka A, Pauly M, Sweetlove LJ, Fernie AR. 2006b. Integrated analysis of metabolite and transcript levels reveals the metabolic shifts that underlie tomato fruit development and highlight regulatory aspects of metabolic network behavior. *Plant Physiology* 142, 1380-96.
- Causse M, Saliba-Colombani V, Lecomte L, Duffe P, Rousselle P, Buret M. 2002. QTL analysis of fruit quality in fresh market tomato: a few chromosome regions control the variation of sensory and instrumental traits. *Journal of Experimental Botany* 53, 2089-2098.
- Causse M, Duffe P, Gómez M, Buret M, Damidaux R, Zamir D, Gur A, Chevalier C, Lemaire-Chamley M, Rothan C. 2004. A genetic map of candidate genes and QTLs involved in tomato fruit size and composition. *Journal of Experimental Botany* 55, 1671-1685.
- Chang CH, Lin HY, Chang CY, Liu YC. 2006. Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *Journal of Food Engineering* 77, 478-485.

- Chung SH, Felton GW. 2011. Specificity of induced resistance in tomato against specialist lepidopteran and coleopteran species. *Journal of Chemical Ecology* 37, 378-86.
- de Jong M, Mariani C, Vriezen WH. 2009. The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. *Journal of Experimental Botany* 60, 1523-32.
- Demmig-Adams B, Adams WWR. 2002. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science* 298, 2149-2153.
- Duan X, Chenga G, Yanga E, Yia C, Ruenroengklin N, Lub W, Luoc Y, Jiang Y. 2008. Modification of pectin polysaccharides during ripening of postharvest banana fruit. *Food Chemistry* 111, 144-149.
- Eshed Y, Zamir D. 1995. An Introgression Line Population of *Lycopersicon pennelli* in the Cultivated Tomato Enables the Identification and Fine Mapping of Yield-Associated QTL. *Genetics* 141, 1147-1162.
- Fernie AR e Willmitzer L. 2001. Molecular and Biochemical Triggers of Potato. Tuber Development. *Plant Physiology* 127, 1459-1465.
- Fray RG, Grierson D. 1993. Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and co-suppression. *Plant Molecular Biology* 22, 589-602.
- Fridman E, Pleban T, Zamir D. 2000. A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *PNAS* 97, 4718-4723.
- Fridman E, Carrari F, Liu Y, Fernie A, Zamir D. 2004. Zooming In on a quantitative Trait for Tomato Yield Using Interspecific Introgressions. *Science* 305, 1786-9.
- Gebhardt C, Valkonen JP. 2001. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annual Review Phytopathology* 39, 79-102.
- Giovannoni JJ. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* 16, 170-18.
- Giovannucci E. 2005. Tomato products, lycopene, and prostate cancer: A review of the epidemiological literature. *Journal of Nutrition* 135, 2030S-2031S.
- Hui D, Iqbal J, Lehmann K, Gase K, Saluz HP, Baldwin IT. 2003. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*: V. microarray analysis and further characterization of large-scale changes in herbivore-induced RNAs. *Plant Physiology* 131, 1877-1893.
- Kolomiets MV, Hannapel DJ, Chen H, Tymeson M, Gladon RJ. 2001. Lipxygenase Is Involved in the Control of Potato Tuber Development. *Plant Cell* 13, 613-626.
- Li L, Li C, Howe GA. 2001. Genetic analysis of wound signaling in tomato. Evidence for a dual role of jasmonic acid in defense and female fertility. *Plant Physiology* 127, 1414-1417.
- Lippman ZB, Semel Y, Zamir D. 2007. An integrated view of quantitative trait variation using tomato interspecific introgression lines. *Current Opinion in Genetics e Development* 17, 545-552.
- Martin GB, Brommonschenkel SH, Chunwongse J, Frary A, Ganai MW, Spivey R, Wu T, Earle ED, Tanksley SD. 1993. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262, 1432-1436.
- Meli VS, Ghosh S, Prabha TN, Chakraborty N, Chakraborty S, Datta A. 2010. Enhancement of fruit shelf life by suppressing N-glycan processing enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 2413-8.
- Olsen KM, Hehn A, Jugdé H, Slimestad R, Larbat R, Bourgaud F, Lillo C. 2010. Identification and characterisation of CYP75A31, a new flavonoid 3'5'-hydroxylase, isolated from *Solanum lycopersicum*. *BMC plant biology* 3, 10-21.

- Pan Q, Liu Y-S, Budai-Hadrian O, Sela M, Carmel-Goren L, Zamir D, Fluhr R. 2000. Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: Tomato and *Arabidopsis*. *Genetics* 155, 309-322.
- Peralta IE e Spooner DM. 2007. History, origin and early cultivation of tomato (Solanaceae). Em Genetic improvement of Solanaceae crops. Razdan MK e Mattoo AK. Science publishers Enfield, New Hampshire, EUA.
- Periago MJ e Garcia-Alonso J. 2009. Bioactive compounds, folates and antioxidant properties of tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) during vine ripening, *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 60, 694-708.
- Pedley KF, Martin GB. 2003. Molecular basis of Pto-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. *Annual Review Phytopathology* 41, 215-243.
- Piechulla B, Glick R, Bahl H, Gruissem W. 1987. Changes in Photosynthetic Capacity and Photosynthetic Protein Pattern during Tomato Fruit Ripening. *Plant Physiology* 84, 911-917.
- Quadrana L, Rodriguez C, López M, Bermudez L, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Descalzo A, Asis R, Rossi M, Asurmendi S, Carrari F. 2011. Coupling virus induced gene silencing to the exogenous green fluorescence protein expression provides an efficient system for functional genomics which exhibits negligible effects on plant metabolism. *Plant Physiology*, 111-177345.
- Rathjen JP, Chang JH, Staskawicz BJ, Michelmore RW. 1999. Constitutively active *Pto* induces a *Prf*-dependent hypersensitive response in the absence of *AvrPto*. *The EMBO journal* 18, 3232-3240.
- Rose JKC, Saladie M, Catala C. 2004. The plot thickens: new perspectives of primary cell wall modification. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 296-301.
- Rothan C, Causse M. 2007. Natural and artificially induced genetic variability in crop and model plant species for plant systems biology. *Experientia Supplementum* 97, 21-53.
- Rousseaux M, Jones C, Adams D, Chetelat R, Bennett A, Powell A. 2005. QTL analysis of fruit antioxidants in tomato using *Lycopersicon pennelli* introgression lines. *Theoretical and Applied Genetics* 111, 5740-5752.
- Rossi M, Goggin FL, Milligan SB, Kaloshian I, Ullman DE, Williamson VM. 1998. The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 9750-4.
- Schauer N, Semel Y, Roessner U, Gur A, Balbo I, Carrari F, Pleban T, Perez-Melis A, Bruedigam C, Kopka J, Willmitzer L, Zamir D, Fernie A. 2006. Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nature Biotechnology* 24, 447-454.
- Seah S, Yaghoobi J, Rossi M, Gleason CA, Williamson VM. 2004. The nematode-resistance gene, *Mi-1*, is associated with an inverted chromosomal segment in susceptible compared to resistant tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 108, 1635-1642.
- Tanksley SD. 2004. The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *Plant Cell* 16, 181-189.
- Tieman DM, Zeigler M, Schmelz EA, Taylor MG, Bliss P, Kirst M, Klee HJ. 2006. Identification of loci affecting flavour volatile emissions in tomato fruits. *Journal of Experimental Botany* 57, 887-896.
- Wang Y, Diehl A, Wu F, Vrebalov J, Giovannoni J, Siepel A, Tanksley SD. 2008. Sequencing and comparative analysis of a conserved syntenic segment in the Solanaceae. *Genetics* 180, 391-408.

- Wu F, Tanksley SD. 2010. Chromosomal evolution in the plant family Solanaceae. *BMC genomics* 17, 11-182.
- Waters MT, Fray RG, Pyke KA. 2004. Stromule formation is dependent upon plastid size, plastid differentiation status and the density of plastids within the cell. *Plant Journal* 39, 655-667.
- Wikström N, Savolainen V, Chase MW. 2001. Evolution of the angiosperms: calibrating the family tree. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences* 268, 2211-20.
- Yamagishi M, Shimoyamada Y, Nakatsuka T, Masuda K. 2010. Two R2R3-MYB genes, homologs of *Petunia* AN2, regulate anthocyanin biosyntheses in flower Tepals, tepal spots and leaves of asiatic hybrid lily. *Plant Cell Physiology* 51, 463-74.

Hipótese e objetivos

Tendo como ponto de partida os QTL descritos por Schauer et al. (2006) a partir do perfil metabólico da população de ILs (Eshed e Zamir, 1995), o objetivo geral desta tese foi aprofundar o conhecimento sobre os determinantes genéticos dos caracteres envolvidos na qualidade industrial e nutricional de frutos. As abordagens experimentais propostas se sustentam pela hipótese das variantes alélicas introduzidas pelo genitor selvagem da população (*Solanum pennellii*) e, as interações destas com o fundo genético do genitor recorrente (*Solanum lycopersicum*) ser os principais fatores causadores das variações fenotípicas observadas.

Para atingir este objetivo foram, inicialmente, propostas duas diferentes abordagens:

- i) Busca de genes candidatos associados aos QTL selecionados (Capítulo I).
- ii) Análise da diversidade genômica entre o tomate cultivado, *S. lycopersicum*, e a espécie selvagem, *S. pennellii* (Capítulo II).

A partir dos resultados obtidos foram propostos os dois seguintes objetivos:

- iii) Caracterização e estudo funcional do gene *chaperona DnaJ* (Capítulo III).
- iv) Caracterização e estudo funcional do gene *sec14* (Capítulo IV).

*Capítulo I: Busca de genes
candidatos associados aos QTL que
afetam a composição química do
fruto de tomate*

1. RESUMO

Em tomateiro diversos estudos têm demonstrado que as espécies selvagens apresentam uma abundante fonte de variabilidade genética para diversos fatores, como genes de resistência a patógenos e caracteres relacionados à qualidade industrial e nutricional, entre outros. A partir de uma coleção de linhagens introgridas de *S. pennellii*, em um fundo genético de *S. lycopersicum*, foram identificados previamente 889 QML e 326 YAL, distribuídos ao longo do genoma do tomate (Schauer *et al.*, 2006).

O objetivo geral deste capítulo foi identificar e caracterizar genes candidatos que co-localizam com um subgrupo de QTL descritos por Schauer *et al.* (2006), que compreendem 106 QML e 20 YAL associados a importantes características nutricionais e agrônômicas localizados em 16 regiões do genoma do tomate.

Para atingir este objetivo, foram desenvolvidas as seguintes atividades:

- a) Levantamento dos marcadores moleculares localizados nas 16 regiões genômicas sob estudo.
- b) Análise das sequências dos marcadores para identificação e anotação dos genes a partir da sua comparação com sequências genômicas e expressas disponíveis em banco de dados públicos.
- c) Seleção dos genes candidatos a partir da reconstrução das vias metabólicas nas quais os produtos protéicos dos genes identificados atuam.
- d) Amplificação e clonagem dos alelos de *S. lycopersicum* e *S. pennellii* de 127 genes candidatos.
- e) Sequenciamento e identificação de diferenças alélicas.
- f) Análise das correlações entre as variações na expressão dos genes e as mudanças nos níveis de metabólitos durante o desenvolvimento e amadurecimento dos frutos de *S. lycopersicum*

Desta maneira foi possível identificar 127 genes candidatos, dos quais 85 foram clonados e sequenciados parcialmente, sendo geradas 45.816 e 45.787 bases para *S. lycopersicum* e *S. pennellii*, respectivamente.

A comparação dos alelos revelou que 37 destes genes apresentaram variação nas sequências protéicas entre ambas as espécies. Adicionalmente, para 56 deles foi observada a correlação do perfil transcricional com a variação metabólica. Os resultados obtidos representam o passo inicial para a compreensão dos mecanismos

que determinam a composição metabólica no fruto de tomate e foram publicados na íntegra no periódico *Journal of Experimental Botany* em 2008 que se anexa a seguir.

A partir deste ponto, os capítulos seguintes propuseram: *i)* análise da diversidade genômica entre o tomate cultivado, *S. lycopersicum*, e a espécie selvagem *S. pennellii*; *ii)* o estudo funcional do gene *chaperona DnaJ*, localizada no cromossomo 4 e associada a mudanças no conteúdo de açúcares solúveis, e; *iii)* o estudo funcional do gene *sec14* identificado no cromossomo 9 que co-localiza com um QTL para o conteúdo de vitamina E.

RESEARCH PAPER

A candidate gene survey of quantitative trait loci affecting chemical composition in tomato fruit

L. Bermúdez^{1,*}, U. Urias^{1,2,*}, D. Milstein¹, L. Kamenetzky², R. Asis³, A. R. Fernie⁴, M. A. Van Sluys¹, F. Carrari^{2,†} and M. Rossi^{1,†}

¹ GaTE Lab, Departamento de Botânica-IB-USP, Brasil. Rua do Matão, 277, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil

² Instituto de Biotecnología, Instituto Nacional de Tecnología Agrícola (IB-INTA), PO Box 25, B1712WAA Castelar, Argentina (partner group of the Max Planck Institute for Molecular Plant Physiology, Potsdam-Golm, Germany)

³ Facultad de Ciencias Químicas Universidad Nacional de Córdoba, CC 5000, Haya de la Torre y Medina Allende, Córdoba, Argentina

⁴ Max Planck Institute for Molecular Plant Physiology, Wissenschaftspark Golm, Am Mühlenberg 1, Potsdam-Golm, D-14 476, Germany

Received 18 February 2008; Revised 3 April 2008; Accepted 29 April 2008

Abstract

In tomato, numerous wild-related species have been demonstrated to be untapped sources of valuable genetic variability, including pathogen-resistance genes, nutritional, and industrial quality traits. From a collection of *S. pennellii* introgressed lines, 889 fruit metabolic loci (QML) and 326 yield-associated loci (YAL), distributed across the tomato genome, had been identified previously. By using a combination of molecular marker sequence analysis, PCR amplification and sequencing, analysis of allelic variation, and evaluation of co-response between gene expression and metabolite composition traits, the present report, provides a comprehensive list of candidate genes co-localizing with a subset of 106 QML and 20 YAL associated either with important agronomic or nutritional characteristics. This combined strategy allowed the identification and analysis of 127 candidate genes located in 16 regions of the tomato genome. Eighty-five genes were cloned and partially sequenced, totalling 45 816 and 45 787 bases from *S. lycopersicum* and *S. pennellii*, respectively. Allelic variation at the amino acid level was confirmed for 37 of these candidates. Furthermore, out of the 127 gene-metabolite co-locations, some 56 were recovered following correlation of parallel transcript and metabolite profiling. Results obtained here represent the initial steps in the

integration of genetic, genomic, and expressional patterns of genes co-localizing with chemical compositional traits of the tomato fruit.

Key words: Candidate genes, introgressed lines, metabolite content, quantitative trait loci, *Solanum lycopersicum*, *Solanum pennellii*, tomato.

Introduction

Tomato (*Solanum lycopersicum* = *Lycopersicon esculentum*) is a horticultural crop of major economic importance, displaying several characteristics which have established it as a model system for dissection of genetic determinants of quantitative trait loci. In tomato, numerous wild-related species have been demonstrated to be untapped sources of valuable genetic variability, including pathogen-resistance genes, and nutritional and industrial quality traits (Fernie *et al.*, 2006). Despite the fact that the tomato genome sequence is not yet complete, there is an extensive amount of genetic data on this species comprising relatively comprehensive genetic maps, expressed sequence tag (EST) collections, as well as precious germoplasm collections and mapping populations (including recombinant inbred and introgression lines), from which many quantitative trait loci (QTL) have already been reported

* These authors contributed equally to this work.

† To whom correspondence should be addressed. E-mail: magda1708@yahoo.com. Correspondence may also be addressed to F. Carrari. Email: fcarrari@chnia.inta.gov.ar

(Van der Hoeven *et al.*, 2002; Mueller *et al.*, 2005a; Lippman *et al.*, 2007; Paran and Van der Knaap, 2007).

Historically in plant genetics, traits of interest have been genetically dissected through physical mapping followed by positional cloning (Salvi and Tuberosa, 2005). The advent of genomics and the increase of gene expression and mapping information that became available on its application have, however, recently facilitated the candidate gene approach. Following this approach the co-location of course map positions of genes with genomic regions conferring a trait of interest are regarded as 'candidates' that contribute, if not determine, changes in the trait (Tabor *et al.*, 2002). Given that relatively few tomato QTL have been cloned or accurately tagged (see, for example, Frary *et al.*, 2000; Fridman *et al.*, 2004; Galpaz *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007), and this is currently a laborious and slow process, requiring many generations of crossings and the screening of thousands of segregants, the candidate gene approach represents an attractive alternative as a way to start QTL characterization (Causse *et al.*, 2004; Price, 2006). When studying populations resulting from inter-specific crosses the first step of this process is to identify co-location of course map position with trait variation associated with genomic regions harbouring QTL of interest. However, several further steps can be taken to support the candidacy of the genes in question. It is important to determine whether the genes are expressed in a spatial-temporal pattern that is consistent to that under which the QTL is detected. In addition, it is now relatively easy to determine whether the parental alleles differ in sequence identity or their level of expression.

In a recent study, Schauer *et al.* (2006) identified 889 fruit metabolic loci (QML) and 326 yield-associated loci (YAL) distributed across the tomato genome. These QTL were identified using the *S. pennellii* introgression line (ILs) population (Eshed and Zamir, 1995), that had previously been utilized by several groups to identify a further 1000 QTL (Lippman *et al.*, 2007). However, despite producing an enormous amount of QTL data, the level of genetic resolution of these traits is currently somewhat limited since each IL harbours hundreds to thousands of genes, and, despite the availability of dense genetic maps for tomato, the number of metabolism-associated genes currently mapped is relatively low (in the region of 200–300). In a previous study by Causse *et al.* (2004), some 100 genes associated with primary metabolism were mapped and associations with fruit weight, and sugar and organic acid contents in fruits were examined. More recently, a map-based approach revealed few co-locations between candidate genes and QTL involved in the metabolism of ascorbic acid. Remarkable are the cases of the monodehydroascorbate reductase and the GDP-mannose epimerase genes that co-locate with two distinct QTL for ascorbic acid on chromosome 9 (Stevens *et al.*, 2007). However, these studies notwithstanding and the

analysis of all genes associated with metabolism currently mapped failed to yield candidate genes for the vast majority of QML identified by Schauer *et al.* (2006).

In the current study, the aim was to provide a more comprehensive list of candidate genes following a slightly different strategy. Rather than taking the top-down approach of pre-selecting genes of interest and mapping their positions by means of multi-parallel Southern hybridizations, it was decided to identify all candidates within specific genomic regions of interest. The focus was on a subset of 106 QML and 20 YAL reported by Schauer *et al.* (2006), specifically those associated either with important agronomic or nutritional characteristics. It was possible to identify a total of 88 metabolism-associated and 39 non-metabolism (transport, signalling, protein processing or degradation, and DNA/RNA-protein metabolism) -associated candidate genes for these QTL. To validate these further, two additional experiments were performed: (i) sequence analysis of allelic variation between *S. lycopersicum* and *S. pennellii*; and (ii) evaluation of the correlation between the expression of these genes and the trait of interest within a dataset obtained from the assessment of tomato fruit development (Carrari *et al.*, 2006). The combined results are discussed with respect both to the use of multiple association approaches and select sequencing for the cross-validation of candidate genes, and the ultimate utility of IL breeding in crop compositional improvement.

Materials and methods

QML selection and identification of candidate genes

All the molecular markers mapped onto the selected genomic regions (BINs: 1J, 2F, 4E, 4I, 5D/E/F, 7B, 7F, 7H, 9B/D/E, 9J, 10B, 11C), selected on the basis of the data presented in Schauer *et al.* (2006), were obtained from the Solanaceae Genomic Network (<http://www.sgn.cornell.edu/>). Marker sequences were compared by WU-BLAST algorithm (<http://blast.wustl.edu/>) to the NCBI protein database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The pipeline designed for selection and analysis of candidate genes is shown in Fig. 1. The functions of selected gene products within metabolic pathways were predicted by mapping them using the KEGG database (<http://www.genome.jp/kegg/>; Kanehisa *et al.*, 2008).

Plant material and DNA extraction

Seeds from 75 independent ILs, were kindly provided by CM Rick, Tomato Genetics Resource Center (TGRRC). This resource is composed of a tomato variety, *Solanum lycopersicum* (inbred variety M82, Acc LA3475), which includes single introgressed genomic regions from the wild green-fruited species *Solanum pennellii* (LA716). Amongst the ILs there is a complete coverage of the wild-species genome. The ILs have been produced through successive introgression backcrossing and marker-assisted selection to generate a set of recurrent parent lines with single introgressed segments (Eshed and Zamir, 1995). Plants were grown in a greenhouse and DNA extraction was performed from fresh leaf material following the method described by Hoisington *et al.* (1994).

Fig. 1. QML selection and candidate genes identification pipeline. Schematic representation of the process designed to identify candidate genes co-localizing with previously detected QML onto tomato genomic regions. (1) At least 2-fold variation in metabolite content relative to *S. lycopersicum* and precise genome localization by at least two overlapped introgressed regions. (2) Retrieval of all mapped markers onto the selected genomic regions from the comparison between the Tomato-EXPEN2000, the Tomato-EXPEN1992, and the Tomato IL map by using the comparative map web interface from SGN (Mueller *et al.*, 2008). (3) Sequence analysis by comparison with NCBI protein data base by using the Blastx algorithm. (4) Selection of complete *Solanum* cDNA sequences deposited onto SGN data repository or NCBI for primer design. PCR amplification and cloning from *S. lycopersicum* (M82 cultivar) and from the corresponding IL. End-sequencing of three independent clones from each genotype. (5) Sequence quality trimming and identity evaluation against the sequence used for primer design. (6) Identification of exons and introns by alignment with the corresponding sequence used for primer design. Allele comparison by identification of nucleotide and amino-acid polymorphisms. Output results from these analyses can be downloaded from URL: <http://gracilaria.ib.usp.br/services/tomato/index.html>.

Candidate gene amplification and cloning

Primers were designed with the Vector NTI 10.0 software package (Invitrogen) based on the unigene sequences available at the SGN (www.sgn.cornell.edu) or NCBI cDNA accessions (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Table S2 in Supplementary data available at JXB online).

Candidate genes were amplified by PCR using Elongase[®] DNA polymerase (Invitrogen). The PCR reactions were performed using 0.2 mM of each dNTPs, 0.2 mM of each primer, 1.5 mM of MgSO₄, 100 ng of genomic DNA, and 2 units of enzyme. The PCR programme was 94 °C for 3 min; 35 cycles of 94 °C for 30 s, primer-specific annealing temperature for 30 s, 68 °C for 4 min; and a final period of 68 °C for 10 min. Amplification products were purified with GFX purification Kit (Amersham Biosciences) and cloned using the pMOSBlue blunt-ended cloning kit (Amersham Biosciences), following the manufacturer's instructions. Clones were end sequenced using vector universal primers, and reactions were read either with an ABI3700 or ABI3100 (Applied Biosystems).

Sequence and co-expression analyses

Vector sequences were trimmed using the VecScreen (www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.htm) software at the NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/). After quality trimming, all accepted sequences reached a Phred value ≥ 20 (Gordon *et al.*, 1998). Intron/exon prediction was performed by comparing the *S. pennellii* or *S. lycopersicum* sequences obtained with the corresponding unigene or marker sequence from SGN (www.sgn.cornell.edu), or NCBI cDNA accessions (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using the Blast2 Sequences algorithm (Tatusova and Madden, 1999). Polymorphisms were detected at nucleotide and amino acid levels aligning *S. pennellii* and *S. lycopersicum* sequenced alleles (excluding primer regions) using the MULTALIN program (<http://www.archbac.u-psud.fr/genomics/multalin.html>; Corpet, 1988). The nucleotide diversity, which estimates the average number of substitutions between any two sequences, was determined using the software DNAsp version 4.10.9 (Rozas *et al.*, 2003). The rate of synonymous and non-synonymous substitutions was determined using Nei and Gojobori's method (Nei and Gojobori, 1986) with the Jukes-Cantor correction, calculated using the MEGA 2.1 software (Kumar *et al.*, 2001). Codon-based tests of selection (Fisher's exact test) were performed using the same software.

Developmental microarray expression data and metabolite data had been previously described in Carrari *et al.* (2006). In that study a combined analysis of metabolite and gene expression profiles from tomato fruits harvested through development and ripening stages (10, 15, 20, 21, 35, 49, 56, and 70 d after anthesis) was carried out. Although, the previous study reported extensive correlation analysis, this was performed in a targeted manner and did not include the candidate genes identified in the current study. For this reason, the expression data from 56 candidate genes, out of the 127 selected, which were spotted on the TOM1 microarray were correlated against the metabolite data of 66 metabolites determined in the ILs, using the Spearman algorithm (Urbanczyk-Wockniak *et al.*, 2003).

Results and discussion

QML selection and identification of candidate genes

As a starting point for this study, we relied on the recent identification of 889 fruit metabolic loci (QML) and 326 yield-associated loci (YAL) in the *S. pennellii* IL population (Schauer *et al.*, 2006). In order to select QML and identify candidate genes putatively responsible for those metabolite variations, a pipeline was established (Fig. 1). Out of those QML, 106 were selected based on the following criteria: they exhibited (i) at least 2-fold

variation in metabolite content relative to M82 variety of *S. lycopersicum* and (ii) a clear chromosomal position using the BIN mapping method. The selected QML were localized on 16 BINs (1J, 2F, 4E, 4I, 5D, 5E, 5F, 7B, 7F, 7H, 9B, 9D, 9E, 9J, 10B, 11C) across 8 of the 12 tomato chromosomes and comprised 52 different metabolites and nine different yield-associated traits. In addition, some QML for a range of traits were selected despite the fact that they did not fulfil the second criterion. Specifically, citrate, palmitate, stearate, fructose, GABA (γ -aminobutyric acid), glycine, tyrosine, and threonate QML (mapped onto chromosome 5), and phosphate and dehydroascorbate QML (mapped onto chromosome 9) could not be unambiguously defined to any of the BINs of these chromosomes. In these instances, candidate genes were grouped within BINs 5D/E/F and 9B/D/E for chromosomes 5 and 9, respectively (see Figs 3 and 4 and Table S1 in Supplementary data available at *JXB* online).

The selected regions carry a total of 430 mapped molecular markers present on the Tomato-EXPEN 2000 and Tomato-EXPEN 1992 maps (*S. lycopersicum* LA925 $\times$ *S. pennellii* LA716) (<http://www.sgn.cornell.edu/>) spanning 305 cM. Sequences of the 430 available molecular markers, as well as previously described genes and cDNAs (Ganal *et al.*, 1998; Causse *et al.*, 2004; Zou *et al.*, 2006), mapping onto the 16 selected genome regions were compared with the NCBI protein database. This survey resulted in a catalogue of 224 candidate genes (not shown) that presented sequence homology to pre-

viously characterized expressed sequences (reference proteins), whose functions have been experimentally demonstrated and could be involved in the observed metabolic changes. Out of these 224 putative genes, for 127 genes, it was possible to identify complete *Solanum* cDNA sequences (unigenes or markers from the Solanaceae Genome Network, or NCBI accessions) and to design primers that facilitated genomic-based PCR of a significant portion of the coding regions. Detailed information of these 127 candidates as well as the entire dataset of all 16 genomic regions studied is provided in Table S1 in Supplementary data available at *JXB* online. Identity between the *Solanum* cDNA sequences and the reference proteins varied between 32% and 100%.

The 127 candidate genes were positioned with respect to metabolic pathways (using the KEGG database) where their products are predicted to be involved, to visualize better their putative contributions to the described QML. Figures 2–5 provide an overview of the central metabolic pathways where each colour represents a selected genomic region, or BIN, with its corresponding QML and the candidate genes. For each gene, results of the amplification, cloning, and allele mining are also indicated. These genes were grouped, according to putative function, into six categories: carbon and nitrogen metabolism, transport, photosynthesis and oxidative phosphorylation, protein processing and degradation, DNA/RNA–protein metabolism, and signalling and regulation. The most abundant gene category was carbon and nitrogen metabolism (59%). This observation is

Fig. 2. Metabolic role of candidate genes in BINs 1J, 2F, and 4E. BINs are identified by colours. Candidate genes are identified by numbers and both metabolites and genes are highlighted in the corresponding BIN colour. The KEGG Accession Map Code and the results of the amplification, cloning, and allele mining are also indicated. NA, No amplification product; SA, spurious amplification product; R, sequence rearrangements; AC, alleles comparison (Table 1).

somehow predictable since regulatory factors control entire carbon and nitrogen metabolic networks. In the same way, transport effectors re-distribute products of those metabolic pathways. Within carbon and nitrogen metabolism, 23% corresponds to genes involved in amino acid metabolism and 24% to those implicated on central carbon metabolism. Only three candidates are genes related to nitrogen

metabolism and the rest, 49%, distributed along different secondary pathways.

Candidate gene cloning and allele mining

Even though the candidature of some of the 127 identified genes is questionable in terms of the control they exert on the selected QML, given that metabolic variation within

Table 1. Allele analysis of candidate genes from *S. lycopersicum* (*Lyc*) and *S. pennellii* (*Pen*)

Marker (unigene) ^a	Size (b) exon/intron ^b	Nucleotide polymorphism (exon) ^c	Nucleotide polymorphism (intron) ^d	Amino acid coverage ^e	Analysed fragment ^f	Amino acid polymorphism ^g
(1) T0646 (U316058)	Lyc: 356/– Pen: 356/–	4/313	–	118/123	5–122	T ₁₇ → I T ₂₉ → P K ₇₀ → R E ₅₃₁ → G V ₅₆₉ → I T ₃₂ → P
(3) T1006 (U317524)	Lyc: 626/– Pen: 734/–	5/605	–	208/584	376–583	E ₅₃₁ → G V ₅₆₉ → I T ₃₂ → P
(4) C2_At4g34190 (U216629)	Lyc: 136/172 Pen: 93/467	1/93	6/128	31/141	16–46	T ₃₂ → P
(5) CLET-1-A11 (U324336)	Lyc: 512/– Pen: 512/–	1/469	–	170/186	12–181	I ₂₄ → M
(6) T1782 (U319301)	Lyc: 714/47 Pen: 585/68	9/585	2/47	194/405	16–209	L ₉₂ → H S ₁₃₃ → N E ₁₅₁ → G Q ₁₅₇ → R A ₁₆₁ → E N ₁₈₅ → D
(7) C2_At4g34700 (U216646)	Lyc: 196/355 Pen: 264/315	1/196	20/320	58/119	1–58	–
(8) T1749 (U326864)	Lyc: 72/448 Pen: 72/278	0/49	0/278	24/180	3–26	–
(9) T1368 (U312881)	Lyc: 459/– Pen: 742/–	5/437	–	153/707	1–153	–
(11) T1306 (U319133)	Lyc: 749/– Pen: 614/–	3/609	–	202/448	36–237	F ₁₈₆ → L D ₂₀₄ → H P ₄₈₃ → S
(12) T0869 (AY508112 ^h)	Lyc: 335/300 Pen: 335/293	8/311	27/294	111/540	429–539	–
(13) T1768 (U321585)	Lyc: 291/234 Pen: 291/352	0/267	7/234	96/189	93–188	–
(14) T1698 (U315881)	Lyc: 560/173 Pen: 523/173	4/504	7/173	174/367	32–217	A ₅₀ → S V ₁₀₇ → I T ₁₁₈ → M
(15) C2_At2g34470 (U219076)	Lyc: 190/– Pen: 179/–	1/179	–	59/277	25–83	–
(16) T1516 (U317147)	Lyc: 149/581 Pen: 150/549	0/149	19/550	49/252	20–68	–
(17) cTOB-9-H18U315474	Lyc: 349/276 Pen: 441/137	0/349	0/137	116/469	36–151	–
(18) TC128325U326680	Lyc: 459/– Pen: 534/39	0/459	–	153/350	35–187	–
(19) T0891 (U320717)	Lyc: 290/35 Pen: 303/267	0/278	1/35	95/679	585–679	–
(22) T0635 (U313864)	Lyc: 618/– Pen: 746/–	4/532	–	177/722	31–207	–
(23) T1054 (U319327)	Lyc: 512/75 Pen: 409/109	1/409	0/75	135/222	41–175	H ₈₅ → Y
(25) T1317 (AK247081 ^h)	Lyc: 465/131 Pen: 465/131	5/445	2/131	149/478	1–149	H ₂₇ → Q F ₃₀ → Y K ₂₅₆ → ^h N ₂₈₈ → S
(27) C2_At1g35720 (U314161)	Lyc: 465/142 Pen: 505/248	5/465	143/248	154/316	148–301	C ₁₄ → Y V ₁₇ → L A ₂₀ → V I ₅₁ → V N ₅₃ → K A ₅₉ → P S ₈₅ → R V ₁₁₃ → L S ₂₄₉ → P
(28) T1719A (L1365 ^h)	Lyc: 567/152 Pen: 561/158	24/537	47/169	187/329	5–191	–
(31) T0883 (U313818)	Lyc: 540/70 Pen: 556/27	31/540	0/27	179/413	228–406	G ₂₅₁ → D V ₂₅₂ → I R ₂₅₇ → K S ₂₅₈ → T L ₂₆₃ → H A ₂₇₂ → T L ₂₉₂ → I T ₃₃₃ → S

Continued

Table 1. *Continued*

Marker (unigene) ^a	Size (b) exon/intron ^b	Nucleotide polymorphism (exon) ^c	Nucleotide polymorphism (intron) ^d	Amino acid coverage ^e	Analysed fragment ^f	Amino acid polymorphism ^g
						R ₃₄₆ →H I ₃₆₁ →V N ₃₈₂ →K Y ₃₈₃ →– K ₃₈₄ →R Y ₃₈₆ →F D ₃₈₈ →Y V ₃₈₉ →G A ₃₉₁ →T L ₃₉₂ →Q K ₁₁ →R
(33) T0739 (U321142)	Lyc: 140/393 Pen: 140/424	1/118	27/403	44/146	4–47	
(35) cLEW-8-J19 (U324703)	Lyc: 431/170 Pen: 431/140	4/412	13/151	121/285	165–285	V ₂₄₁ →I
(36) cLET-5-D13 (U312690)	Lyc: 427/– Pen: 379/–	3/379	–	124/170	35–158	–
(40) LED50 (LED50 ^h)	Lyc: 728/– Pen: 632/–	0/611	–	210/704	485–694	–
(41) T0778 (U317221)	Lyc: 411/209 Pen: 467/54	0/383	0/54	127/488	33–159	–
(42) T1174 (U321882)	Lyc: 536/18 Pen: 208/–	0/208	–	69/234	12–80	–
(43) T0328 (U315874)	Lyc: 118/6 Pen: 241/157	0/93	0/6	39/407	2–40	–
(44) T1601 (U333333)	Lyc: 473/25 Pen: 473/41	4/451	0/25	157/191	17–173	S ₅₀ →G T ₉₆ →A R ₁₀₈ →G V ₁₂₄ →D
(47) cTOS-7-03 (U314198)	Lyc: 175/446 Pen: 175/300	3/148	90/354	58/145	85–142	
(48) cLEX-13-G5 (U315595)	Lyc: 588/– Pen: 710/–	1/316	–	105/314	104–208	M ₁₉₄ →V
(50) T0837 (U312572)	Lyc: 404/134 Pen: 124/39	0/124	0/39	41/258	37–77	–
(53) C2_At3g17210 (U214933)	Lyc: 142/294 Pen: 142/410	6/122	18/302	47/106	2–48	E ₁₈ →K
(54) cLES-1-A11 (U312789)	Lyc: 459/350 Pen: 432/352	4/432	13/352	141/579	438–578	V ₅₀₃ →M
(55) T1355 (U323609)	Lyc: 300/239 Pen: 272/131	0/272	0/131	73/312	28–100	–
(56) C2_At4g30580 (U229764)	Lyc: 25/514 Pen: –/557	–	68/514	–/284	–	–
(57) cLER-17P11 (U313426)	Lyc: 390/383 Pen: 467/239	5/390	10/239	129/765	83–211	–
(59) C2_At4g03210 (DQ098654 ^h)	Lyc: 169/228 Pen: 102/316	1/102	4/162	34/266	24–57	–
(61) C2_At1g53670 (U216219)	Lyc: 169/231 Pen: 75/317	1/75	6/231	24/189	33–56	S ₃₄ →R
(62) T1624 (T1624 ^h)	Lyc: 285/136 Pen: 285/274	2/262	4/138	94/398	3–96	–
(63) C2_At3g14770 (U231080)	Lyc: 363/222 Pen: 240/209	9/217	5/209	37/235	199–235	–
(64) T1171 (U313128)	Lyc: 247/338 Pen: 247/345	1/226	13/338	82/345	5–86	–
(66) cLET-14-A10 (U313308)	Lyc: 148/419 Pen: 148/306	0/127	0/306	39/282	244–282	–
(68) T0966 (U313029)	Lyc: 249/437 Pen: 191/411	0/191	1/411	63/192	25–87	–
(69) T1255 (U315727)	Lyc: 427/– Pen: 726/–	1/415	–	138/327	60–201	–
(70) cLEX-13-I15 (U316193)	Lyc: 597/– Pen: 543/–	0/528	–	175/224	41–215	–
(71) C2_At1g50575 (U222777)	Lyc: 218/220 Pen: 241/473	1/218	8/220	62/202	115–176	–

Continued

Table 1. *Continued*

Marker (unigene) ^a	Size (b) exon/intron ^b	Nucleotide polymorphism (exon) ^c	Nucleotide polymorphism (intron) ^d	Amino acid coverage ^e	Analysed fragment ^f	Amino acid polymorphism ^g
(72) C2_At1g55870 (U228097)	Lyc: 481/– Pen: 312/–	23/291	–	104/355	255–354	H ₂₆₇ →Y R ₃₀₉ →G – ₃₁₅ →V – ₃₁₅ →C – ₃₁₅ →V – ₃₁₅ →E R ₃₂₀ →S N ₃₂₃ →D I ₃₃₀ →M –
(73) CT223 (U143214)	Lyc:100/326 Pen:153/340	1/100	44/311	32/138	20–51	–
(74) cLEB-3-N22 (U313176)	Lyc:415/45 Pen:415/160	3/394	0/45	138/482	2–140	T ₄₇ →A V ₆₄ →L
(75) cLEX-3-N24 (U3208109)	Lyc: 660/– Pen: 415/–	11/415	–	138/251	11–148	K ₂₀ →N C ₇₄ →F L ₈₃ →F V ₁₀₀ →L D ₁₁₅ →E N ₁₂₀ →Y –
(77) C2_At2g41680 (U221908)	Lyc: 248/362 Pen: 248/362	0/248	0/362	82/256	12–93	–
(78) C2_At2g32600 (U218453)	Lyc: 266/207 Pen: 332/371	3/245	15/214	87/252	155–241	T ₂₁₇ →I
(80) T1673 (U327399)	Lyc: 109/319 Pen: 82/60	0/82	25/84	27/173	27–53	–
(81) T0532 (U312379)	Lyc: 255/289 Pen: 254/287	1/232	14/290	82/444	353–434	–
(83) cLET-3-C15 (U315877)	Lyc: 299/182 Pen: 299/80	1/299	2/81	99/433	328–426	P ₄₁₆ →A
(84) C2_At2g37500 (U231168)	Lyc: 134/363 Pen: 134/454	0/112	1/361	44/234	217–233	–
(87) T1617 (U321884)	Lyc: 334/358 Pen: 348/340	6/328	14/345	110/388	273–382	V ₃₀₉ →I P ₃₆₆ →L S ₃₇₇ →L –
(89) T1212 (U316424)	Lyc: 282/295 Pen: 380/232	0/282	0/231	93/403	45–137	–
(90) cLET-2-D4 (U315727)	Lyc: 556/– Pen: 442/–	2/322	–	106/327	96–201	A ₁₀₁ →T
(91) cLET-7-N21 (U312661)	Lyc: 241/– Pen: 384/144	2/241	–	80/285	38–117	–
(92) T0443 (U315467)	Lyc:105/9 Pen: 229/339	1/105	0/9	34/421	76–109	–
(95) T1785 (U318473)	Lyc: 199/328 Pen: 180/303	29/179	186/328	59/137	49–107	D ₇₆ →E A ₈₀ →S K ₈₅ →S T ₈₆ →V Q ₉₅ →H S ₁₀₂ →T V ₁₀₅ →I V ₁₀₆ →I –
(96) cLEX-13-I3 (U324385)	Lyc: 318/246 Pen: 322/243	0/236	0/243	65/229	42–106	–
(97) cTOA-30-C21 (U327971)	Lyc: 22/425 Pen: 22/374	–	109/374	–	–	–
(100) T0556 (U314531)	Lyc: 269/496 Pen: 269/381	1/246	1/381	89/132	32–120	R ₅₁ →K
(101) cLET-7-D17 (U316001)	Lyc: 312/284 Pen: 312/351	0/291	1/284	102/198	89–191	–
(103) cLET-42-02 (U313367)	Lyc: 263/240 Pen: 182/239	1/160	17/240	59/200	142–200	–
(105) T1190 (U312385)	Lyc: 192/602 Pen: 190/463	0/97	21/448	32/583	271–302	–
(106) T1519 (U332457)	Lyc: 455/131 Pen: 505/–	5/230	–	76/219	50–125	G ₇₉ →V

Continued

Table 1. *Continued*

Marker (unigene) ^a	Size (b) exon/intron ^b	Nucleotide polymorphism (exon) ^c	Nucleotide polymorphism (intron) ^d	Amino acid coverage ^e	Analysed fragment ^f	Amino acid polymorphism ^g
(107) cTOF-18-B12 (BG128005 ^h)	Lyc: 262/439 Pen: 254/315	1/254	9/316	84/219	54–137	V ₇₇ → A
(110) cLES-2-K4 (U312319)	Lyc: 312/16 Pen: 258/–	0/258	–	85/760	77–161	–
(113) T1164 (U320574)	Lyc: 397/344 Pen: 223/344	1/222	13/344	73/340	237–309	Y ₂₈₄ → F
(114) T0308 (U316154)	Lyc: 230/138 Pen: 350/138	1/218	0/138	76/373	257–332	–
(115) cLEY-13-H6 (U315415)	Lyc: 585/150 Pen: 603/150	4/565	4/150	200/300	21–220	N ₁₆₄ → D
(117) C2_At5g16710 (U214041)	Lyc: 89/452 Pen: 89/263	1/68	20/267	28/268	241–268	E ₂₄₆ → D
(120) C2_At1g44446 (U220686)	Lyc: 29/560 Pen: 29/562	–	32/562	9/461	8–16	–
(122) cLEX-4-G10 (U346954)	Lyc: 681/– Pen: 658/–	11/634	–	219/233	14–233	A ₇₅ → V N ₈₂ → D P ₈₇ → Q Y ₁₁₉ → C
(123) cTOE-7-B4 (U315480)	Lyc: 171/488 Pen: 171/354	0/151	13/354	54/367	313–366	–
(124) C2_At2g14260 (U220663)	Lyc: 24/613 Pen: 24/634	–	0/613	7/380	1–7	–
(125) CT55 (U143394)	Lyc: 561/110 Pen: 303/–	1/303	–	101/386	36–136	H ₅₅ → Q
(126) cLED-7-H11 (U315661)	Lyc: 147/252 Pen: 147/381	1/126	42/269	48/511	455–502	–
(127) cLEC-68-J21 (BI421979 ^h)	Lyc: 182/185 Pen: 209/204	0/182	0/185	60/241	171–230	–

^a Marker and unigene according to the Sol Genomics Network (www.sgn.cornell.edu). Genes are numbered according to Figs 2–5 and Table S1 (in Supplementary data available at *JXB* online).

^b Total number of trimmed bases for each genotype, exon/intron.

^c Number of nucleotides along the exon showing polymorphisms between genotypes/total of exon bases compared (primer sequences were not considered, a dash means no exon fragment sequenced).

^d Number of nucleotides along the intron showing polymorphisms between genotypes/total of intron bases compared (a dash means no intron fragment compared).

^e Number of compared amino acids between alleles/total number of amino acids of the corresponding unigene translated protein.

^f Analysed amino acid interval of the corresponding translated unigene.

^g Polymorphic amino acids between amplified alleles. The numbers indicate the position of changes corresponding to the translated unigene. When there is no number it means that there is a frame shift between the predicted proteins for Lyc and Pen and the unigene protein. A dash means insertion or deletion.

^h When there was no unigene, or the unigene was uncompleted, the sequence used for the analysis was taken from the GenBank (NCBI accession number) or the marker sequence according to Sol Genomic Network (www.sgn.cornell.edu).

values lower than 1 for 51 out of the 56 polymorphic genes. For only the eight following genes, out of the 51, the ratio was statistically significant ($P < 0.05$): arginine decarboxylase (gene 9) on BIN 1J; cystathionine- γ -synthase (gene 12) on BIN 2F; Mg-protoporphyrin IX chelatase (gene 22) and peroxidase (gene 28) both located on BIN 4E; pyrophosphatase (Ppv) (gene 57) on BIN 7B; poly(A)-specific ribonuclease (gene 72) on BIN 7H; cytochrome *b*₅ (gene 95) on BINs 9B/D/E; and lectin protein kinase family protein (gene 122) on BIN 11C. Although caution should be taken in order not to over-interpret these results, it is tempting to speculate the occurrence of purifying selection against non-synonymous substitutions in these genes indicative of a functional requirement for their products.

The analysis of the sequence divergence between *S. pennellii* and *S. lycopersicum* alleles across different

candidate categories (Table 2) showed that the largest number of genes with polymorphisms resulting in changes at amino acid level were those belonging to signalling and regulation (seven out of nine), DNA/RNA–protein metabolism (three out of three), and transport (three out of five) categories. By contrast, those related to central carbon metabolism (3 out of 14), protein processing and degradation (one out of four), and photosynthesis and oxidative phosphorylation (3 out of 10) displayed only a few genes with amino acid changes. The rest of the categories presented intermediate numbers of polymorphism at the level of a protein amino acid sequence. Whilst it is important to point out that amino acid position, which is an important component, was not considered here. The observed trends are largely in accordance with results reported by Schauer *et al.* (2006). In this study, it had been noted that a large proportion

Table 2. Distribution of candidate genes between metabolic categories

n, Total number of genes in each category according to the 127 candidates identified.

p/np, Number of genes that presented amino acid polymorphisms on the analysed fragment sequence/number of genes that did not present amino acid polymorphisms on the fragment sequence analysed. In this case, the total is the 81 genes for which amino acid sequences were analysed.

BIN (total candidates)	Carbon and nitrogen metabolism					Transport	Photosynthesis and oxidative phosphorylation	Protein processing and degradation	DNA/RNA/ protein metabolism	Signalling and regulation	Total
	<i>n</i>					<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i>
	<i>p/np</i>					<i>p/np</i>	<i>p/np</i>	<i>p/np</i>	<i>p/np</i>	<i>p/np</i>	<i>p/np</i>
	Amino acids	Central carbon	Nitrogen	Others (secondary metabolism)	Total (%)						
1J (11)	3 1/1	–	1 1/–	3 2/1	7 (64) 4/2	–	2 (18) 1/1	–	–	2 (18) 1/–	11 6/3
2F (7)	2 1/1	1 –/1	–	4 1/3	7 (100) 2/5	–	–	–	–	–	7 2/5
4E(13)	2 1/–	–	–	5 ½	7 (54) 2/2	1 (8) 1/–	1 (8) 1/–	2 (15)	–	2 (15) 1/–	13 5/2
4I (9)	1 –/1	1	–	2	4 (44) –/1	–	1 (11) –/1	2 (22) 1/–	1 (11)	1 (11) 1/–	9 2/2
5D/5E/5F (14)	–	3 2/1	–	3 –/1	6 (43) 2/2	1 (7) –/1	1 (7) –/1	3 (21)	1 (7) 1/–	2 (14) 2/–	14 5/4
7B (3)	–	–	–	1	1 (33)	–	1 (33) –/1	–	–	1 (33) –/1	3 –/2
7F (10)	1 1/–	3 –/2	1 –/1	4 –/2	9 (90) 1/5	–	–	–	–	1 (10)	10 1/5
7H (7)	1 –/1	1 1/–	–	1 –/1	3 (43) 1/2	–	2 (29) –/2	1 (14) –/1	1 (14) 1/–	–	7 2/5
9B/9D/9E (26)	2 –/1	5 –/3	1	7 3/2	15 (58) 3/6	1 (4) 1/–	4 (15) 1/1	–	4 (15) 1/–	2 (8) 1/1	26 7/8
9J (7)	2 1/1	1 –/1	–	1 1/–	4 (57) 2/2	–	–	1 (14) –/1	–	2 (29)	7 2/3
10B (9)	1	2 –/2	–	4 1/1	7 (78) 1/3	1 (11)	–	1 (11)	–	–	9 1/3
11C (11)	2	1 –/1	–	2 1/–	5 (45) 1/1	2 (18) 1/1	1 (9)	1 (9) –/1	–	2 (18) 1/–	11 3/3
Total <i>n</i> <i>p/np</i>	17 5/6	18 3/11	3 1/1	37 10/13	75 19/31	6 3/2	12 3/7	12 1/3	7 3/–	15 7/2	127 81

of the fruit QML were strongly associated with variation in yield-associated traits (Table S1 in Supplementary data available at *JXB* online), in particular with the harvest index which is obviously closely related to assimilate partitioning. Thus, one could rationalize that allelic variations on genes of the first groups (signalling and regulation, DNA/RNA–protein metabolism, and transport) may well play a more major role affecting the final fruit metabolite content than those of the second group (central carbon metabolism, protein processing and degradation, photosynthesis, and oxidative phosphorylation). It should be borne in mind, however, that the failure in the present study to detect polymorphism between *S. pennellii* and *S. lycopersicum* alleles does not preclude the candidacy of the genes for two reasons: (i) since only partial sequences were analysed it cannot be excluded that the alleles were polymorphic in the non-sequenced regions of their reading

frames; and (ii) because regulatory sequences, upstream of the amplified coding region, could be responsible for differential expression levels or pattern of the alleles.

Co-response and integrative analyses

The evaluation of the co-response pattern of transcription in relation to the variations in metabolite contents of interest supports the candidacy of the selected genes and may provide hints about epistatic interactions of the candidates identified with QML localized in other BINs. Then, a correlation analysis was performed between the expression profile of the candidates and the metabolite variations along fruit development and ripening in *S. lycopersicum*. Expression data of 56 of the selected candidate genes that were present on the TOM1 microarray were correlated against the content variation of 66 metabolites quantified across a fruit development and

ripening time course (Carrari *et al.*, 2006). Out of the 3696 pairs analysed, 724 positive (blue) and 307 negative (red) significant correlations were observed (Fig. 6). This number of correlations is well above of that expected merely by chance (185 at $P < 0.05$).

In the following section, only those candidate genes, which it was possible to provide supporting evidence from metabolic mapping, sequence analysis, and their correlative behaviour from the developmental time series experiment, will be dealt with in detail.

The gene encoding cystathionine- γ -synthase (gene 12), localized on BIN 2F, correlated with the contents of many metabolites including several for which QML mapped to this BIN (correlating positively with malate, quinate, and inositol-P; and negatively with galacturonate and dehy-

droascobate). Allelic variation, at amino acid level, between *S. lycopersicum* and the corresponding *S. pennellii* introgressed line was also found (Table 1). This enzyme participates in the conversion of homo-Ser to Met (Fig. 2) and could be involved in the variation of S-Me-Cys found in this BIN. A role for this pathway during tomato fruit ripening has been assessed recently by Katz *et al.* (2006). The massive production of ethylene during ripening requires an increase in the *de novo* Met synthesis through up-regulation of this enzyme. In the present correlation analysis, mRNA levels of this gene correlate negatively with Cys, a precursor in the biosynthesis of S-Me-Cys (Fig. 6). In addition, a glutathione *S*-transferase encoding gene (gene 14) was found co-locating with variations in Glu and 5-OxoPro QML onto this BIN (Fig. 2). Together with the amino acid

Fig. 6. Correlations between candidate gene transcription profile and metabolite contents through *S. lycopersicum* fruit development. Correlation coefficients (two tailed) and significances ($P < 0.05$) were calculated by applying Spearman algorithm using SSPS software. Each dot indicates a given r -value, resulting from a Spearman correlation analysis, in a false colour scale. Blue and red represent significant positive and negative correlations, respectively; white indicates a lack of significant correlation. The genes are indicated with the same number order as in Figs 2–5. Dots demarcated by a bold border indicate those that exhibit significant correlations between a given gene and the metabolite corresponding to the QML to which it co-localizes.

changes found in the coding region of this gene (Table 2), results mentioned above make it a good candidate to test using functional approaches.

The most supported candidate gene mapped on BIN 4E is GAUT4 galacturonosyltransferase (gene 19, Fig. 2), which co-localized with galacturonate QML, since this enzyme participates in pectin biosynthesis from galacturonate (Sterling *et al.*, 2006). However, no polymorphisms at the amino acid level were detected on the protein fragment analysed.

The introgressed region delineated as BIN 4I harbours QML for elevated sugars, as well as elevations in the metabolites belonging to the pathway linking citrate to glutamate, and was, therefore, defined as a pathway QTL (Schauer and Fernie, 2006). Moreover, about 60% of all QML mapped onto this BIN have been defined as morphology-dependent QML as they could be associated with phenotypic traits by correlation analyses (Table S1 in Supplementary data available at *JXB* online). In fact, this pathway QTL showed significant association with plant weight, *Brix* levels, fruit width, and harvest index.

Genes mapped onto this BIN for which it would be possible to evaluate transcriptional behaviour (gene 32, pre-pro-cysteine proteinase; gene 33, chaperone protein DnaJ-related; gene 36, plastocyanin chloroplast precursor; gene 38, pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase α -subunit; and gene 39, pectinesterase) displayed a wide range of significant correlations with most of the co-localizing QML including sugars, phosphates, and amino acids. Their co-localization, together with the similar patterns of correlation they showed, might be indicative of a coordinated mechanism of regulation operating at this same position on the genome. Phenylalanine ammonia lyase (gene 40) is involved in a wide range of metabolic pathways (Fig. 3) including nitrogen releases of NH_4^+ for Gln and Glu biosynthesis. Thus, this enzyme, previously mapped by Causse *et al.* (2004) onto the same BIN, may be involved in the variations of these two amino acids observed in *S. pennellii* IL. However, no amino acid polymorphisms were detected in the gene fragment analysed here (Table 1) and further investigations are needed to evaluate the candidature of this gene. When looking for the genetic determinants for these pathway QTL there are two alternatives: either (i) is not controlled by variation at a single genetic locus or (ii), more likely, the gene responsible for the entire pathway variation encodes not an enzyme activity protein but a regulatory one. In this direction, a chaperone protein DnaJ-related (gene 33) mapped onto this BIN and classified within regulatory categories emerged as an interesting candidate. DnaJ-chaperone proteins constitute a wide family both in prokaryote and eukaryote organisms and participate in protein folding, assembly, disassembly, and translocation into organelles through a mechanism involving interaction with Hsp70 chaperones (Qiu *et al.*,

2006). It has been demonstrated recently that a mutation on a cauliflower locus encoding a member of this family (*Or* locus) leads to chromoplast differentiation and consequently a deposit of β -carotene in the affected tissues (Lu *et al.*, 2006). Moreover, transgenic potato plants over-expressing this allele in a tuber-specific manner result in the production of orange-yellow tubers associated with high levels of carotenoids (Lu *et al.*, 2006). The chaperone protein DnaJ-related described here also possesses the Cys-rich zinc finger domains characteristics of DnaJ chaperones (not shown) and an amino acid polymorphism in the coding region ($\text{K}_{11} \rightarrow \text{R}$). Additionally, the levels of β -carotene in the fruit correlated positively ($r=0.76$; $P<0.0001$) with the expression of this gene during the developmental time-series experiment. These results, when taken together, make this gene a good candidate to be tested functionally for its putative role in the control of fruit metabolism.

The other BINs exhibiting patterns of metabolite and whole-plant phenotypic variations similar to those described for 4I are 5D, E, and F (Fig. 3). For reasons explained above, these last three BINs are here considered as a single entity. Except for the case of the peroxidase (gene 49), the other five candidates mapped on BIN 5D/E/F for which a transcriptional pattern was analysed, correlate with three to seven QML localized onto these BINs. β -Ketoacyl reductase (gene 42) plays a key role in fatty acid biosynthesis and positively correlates with glycerol-P, rendering it indirectly linked to stearate and palmitate QML. Phosphoglucosyltransferase (gene 44) has long been considered a key enzyme in starch biosynthesis of potato tubers. Although the role of this enzyme has not been directly assessed in tomato fruits, it has been demonstrated that its activity declines during early developmental stages in accordance with the expression level of its cytosolic isoform (Kortstee *et al.*, 2007). The co-localization of this gene with a YAL for *Brix* variation, and QML for maltose and galactose, renders it a good candidate to follow-up. Whilst, starch in its own right is not a highly important quality trait in tomato, its accumulation is only transient and there is increasing evidence that the biosynthesis and degradation of starch plays an important role in determining *Brix* at harvest time (Baxter *et al.*, 2005).

Sphingosine-1-phosphate lyase (gene 45) catalyses one of the first steps of sphingolipid biosynthesis. Interestingly, this enzyme co-maps with one of the precursors, Ser, and the metabolically related Gly and Thr QML (Fig. 3).

On BIN 7B, the phospholipid/glycerol acyltransferase gene (gene 56, Fig. 3) could be related to the decrease in glycerol-P levels, a QML localized into this BIN. Glycerol-P is an important intermediate metabolite in the fatty acids biosynthesis pathway in which this enzyme is involved.

The QML mapped onto BIN 7F was a variation in S-methyl-Cys content; since this metabolite was not measured through a developmental time-series experiment, it was not possible to analyse any correlation

between candidate gene expression and the QML (Fig. 6). However, three candidates deserve to be highlighted in view of their positions within the metabolic pathways (Fig. 3). First, a methionine sulphoxide reductase (gene 61), thought to participate in the protection of chloroplasts against oxidative damage (Vieira Dos Santos *et al.*, 2005), may be involved in the alterations found in the levels of *S*-methyl-Cys increasing the free Met pool by reducing Met-S-oxide in the reverse reaction. The amino acid variation found at residue 34 ($S_{lyc} \rightarrow R_{pen}$) of the sequence analysed lies within the signal peptide that directs this protein into the chloroplast (Vieira Dos Santos *et al.*, 2005). Secondly, a mitochondrial malate dehydrogenase (mMDH) also mapped onto this BIN (gene 64). This protein has been implicated in modifying photosynthetic activity and aerial growth in tomato under ambient growth conditions (Nunes-Nesi *et al.*, 2005). mMDH-silenced tomato plants were characterized by a decreased partitioning into organic and amino acids, an altered redox state and dramatic alterations in foliar ascorbic acid levels (Nunes-Nesi *et al.*, 2005). No allelic variations were observed between *S. lycopersicum* and *S. pennellii*. Thirdly, phosphoenolpyruvate carboxylase (gene 67), which also mapped to this BIN, is involved in malate assimilation and at post-transcriptional level it is regulated by this compound which could eventually lead to the modification of the fluxes from the TCA cycle (through oxalacetate) to amino acid biosynthesis.

The expression of a constitutive plastid lipid-associated protein (gene 68), a polygalacturonase inhibitor gene (gene 69), and a photosystem II 10 kDa protein (gene 73), all mapped on BIN 7H presented a co-response with 3, 4, and 2 of the co-located QML observed in *S. pennellii* ILs, respectively (Fig. 6). Interestingly, the polygalacturonase inhibitor expression displays a positive correlation with the QML for glucose-6-P, mapped onto this region, as well as with the sucrose content; and a negative correlation with fructose and glucose contents. A gene encoding a lysine decarboxylase protein (gene 71) could possibly be involved in the variation in β -Ala, Met, H-Ser, and Thr co-localizing to this BIN. Another gene with the potential to be directly involved with variations of Thr, Gly, Ser, and glucose-6-P is the phosphoglycerate kinase (gene 74), linked to these QML, which showed two amino acid polymorphisms in the fragment analysed (Table 1). This observation is in line with the finding of two other linked genes related with photosynthesis: a chloroplast-associated (gene 68) and the photosystem II 10 kDa proteins (gene 73) that could play in the mentioned variations. A poly(A)-specific ribonuclease (gene 72) also mapped onto this region showed a high level of amino acid polymorphisms (Table 1). As an alternative to the involvement of the other candidates mentioned above, it is conceivable that this gene has a regulatory role that contributes to, or indeed even causes, the observed metabolic variations.

Out of the 15 genes profiled from BIN 9B/D/E only five (gene 76, peroxidase; gene 79, 1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase; gene 81, enolase; gene 91, chloroplast pigment-binding protein; and gene 100, photosystem II reaction centre W protein) displayed a co-response with dehydroascorbate and phosphate, both co-located QML (Fig. 6). An obvious candidate associated with the increment observed in the levels of dehydroascorbate was the gene encoding monodehydroascorbate reductase (gene 83; Fig. 4), wherein three single nucleotide polymorphisms were found; two in an intron and one that resulted in an amino acid change in the coding region analysed.

On BIN 9J, an acireductone dioxygenase (gene 103), involved in Met metabolism, and a malate dehydrogenase (gene 105; Fig. 5), positively correlated with a co-located QML observed for Ala (Fig. 6). Another gene that could putatively be involved in the variation of this amino acid was a glutamyl-tRNA aminotransferase (gene 106). Despite the fact that the correlative behaviour of this gene could not be assessed, an amino acid polymorphism was found in its coding region (Table 1), so its candidature cannot be discarded. Similarly, variation in threonate levels mapped on this BIN could be linked to the presence of a GDP-mannose-3,5-epimerase gene (107), where polymorphisms between the two alleles were observed.

In BIN 10B, a CXE carboxylesterase (gene 112) presents a positive correlation with a GABA-co-localized QML, while an NAD-dependent isocitrate dehydrogenase (gene 114) negatively correlates with both GABA and Ile QML. It is conceivable that an increment in NAD-dependent isocitrate dehydrogenase mRNA levels negatively affects the GABA and T-4-OH-Pro contents by diverting the flux of 2-oxoglutarate towards Glu metabolism. In addition, β -cyanoalanine synthase (gene 109), a key enzyme involved in the detoxification of HCN, co-localizes with QML for Ala and Gly. This enzyme has previously been characterized as playing an important role in the detoxification of HCN, a side product of ethylene biosynthesis during climacteric fruit ripening (Han *et al.*, 2007).

Four genes which mapped to BIN 11C (gene 119, plastid quinol oxidase; gene 123, JAB; gene 124, proline iminopeptidase; and gene 125, ADP/ATP translocator), displayed correlation with several of the metabolites whose QTL co-localized to glucose, dehydroascorbate, fumarate, GABA, and Asp. Intriguingly, the dehydroascorbate QML co-localizes to a dehydroascorbate reductase (gene 117). Whilst no expression data are available for this gene from the previous developmental series experiment, allelic variation was found at the amino acid level, highlighting this as an interesting candidate for further study. Since ascorbic acid-associated genes have been deeply surveyed in tomato, it is unlikely that the gene identified in this work localized into BIN 11C is different from that previously mapped by Zou *et al.* (2006) onto BIN 11D, being an inaccurate localization. Another

obvious candidate for the dehydroascorbate QML mapped into this BIN is the phosphomannose mutase (gene 127) that was also mapped by Zou *et al.* (2006). Finally, the co-localization of the sucrose transporter *SUT1* gene with glucose QML is highly interesting, particularly in light of the fact that antisense inhibition of this gene resulted in modification of this metabolite content, as well as dramatic morphological changes (Hackel *et al.*, 2006).

Conclusions

In this article, a combination of molecular marker sequence analysis, PCR amplification and sequencing, analysis of allelic variation, and evaluation of co-responses between gene expression and metabolite composition traits was used in order to identify candidate genes responsible for a sub-set of the previously reported metabolic QTL (Schauer *et al.*, 2006). Using this combined strategy, 127 candidate genes located in 16 regions of the tomato genome were identified, 85 genes were cloned and partially sequenced from both *S. lycopersicum* and *S. pennellii*, and allelic variation at the amino acid level was confirmed in 37 of these candidates. Furthermore, of the 127 gene-metabolite co-locations, some 56 were recovered following correlation of parallel transcript and metabolite profiling. It is likely that the combined approaches taken here would allow the detection of both expression QTL (wherein the mechanism underlying the metabolic change is an alteration in transcript and by implication in protein amount), as well as change in function mutations in which the level of expression is unaltered (for example, the modified enzymatic activity of the *S. pennellii* LIN5 isoform invertase; Fridman *et al.*, 2004). The candidate genes discussed here fit into both categories.

The work presented here represents the initial steps in the integration of genetic, genomic, and expressional patterns of genes co-localizing with chemical compositional traits of the fruit. Whilst, in the present study were mapped a similar number of genes as by Causse *et al.* (2004), due to the nature of the present approach it was possible to map a higher density of candidate genes. Depending on the gene nature, different strategies are being used for functional analyses in order to gather information about the role of these candidates. Moreover, a physical map of some of the genomic regions studied is under construction using *S. pennellii* BAC and COS libraries in order to facilitate future sequencing initiatives. Once complete it is likely that this work will allow the identification of novel candidate genes but will also be useful for BAC sorting and sequence assembly in the nascent tomato genome sequencing programme (Mueller *et al.*, 2005b).

Supplementary data

The complete candidate genes information is detailed in Table S1. The primer sequences used to amplify all

selected candidate genes are provided in Table S2. Supplementary data may be found at JXB online.

Acknowledgements

This work was partially supported with grants from FAPESP (Brazil), CNPq (Brazil), Max Planck Society (Germany), INTA (Argentina), CONICET (Argentina), and under the auspices of the EU SOL Integrated Project FOOD-CT-2006-016214. UU was the recipient of PIBIC (Brazil) and CONICET (Argentina) fellowships. LB was the recipient of a FAPESP (Brazil) fellowship. RA, FC, and LK are members CONICET. This work was carried out in compliance with current laws governing genetic experimentation in Brazil and in Argentina.

References

- Baxter CJ, Carrari F, Bauke A, Overy S, Hill SA, Quick PW, Fernie AR, Sweetlove LJ. 2005. Fruit carbohydrate metabolism in an introgression line of tomato with increased fruit soluble solids. *Plant Cell Physiology* **46**, 425–437.
- Carrari F, Baxter C, Usadel B, *et al.* 2006. Integrated analysis of metabolite and transcript levels reveals the metabolic shifts that underlie tomato fruit development and highlight regulatory aspects of metabolic network behaviour. *Plant Physiology* **142**, 1380–1396.
- Causse M, Duffe P, Gomez MC, Buret M, Damidaux R, Zamir D, Gur A, Chevalier C, Lemaire-Chamley M, Rothan C. 2004. A genetic map of candidate genes and QTLs involved in tomato fruit size and composition. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1671–1685.
- Chen KY, Cong B, Wing R, Vrebalov J, Tanksley SD. 2007. Changes in regulation of a transcription factor lead to autogamy in cultivated tomatoes. *Science* **318**, 643–645.
- Corpet T. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* **16**, 10881–10890.
- Eshed Y, Zamir D. 1995. An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics* **141**, 1147–1162.
- Fernie AR, Tadmor Y, Zamir D. 2006. Natural genetic variation for improving crop quality. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 196–202.
- Frary A, Nesbitt TC, Grandillo S, Knaap E, Cong B, Liu J, Meller J, Elber R, Alpert KB, Tanksley SD. 2000. fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* **289**, 85–88.
- Fridman E, Carrari F, Liu YS, Fernie A, Zamir D. 2004. Zooming in on a quantitative trait for tomato yield using interspecific introgressions. *Science* **305**, 1786–1789.
- Galpaz N, Ronen G, Khalfa Z, Zamir D, Hirschberg J. 2006. A chromoplast-specific carotenoid biosynthesis pathway is revealed by cloning of the tomato white-flower locus. *The Plant Cell* **18**, 1947–1960.
- Ganal MW, Cizhal R, Hannappel U, Kloos DU, Polley A, Ling HQ. 1998. Sequencing of cDNA clones from the genetic map of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Genome Research* **8**, 842–847.
- Gordon D, Abajian C, Green P. 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research* **8**, 195–202.
- Hackel A, Schauer N, Carrari F, Fernie AR, Grimm B, Kühn C. 2006. Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2

- inhibition affects tomato fruit development in different ways. *The Plant Journal* **45**, 180–192.
- Han S, Seo YS, Kim D, Sung S-K, Kim WT. 2007. Expression of MdCAS1 and MdCAS2, encoding apple β -cyanoalanine synthase homologs, is concomitantly induced during ripening and implicates MdCASs in the possible role of the cyanide detoxification in Fuji apple (*Malus domestica* Borkh.) fruits. *Plant Cell Reports* **26**, 1321–1331.
- Hoisington D, Khairallah M, Gonzalez de Leon D. 1994. *Laboratory protocols*. El Batón, Mexico: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory.
- Kanehisa M, Araki M, Goto S, et al. 2008. KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Research* **36**, 480–484.
- Katz YS, Galili G, Amir R. 2006. Regulatory role of cystathionine- γ -synthase and de novo synthesis of methionine in the ethylene production during tomato fruit ripening. *Plant Molecular Biology* **61**, 255–268.
- Kortstee AJ, Appeldoorn NJ, Oortwijn ME, Visser RG. 2007. Differences in regulation of carbohydrate metabolism during early fruit development between domesticated tomato and two wild relatives. *Planta* **226**, 929–939.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**, 1244–1245.
- Lippman ZB, Semel Y, Zamir D. 2007. An integrated view of quantitative trait variation using tomato interspecific introgression lines. *Current Opinion in Genetics & Development* **17**, 1–8.
- Lu S, Van Eck J, Zhou X, et al. 2006. The cauliflower *Or* gene encodes a DnaJ cysteine-rich domain-containing protein that mediates high levels of β -carotene accumulation. *The Plant Cell* **18**, 3594–3605.
- Mueller L, Mills A, Skwarecki B, Buels R, Menda N, Tanksley S. 2008. The SGN comparative map viewer. *Bioinformatics* **24**, 422–423.
- Mueller LA, Solow TH, Taylor N, et al. 2005a. The SOL genomics network: a comparative resource for Solanaceae biology and beyond. *Plant Physiology* **138**, 1310–1317.
- Mueller LA, Tanksley SD, Giovannoni JJ, et al. 2005b. The Tomato Sequencing Project, the first cornerstone of the International Solanaceae Project (SOL). *Comparative and Functional Genomics* **6**, 153–158.
- Nei M, Gojobori T. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution* **5**, 418–426.
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Lytovchenko A, Smith AMO, Loureiro ME, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR. 2005. Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiology* **137**, 611–622.
- Paran I, Van der Knaap E. 2007. Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *Journal of Experimental Botany* **58**, 3841–3852.
- Price A. 2006. Believe it or not, QTLs are accurate! *Trends in Plant Science* **11**, 213–216.
- Qiu XB, Shao YM, Miao S, Wang L. 2006. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell and Molecular Life Science* **63**, 2560–2570.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**, 2496–2497.
- Salvi S, Tuberosa R. 2005. To clone or not to clone plant QTLs: present and future challenges. *Trends in Plant Science* **10**, 297–304.
- Schauer N, Fernie A. 2006. Plant metabolomics: towards biological functions and mechanism. *Trends in Plant Science* **11**, 508–516.
- Schauer N, Semel Y, Roessner U, et al. 2006. Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nature Biotechnology* **24**, 447–454.
- Sterling JD, Atmodjo MA, Inwood SE, Kumar Kolli VS, Quigley HF, Hahn MG, Mohnen D. 2006. Functional identification of an *Arabidopsis* pectin biosynthetic homogalacturonan galacturonosyltransferase. *Proceedings of National Academy of Science, USA* **103**, 5639–5640.
- Stevens R, Buret M, Duffé P, Garchery C, Baldet P, Rothan C, Causse M. 2007. Candidate genes and QTLs affecting fruit ascorbic acid content in three tomato populations. *Plant Physiology* **143**, 1943–1953.
- Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. 2002. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nature Reviews Genetics* **3**, 1–7.
- Tatusova TA, Madden TL. 1999. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiology Letters* **174**, 247–250.
- Urbanczyk-Wochniak E, Luedemann A, Kopka J, Selbig J, Roessner-Tunali U, Willmitzer L, Fernie AR. 2003. Parallel analysis of transcript and metabolic profiles: a new approach in systems biology. *EMBO Reports* **4**, 989–993.
- Van der Hoeven R, Ronning C, Giovannoni J, Martin G, Tanksley S. 2002. Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *The Plant Cell* **14**, 1441–1456.
- Vieira Dos Santos C, Cuié S, Rouhier N, Rey P. 2005. The *Arabidopsis* plastidic methionine sulfoxide reductase B proteins: sequence and activity characteristics, comparison of the expression with plastidic methionine sulfoxide reductase A, and induction by photooxidative stress. *Plant Physiology* **138**, 909–922.
- Zou L, Li H, Ouyang B, Zhang J, Ye Z. 2006. Cloning and mapping of genes involved in tomato ascorbic acid biosynthesis and metabolism. *Plant Science* **170**, 120–127.

A candidate gene survey of quantitative trait loci affecting chemical composition in tomato fruit

Bermúdez L, Urias U, Milstein D, Kamenetzky, L, Asis R, Fernie AR, Van Sluys MA, Carrari F, Rossi M.

Table S1: Candidate genes information.

Bin Size ⁽ⁱ⁾	Number Marker ⁽ⁱⁱⁱ⁾	Candidate gene (EC) Sp: XX aa ^(iv)	Identity (%) ^(v) coverage % ^(vi)	SGN (Unigene) ^(vii)	Pathway/Comments (Acc. Kegg Map) ^(viii)	QML ^(ix)	YAL ^(ix)
1J 16.0	(1) T0646	Cytochrome b6f (1.10.99.1) <i>A. thaliana</i> : 125 aa	60 (84)	U316058	Photosynthesis 00195.	↑ Malate	
	(2) T1612	Diaminopimelate decarboxylase (4.1.1.20) <i>A. thaliana</i> : 484	69 (40)	U316688	Lysine biosynthesis 00300.		
	(3) T1006	Nitrite reductase (1.7.7.1) <i>N. tabacum</i> : 587 aa	93 (100)	U317524	Nitrogen metabolism 00910.		
	(4) C2_At4g34190	Stress enhanced protein 1 (SEP1) <i>A. thaliana</i> : 146 aa	56 (100)	U216629	Thylakoid membranes protein. Response to high light intensity.		
	(5) CLET-1-A11	1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase (2.3.1.51) <i>A. thaliana</i> : 375 aa	66 (46)	U324336	Glycerolipid metabolism 00561; Glycerophospholipid metabolism 00564.		
	(6) T1782	Polygalacturonase isoenzyme 1 β (3.2.1.15) <i>A. thaliana</i> : 626 aa	32 (35)	U319301	Pentose and glucuronate interconversions 00040; Starch and sucrose metabolism 00500.		
	(7) C2_At4g34700	NADH dehydrogenase (1.6.5.3) <i>A. thaliana</i> : 117 aa	75 (98)	U216646	Oxidative phosphorylation 00190, Ubiquinone biosynthesis 00130.		
	(8) T1749	Inositol monophosphatase-like protein (3.1.3.25) <i>A. thaliana</i> : 334 aa	79 (54)	U326864	Inositol phosphate metabolism 00562, Phosphatidylinositol signalling system 04070.		
	(9) T1368	Arginine decarboxylase (4.1.1.19) <i>S. lycopersicum</i> : 707 aa	100 (100)	U312881	Glutamate 00251, Urea cycle and metabolism of amino groups 00220.		
	(10) T0283	Calmodulin protein kinase (2.7.11.17) <i>A. thaliana</i> : 556 aa	87 (41)	U317298	Calcium signalling pathway 04020.		
	(11) T1306	Aminoacylase (3.5.1.14) <i>A. thaliana</i> : 430 aa	70 (45)	U319133	Urea cycle and metabolism of amino groups 00220.		

2F 25.0	(12) T0869	Cystathionine-γ- synthase (2.5.1.48) <i>S. lycopersicum</i> : 540 aa	100 (100)	AY508112*	Cysteine metabolism 00272, Methionine metabolism 00271, Selenoamino acid metabolism 00450, Sulfur metabolism 00920.	↑ Malate ↑ Inositol 1-P ↑ Dehydroascorbate ↑ Quinate ↓ Galacturonate ↓ Glutamate ↓ Oxoproline-5 ↓ Isocitrate ↓ S-methyl- cysteine
	(13) T1768	Phospholipid/glycerol acyltransferase (2.3.1.15) <i>A. thaliana</i> : 284 aa	66 (100)	U321585	Glycerolipid metabolism 00561; Glycerophospholipid metabolism 00564.	
	(14) T1698	Glutathione S-transferase (2.5.1.18) <i>A. thaliana</i> : 356 aa	74 (100)	U315881	Glutathione metabolism 00480; Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 00980.	
	(15) C2_A12g34470	Urease accessory protein G (3.5.1.5) <i>S. tuberosum</i> : 280 aa	98 (91)	U219076	Atrazine degradation 00791, Purine metabolism 00230, Urea cycle and metabolism of amino groups 00220.	
	(16) T1516	NAD-dependent epimerase/dehydratase (5.1.3.2) <i>A. marina</i> : 218 aa	49 (94)	U317147	Galactose metabolism 00052, Nucleotide sugars metabolism 00520.	
	(17) cTOB-9-H18	Beta-ketoacyl – ACP synthase (2.3.1.41) <i>R. communis</i> : 469 aa	87 (100)	U315474	Fatty acid biosynthesis 00061.	
	(18) TC128325	LeLDH1 Lactate dehydrogenase (Ldh1) (1.1.1.27) <i>S. lycopersicum</i> 350 aa	100 (100)	U326680	Cysteine metabolism 00272; Glycolysis / Gluconeogenesis 00010; Propanoate metabolism 00640; Pyruvate metabolism 00620.	
4E 25.0	(19) T0891	GAUT4 galacturonosyltransferase (2.4.1.43) <i>A. thaliana</i> : 616 aa	66 (100)	U320717	Starch and sucrose metabolism 00500.	↑ Galacturonate
	(20) T1070	Serine carboxypeptidase II (3.4.16.6) <i>A. thaliana</i> : 459 aa	83 (36)	U323007	Preferential release of a C-terminal arginine or lysine residue.	↓ Fruit Length ↓ Fruit Weight
	(21) CLED-7-G23	acyl carrier family protein (1.1.1.100) <i>A. thaliana</i> : 126 aa	77 (100)	U316425	Fatty acid biosynthesis 00061.	
	(22) T0635	Mg protophophyrin IX chelatase (6.6.1.1) <i>N. tabacum</i> : 1382 aa	89 7	U313864	Porphyrin and chlorophyll metabolism 00860.	
	(23) T1054	ACD1 electron carrier <i>A. thaliana</i> : 536 aa	(77) 27	U319327	Pheophorbide a oxygenase. Regulates chlorophyll degradation.	
	(24) C2_A12g28880	Aminodeoxychorismate synthase (6.3.5.8) <i>S. lycopersicum</i> : 902 aa	(100) 19	U226093	Folate biosynthesis 00790.	
	(25) T1317	Violaxanthin de-epoxidase (1.10.99.3) <i>N. tabacum</i> : 478 aa	(88) 96	AK247081*	Carotenoid biosynthesis 00906.	
	(26) C2_A14g39660	Alanine: glyoxylate aminotransferase 2 (2.6.1.44) <i>A. thaliana</i> : 476 aa	(83) 75	U220644	Alanine and aspartate metabolism 00252; Glycine, serine and threonine metabolism 00260.	
	(27) C2_A1g35720	Annexin p35 <i>S. lycopersicum</i> : 315 aa	(96) 100	U314161	Secretory processes.	
	(28) T1719	Peroxidase (1.11.1.7) <i>S. lycopersicum</i> : 329 aa	(100) 100	L13653*	Methane metabolism 00680, Phenylalanine metabolism 00360; Phenylpropanoid biosynthesis 00940.	

(29) T1107	JAB <i>S. lycopersicum</i> : 367 aa	(93) 44	T1107 *	Domain in Jun kinase activation domain binding protein and proteasomal subunits. Protein degradation.
(30) T0877	Senescence-inducible chloroplast stay-green protein 1 <i>G. max</i> : 261 aa	(49) 69	U322584	Regulates chlorophyll degradation.
(31) T0883	Histidine decarboxylase (4.1.1.22) <i>A. thaliana</i> : 482 aa	(81) 98	U313818	Histidine metabolism 00340.
(32) T1606	Pre-pro-cysteine proteinase <i>S. lycopersicum</i> : 361 aa	(100) 94	U312809	Protein degradation. Fruit expression after cold treatment.
(33) T0739	Chaperone protein dnaJ-related (3.6.4.10) <i>A. thaliana</i> : 154 aa	71 (100)	U321142	↑ GABA ^g ↑ Isoleucine ^h ↑ Proline ⁱ ↑ Sucrose ^a ↑ Glycerol-3-P ^d ↓ Fruit Width ^{ad,j,l,n,o}
(34) T1122	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase <i>A. thaliana</i> : 789 aa	68 (56)	U322245	↑ Aconitate ↑ Asparagine ↑ Isocitrate ↑ Palmitate ^p ↑ Stearate ^q
(35) cLEW-8-J19	CLAVATA 1 receptor kinase <i>A. thaliana</i> : 980 aa	83 (27)	U324703	↑ Plant Weight ^{ab,cd,e,f,g,h,i,j,n,o,p,q}
(36) cLET-5-D13	Plastocyanin, chloroplast precursor <i>S. lycopersicum</i> : 170 aa	100 (94)	U312690	↑ Fructose ^b ↑ Gluconate ↑ Glucose ↑ Glucose-6-P ^k ↑ Glutamate ^k ↑ β-alanine ⁱ ↑ Citrate ^f
(37) C2_At1g20575	Dolichyl-phosphate β-D-mannosyltransferase (2.4.1.83) <i>A. thaliana</i> : 246 aa	88 (96)	U224892	↑ Aspartate ^j ↑ Glutamine ^m ↑ Inositol-1-P ↑ Lysine ↑ Methionine ^o ↑ Phosphate ^c ↑ Leucine ⁿ ↓ Glycerate ^e ↓ Dehydroascorbate
(38) cTOE-17-L11	Pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase alpha subunit (2.7.1.90) <i>S. tuberosum</i> : 616 aa	98 (86)	U314841	Fructose and mannose metabolism 00051.
(39) CT239 [§]	Pectinesterase (3.1.1.11) <i>S. lycopersicum</i> : 504 aa	(100) 100	Z94058 *	Pentose and glucuronate interconversions 00040; Starch and sucrose metabolism 00500
(40) LED50 [£]	Phenylalanine ammonia lyase (4.3.1.5) <i>S. lycopersicum</i> : 721 aa	(88) 12	AJ831581 *	Alkaloid biosynthesis II 00960; Nitrogen metabolism 00910; Phenylalanine metabolism 00360; Tyrosine metabolism 00350; Phenylpropanoid biosynthesis map00940.
(41) T0778	Ribulose-1,5 biphosphate carboxylase/oxygenase (4.1.1.39) <i>N. tabacum</i> : 491 aa	(89) 96	U317221	Carbon fixation 00710; Glyoxylate and Dicarboxylate metabolism 00630.
(42) T1174	β-ketoacyl reductase (1.1.1.100) <i>A. thaliana</i> : 318 aa	55 (65)	U321882	Fatty acid biosynthesis 00061.
(43) T0328	Anion sodium symporter <i>S. lycopersicum</i> : 407 aa	100 (31)	U315874	↑ Aconitate ^e ↑ Arginine ↑ Aspartate ^l ↑ β-alanine ^m ↑ Citrate ^f ↑ Palmitate ^u ↑ Stearate ^v ↑ Fructose ^a
(44) T1601	Phosphoglucomutase (5.4.2.2) <i>A. thaliana</i> : 615 aa	75 (27)	U333333	↑ GABA ⁿ ↑ Galactose ↑ Glycerol-3-P ^j

4I 11.0
5D 8.0/
5E 30.0/
5F 3.0/

(45) C2_A1g27980	Sphingosine-1-phosphate lyase (4.1.2.27) <i>A. thaliana</i> : 544 aa	76 (66)	U218388	Glycosphingolipid metabolism 00600.	↑ Glycine ^o ↑ Inositol-1-P ^k ↑ Isocitrate ↑ Isoleucine ^p ↑ Isomaltose ^c ↑ Maltose ^b ↑ Melezitose ^d ↑ Methionine ^q ↑ Oxoprolin-5' ^r ↑ Phenylalanine ↑ Phosphate ⁱ ↑ Serine ^s ↑ Shikimate ↑ t-4-HO-proline ^t ↑ Threonine ↑ Tyrosine ↓ Glycerate ^g ↓ Threonate ^h
(46) cLET-6-I4	Ubiquitin conjugating enzyme <i>S. tuberosum</i> : 148 aa	97 (100)	U312900	Ubiquitin-mediated protein degradation.	
(47) cTOS-7-03	Translation initiation factor (eIF-1) <i>B. vulgaris</i> : 144 aa	93 (72)	U314198	Protein required for maximal rate of protein biosynthesis, enhances ribosome dissociation into subunits and stabilizes the binding of the initiator Met-tRNA to 40S ribosomal.	
(48) cLEX-13-G5	Ripening regulated protein DDTFR10/A <i>S. lycopersicum</i> : 214 aa	100 99	U315595	DNA-binding domain found in transcription regulators in plants such as APETALA2 and EREBP (ethylene responsive element binding protein).	
(49) T1746	Peroxidase (1.11.1.7) <i>A. officinalis</i> : 320 aa	(81) 43	U323529	Methane metabolism 00680, Phenylalanine metabolism 00360; Phenylpropanoid biosynthesisbiosynthesis 00940.	
(50) T0837	Photosystem II 23 kDa protein <i>S. lycopersicum</i> : 258 aa	(99) 47	U312572	Photosynthesis 00195.	
(51) cLEF-46-G9	26S proteasome subunit-like protein <i>A. thaliana</i> : 386 aa	(79) 22	U315616	Post-translational modification; protein turnover; chaperones.	
(52) cTOF-29-N17	26S proteasome subunit-like protein <i>A. thaliana</i> : 386 aa	(62) 59	U319587	Post-translational modification; protein turnover; chaperones.	
(53) C2_A13g17210	Stress-responsive protein <i>O. sativa</i> : 113 aa	(72) 92	U214933		
(54) cLES-1-A11 ^f	NADP-malic enzyme (cytosolic) (1.1.1.40) <i>S. lycopersicum</i> : 579 aa	(100) 100	U312789	Carbon fixation 00710; Pyruvate metabolism 00620.	
7B 4.0					
(55) T1355	Early-responsive to dehydration stress protein (ERD 4) <i>A. thaliana</i> : 640 aa	(74) 36	U323609		↑ Malate ↓ Fructose 6-P ↓ Glycerol 3-P ↑ Fruit Weight
(56) C2_A14g30580	Phospholipid/glycerol acyltransferase (2.3.1.51) <i>O. sativa</i> : 332 aa	(66) 55	U229764	Glycerolipid metabolism 00561; Glycerophospholipid metabolism 00564.	
(57) cLER-17P11 ^f	Pyrophosphatase (Ppv) (3.6.1.1) <i>N. tabacum</i> : 766 aa	(96) 100	U313426	Oxidative phosphorylation 00190.	
7F 29.0					
(58) C2_A12g20860	Lipoic acid synthase (2.8.1) <i>A. thaliana</i> : 374 aa	(86) 90	U217893	Lipoic acid metabolism 00785.	↑ S-methyl- cysteine ^a ↑ Brix ↑ Plant Weight ↓ Yield ^a ↓ Seeds per Fruit ^a ↓ HI ↓ Seeds per Plant ^a
(59) C2_A14g03210	Xyloglucan endotransglycosylase (2.4.1.207) <i>S. lycopersicum</i> : 266 aa	100 (100)	DQ098654*		
(60) C2_A12g42810	Serine/threonine phosphatase (3.1.3.16) <i>S. lycopersicum</i> : 485 aa	83 (75)	U222683	MAPK signaling 04010; Calcium signaling 04020; Apoptosis 04210.	
(61) C2_A11g53670	Chloroplast methionine sulfoxide reductase B1 precursor (1.8.4.13) <i>N. tabacum</i> : 195 aa	81 (100)	U216219	Methionine metabolism 00271.	

7H 23.5	(62) T1624	Solaneyl diphosphate synthase (2.5.1.11) <i>S. lycopersicum</i> : 398 aa	100 (48)	T1624 *	Biosynthesis of steroids 00100.
	(63) C2_At3g14770	Nodulin MtN3 family protein <i>A. thaliana</i> : 236 aa	66 (96)	U231080	Nitrogen metabolism 00910.
	(64) T1171	Mitochondrial NAD-dependent malate dehydrogenase (1.1.1.37) <i>S. lycopersicum</i> : 346 aa	99 (100)	U313128	Citrate cycle (TCA) cycle 00020; Pyruvate metabolism 00620; Glyoxylate and dicarboxylate metabolism 00630; Carbon fixation 00710; Reductive carboxylate cycle 00720.
	(65) C2_At3g15290	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase/oxidoreductase (1.1.1.157) <i>A. thaliana</i> : 294 aa	76 (100)	U219933	Benzoate degradation via CoA ligation 00632; Butanoate metabolism 00650.
	(66) cLET-14-A10	Ribulose-phosphate 3-epimerase (5.1.3.1) <i>S. tuberosum</i> : 280 aa	99 (60)	U313308	Pentose phosphate pathway 00030; Pentose and glucuronate interconversions 00040; Carbon fixation 00710.
	(67) AJ243417 *	PEP carboxylase (4.1.1.31) <i>S. lycopersicum</i> : 964 aa	100 (100)	AJ243417 *	Pyruvate metabolism 00620; Reductive carboxylate cycle (CO2 fixation) 00720.
	(68) T0966	Constitutive plastid-lipid associated protein <i>S. lycopersicum</i> : 187 aa	60 (97)	U313029	Photosynthesis and chromoplastogenesis. ↑ Threonine ↑ GABA
9B 26.0/ 9D 6.5/ 9E 17.0/	(69) T1255	Polygalacturonase inhibitor (3.2.1.15) <i>S. lycopersicum</i> : 327 aa	(100) 100	U315727	Pentose and glucuronate interconversions 00040; Starch and sucrose metabolism 00500. ↑ Isoleucine ↑ Glycine ↑ Serine
	(70) cLEX-13-115	20S proteasome α subunit C1 (3.4.25.1) <i>A. thaliana</i> : 250 aa	(90) 99	U316193	Proteolytic complex, is the central enzyme of nonlysosomal protein degradation in both the cytosol and nucleus. ↑ β -alanine ↑ Methionine ↑ Homoserine
	(71) C2_At1g50575	Lysine decarboxylase (4.1.1.18) <i>A. thaliana</i> : 306 aa	(68) 51	U222777	Alkaloid biosynthesis II 00960; Lysine degradation 00310. ↑ Leucine ↑ Glucose-6-P
	(72) C2_At1g55870	Poly A specific ribonuclease <i>A. thaliana</i> : 540 aa	(52) 62	U228097	Catalysis of the hydrolysis of phosphodiester bonds in chains of RNA. Expression induced by treatment with ABA, high salinity and osmotic stress.
	(73) CT223	Photosystem II 10KDa protein <i>S. lycopersicum</i> : 138 aa	(100) 100	U143214	Photosynthesis 00195.
	(74) cLEB-3-N22 ^f	Phosphoglycerate kinase (2.7.2.3) <i>S. tuberosum</i> : 482 aa	(98) 100	U313176	Carbon fixation 00710; Glycolysis/ Gluconeogenesis 00010.
	(75) cLEX-3-N24	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 76 <i>N. tabacum</i> : 134 aa	(82) 100	U320810	Involved in the plant hypersensitive response (HR). ↑ Dehydroascorbate ↑ Phosphate
	(76) T1641	Peroxidase (1.11.1.7) <i>A. thaliana</i> : 327 aa	(73) 94	U313327	Methane metabolism 00680, Phenylalanine metabolism 00360; Phenylpropanoid biosynthesis 00940.
	(77) C2_At2g41680	Thioredoxin reductase (1.8.1.9) <i>M truncatula</i> : 514 aa	(86) 50	U221908	Pyrimidine metabolism 00240.
	(78) C2_At2g32600	Hydroxyproline-rich glycoprotein, splicing factor <i>A. thaliana</i> : 277 aa	(86) 83	U218453	RNA processing and modification.

(79) C2_A13g09920	1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase (2.7.1.68) <i>A. thaliana</i> : 815 aa	77 (63)	U215749	Inositol phosphate metabolism 00562, Phosphatidylinositol signaling system 04070 and Regulation of actin cytoskeleton 04810.
(80) T1673	Pollen allergen and extensin family protein <i>A. thaliana</i> : 171 aa	54 (95)	U327399	Cell wall strengthening in response to mechanical stress.
(81) T0532	Enolase (2-phosphoglycerate dehydratase) (4.2.1.11) <i>S. lycopersicum</i> : 444 aa	100 (100)	U312379	Glycolysis/Gluconeogenesis 00010.
(82) cLET-7-03	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (4.1.2.13) <i>S. tuberosum</i> : 358 aa	99 (100)	U314331	Carbon fixation 00710, Fructose and mannose metabolism 00051, Glycolysis/Gluconeogenesis 00010, Inositol metabolism 00031, Pentose phosphate pathway 00030.
(83) cLET-3-C15 [‡]	Monodehydroascorbate reductase (1.6.5.4) <i>S. lycopersicum</i> : 433 aa	100 (100)	U315877	Ascorbate and aldarate metabolism 00053.
(84) C2_A12g37500	Glutamate N-acetyltransferase (2.3.1.35) <i>C. lanatus</i> : 460 aa	71 (54)	U231168	Urea cycle and metabolism of amino groups 00220.
(85) T0641	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 10 <i>N. tabacum</i> : 958 aa	95 (56)	U319731	Initiation of ribosome-mediated translation of mRNA into a polypeptide.
(86) cLET-7-D1	Carbonic anhydrase (4.2.1.1) <i>A. thaliana</i> : 301 aa	64 (75)	U323788	Nitrogen metabolism 00910.
(87) T1617	Nodulin-like protein <i>A. thaliana</i> : 380 aa	67 (91)	U321884	Permease of the drug/metabolite transporter superfamily. Carbohydrate transport and metabolism. Amino acid transport and metabolism.
(88) T1177	mRNA guanylyltransferase (2.7.7.50) <i>A. thaliana</i> : 672 aa	73 (72)	U319159	mRNA capping enzyme involved in mRNA maturation.
(89) T1212	Fructose-1,6-bisphosphatase, precursor (3.1.3.11) <i>S. tuberosum</i> : 408 aa	98 97	U316424	Carbon fixation 00710; Fructose and mannose metabolism 00051; Glycolysis / Gluconeogenesis 00010; Pentose phosphate pathway 00030.
(90) cLET-2-D4	Polygalacturonase inhibitor (3.2.1.15) <i>S. lycopersicum</i> : 327 aa	(99) 100	U315727	Pentose and glucuronate interconversions 00040; Starch and sucrose metabolism 00500.
(91) cLET-7-N21	Chloroplast pigment-binding protein CP29 <i>N. tabacum</i> : 285 aa	(95) 97	U312661	Chlorophyll a-b binding proteins, minor antenna protein of photosystem II. Photosynthesis - antenna proteins 00196.
(92) T0443	Succinyl CoA ligase beta subunit (6.2.1.5) <i>S. lycopersicum</i> : 417 aa	(100) 96	U315467	C5-Branched dibasic acid metabolism 00660; Citrate cycle (TCA cycle) 00020; Propanoate metabolism 00640; Reductive carboxylate cycle (CO2 fixation) 00720.
(93) C2_A12g20360	NADH dehydrogenase (1.6.5.3) <i>O. sativa</i> : 408 aa	(75) 93	U244251	Oxidative phosphorylation 00190; Ubiquinone biosynthesis 00130.
(94) T0649	γ -hydroxybutyrate dehydrogenase (1.1.1.61) <i>A. thaliana</i> : 289 aa	(81) 98	U315373	Butanoate metabolism 00650.

9J 32.5	(95) T1785	Cytochrome b5 (00996) <i>N. tabacum</i> : 139 aa	(86) 94	U318473	Aminosugar metabolism 00530		
	(96) cLEX-13-I3	Glutathione S-transferase (2.5.1.18) <i>A. thaliana</i> : 227 aa	57 (94)	U324385	Glutathione metabolism 00480; Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 00980.		
	(97) cTOA-30-C21	Exonuclease (3.1.13.3) <i>A. thaliana</i> : 222 aa	70 (45)	U327971	Oligoribonuclease.		
	(98) T1267	Tyrosine decarboxylase (4.1.1.25) <i>A. thaliana</i> : 490 aa	78 36	U328465	Alkaloid biosynthesis I 00950; Tyrosine metabolism 00350.		
	(99) T0565	NADH dehydrogenase (1.6.5.3) <i>A. thaliana</i> : 255 aa	(83) 100	U316255	Oxidative phosphorylation 00190; Ubiquinone biosynthesis 00130.		
	(100) T0556	Photosystem II reaction center W protein (PsbW) <i>B. rapa</i> : 133 aa	(63) 90	U314531	Photosynthesis 00195.		
	(101) cLET-7-D17	20S proteasome beta subunit D-1 (3.4.25.1) <i>A. thaliana</i> : 204 aa	(83) 97	U316001	Proteasome 03050.	↓ Threonate ↓ Alanine	↓ Fruit Width ↓ Fruit Weight
	(102) T0393	Serine/threonine/tyrosine kinase (2.7.11.1) <i>A. thaliana</i> : 378 aa	(100) 100	U317251	Protein amino acid phosphorylation.		
	(103) cLET-42-02	Acireductone dioxygenase (1.13.11.53) <i>A. thaliana</i> : 199 aa	(85) 93	U313367	Methionine metabolism 00271.		
	(104) cTOA-4-017	Argonaute protein <i>N. benthamiana</i> : 1052 aa	(96) 59	U317174	Argonaute is part of the RNA-induced silencing complex (RISC), and is an endonuclease that plays a key role in the RNA interference pathway.		
10B 30.5	(105) T1190	Malate dehydrogenase (1.1.1.37) <i>S. tuberosum</i> : 332 aa	(99) 100	U312385	Carbon fixation 00710; Citrate cycle (TCA cycle) 00020; Glyoxylate and dicarboxylate metabolism 00630; Pyruvate metabolism 00620; Reductive carboxylate cycle (CO2 fixation) 00720.		
	(106) T1519	Glutamyl-tRNA (Asn/Gln) aminotransferase (6.3.5.7) <i>A. thaliana</i> : 488 aa	(64) 41	U332457	Glutamate metabolism 00251; Alanine and aspartate metabolism 00252.		
	(107) cTOF-18-B12*	GDP-mannose-3,5-epimerase (5.1.3.18) <i>V. vinifera</i> : 376 aa	(82) 58	BG128005 *	Ascorbate and aldarate metabolism 00053.		
	(108) T0637	Phospholipid δ 4-desaturase <i>S. lycopersicum</i> : 332 aa	(100) 96	U312980		↑ Aconitate ↑ Alanine	↓ Fruit Weight
	(109) T1720	β-cyanoalanine synthase (4.4.1.9) <i>S. tuberosum</i> : 351 aa	97 (100)	U314203	Cyanoamino acid metabolism 00460.	↑ Citrate ↑ GABA	
	(110) cLES-2-K4	Transketolase (2.2.1.1) <i>S. tuberosum</i> : 741 aa	98 (98)	U312319	Pentose phosphate pathway 00030; Carbon fixation 00710.	↑ Glycerol 3-P ↑ Glycine	

11C 18.0	(111) T1038	Cip-like energy dependent protease (3.4.21.92) <i>S. lycopersicum</i> : 275 aa	100 (100)	U317026	Acting on peptide bonds.	↑ Isoleucine ↑ Leucine ↑ Quinate ↑ Sorbitol ↑ t-4-HO-proline ↑ Valine ↓ Threonate
	(112) T1577	CXE carboxylesterase (3.1.1.1) <i>M. pumila</i> : 340 aa	61 (99)	U315849	Alkaloid biosynthesis II 00960.	
	(113) T1164	Galactose-1-phosphate uridyl transferase (2.7.7.12) <i>C. melo</i> : 344 aa	64 (99)	U320574	Galactose metabolism 00052; Nucleotide sugars metabolism 00520.	
	(114) T0308	NAD-dependent isocitrate dehydrogenase (1.1.1.41) <i>N. tabacum</i> : 371 aa	94 (100)	U316154	Citrate cycle (TCA cycle) 00020.	
	(115) cLEY-13-H6	Peroxidase (1.11.1.7) <i>S. rostrata</i> : 321 aa	69 (90)	U315415	Methane metabolism 00680; Phenylalanine metabolism 00360; Phenylpropanoid biosynthesis 00940.	
	(116) cLED-22-K5 ^f	Lipid transfer protein precursor <i>N. tabacum</i> : 114 aa	68 (100)	U319194	May play a role in wax or cutin deposition in the cell walls of expanding epidermal cells and certain secretory tissues.	
	(117) C2_At5g16710	Dehydroascorbate reductase (1.8.5.1) <i>S. lycopersicum</i> : 268 aa	100 (100)	U214041	Ascorbate and aldarate metabolism 00053, Glutamate metabolism 00251; Glutathione metabolism 00480.	↑ Glucose ↑ Dehydroascorbate ↑ Leucine
	(118) C2_At2g22570	Isochorismatase hydrolase (3.3.2.1) <i>A. thaliana</i> : 244 aa	67 (98)	U248441	Biosynthesis of siderophore group nonribosomal peptides 01053	↑ Aspartate ↑ Fumarate ↑ GABA
	(119) C2_At4g22260	Plastid quinol oxidase <i>S. lycopersicum</i> : 366 aa	100 100	U218630	Photooxidative damage prevention during early steps of chloroplast formation.	
	(120) C2_At1g44446	Chlorophyll a oxygenase (1.13.12.14) <i>A. thaliana</i> : 511 aa	(77) 91	U220686	Required for chlorophyll b synthesis.	
	(121) T0675	Aminotransferase (2.6.1.1) <i>A. thaliana</i> : 440 aa	(84) 91	U318602	Glutamate metabolism 00251; Alanine and aspartate metabolism 00252.	
	(122) cLEX-4-G10	Lectin protein kinase family protein <i>O. sativa</i> : 858 aa	(59) 20	U346954	Serine/Threonine protein kinase.	
	(123) cTOE-7-B4	JAB <i>S. lycopersicum</i> : 367 aa	(99) 100	U315480	Domain in Jun kinase activation domain binding protein and proteasomal subunits. Protein degradation.	
	(124) C2_At2g14260	Proline iminopeptidase (3.4.11.5) <i>A. thaliana</i> : 380 aa	(74) 94	U220663	Arginine and proline metabolism 00330.	
	(125) CT55 ^s	ADP/ATP translocator <i>S. lycopersicum</i> : 386 aa	(99) 100	U143394	Mitochondrial carrier protein.	
	(126) cLED-7-H11 ^f	Sucrose transporter SUT1 <i>S. lycopersicum</i> : 429 aa	(99) 100	U315661	Carbohydrate transporter/sucrose:hydrogen symporter.	
	(127) cLEC-68-J21 [*]	Phosphomannose mutase (5.4.2.8) <i>A. thaliana</i> : 581 aa	(79) 41	BI421979 *	Fructose and mannose metabolism 00051	

(I) in cM according to the Sol Genomics Network Map 2000 offset (escLA925XpenLA716) (www.sgn.cornell.edu).

(II) number according to the protein functional position in figure 2, 3, 4 and 5.

(III) marker according to Sol Genomics Network (www.sgn.cornell.edu)

(IV) reference protein species: number of amino acids.

(V) percentage of identity between unigene and reference protein using the blastX algorithm.

(VI) (number of aa of the alignment/total number of aa of the reference protein)x100

(VII) unigene according to Sol Genomics Network (www.sgn.cornell.edu).

(VIII) Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<http://www.genome.jp/kegg/>)

(IX) ↑ and ↓ indicate increased and decreased contents relative to *S. lycopersicum* M82 parent. Same letters indicate QML/YAL associations (according to Schauer *et al.* 2006). HI: harvest index.

* When there was no unigene, or the unigene was uncompleted, the sequence used for analysis was the GenBank sequence (NCBI accession number) or the marker sequence according to Sol Genomics Network (www.sgn.cornell.edu).

£ Markers previously reported by Causse *et al.* 2006

\$ Markers previously reported by Ganai *et al.* 1998

¥ Markers previously reported by Zou *et al.* 2006

ø Markers previously reported by Stevens *et al.* 2007

Table S2. Primer sequences used to amplify all selected candidate genes.

Bin Size ^(I)	Number Marker ^(II)	SGN (Unigene) ^(IV)	
1J 16.0	(1) T0646	U316058	GACAACATTCTCTGCAGCAAC CAGATTCCTCTACAGCAGTTTC
	(2) T1612	U316688	TAAGCCCCAAATTACTAGGAACGTTG GGTCTTCGAATGTCTCCCATGAC
	(3) T1006	U317524	CAGCTACTTCACCTCCAAATTC CCTCTGTTTCTTCTCTTTCTC
	(4) C2_At4g34190	U216629	GCTGTTGTTCAAATTTCCAGTTCTCTC GACAGCGGTCAAAACGCCACC
	(5) CLET-1-A11	U324336	GCAACCAAGGCACCGTAATC CAAGCCACAGTGGATCTTCAGGA
	(6) T1782	U319301	GCTTGGTTTTTGTGTTCTCTCCC GGCGATTTTTGGAACCCACAC
	(7) C2_At4g34700	U216646	CGACGTCGTAGGAAGTAGTTCTG CAGCCTCTCCTTGCCATAGTC
	(8) T1749	U326864	GGTACTAAGAGTTTCATCACAGGG GAGACTCAGCGGCAAAGTAATC
	(9) T1368	U312881	ATGCCGGCCTTAGGTTGTTGTG CTTCAAGCAACGCAGTATGGCC
	(10) T0283	U317298	CTTATCCGGAAGATGTTGTGC CTCATCCTCTTCTAGCAAATC
	(11) T1306	U319133	CGGCTATTATCTTGATTTGCGTGT CCTCTCTCGAAGCATCATCTTTT
2F 25.0	(12) T0869	AY508112*	GCCGTCTCTAGTTACGCTAG GGAATCCAAAGCCTGAAGAACATC
	(13) T1768	U321585	GTTTTGCCGCCGGACTTTGAC GCTCTGCCTTGGCATAAGATTTAC
	(14) T1698	U315881	ATGGCTCGTTCCGCTCTGG GATTGAGGCAGCATCAGTAC
	(15) C2_At2g34470	U219076	CAGACCACCATATGAATGACCACC CTTATTGCCTGTTGCAACTTCCAG
	(16) T1516	U317147	GAAAAAGAAGCAGGTATTGGTC GAACCAAAGAGTTCCTCGAATG
	(17) cTOB-9-H18	U315474	CAATCTCTATCATTTTCGTCCGTCTC CGACAGAGTTGTGACCACC
	(18) TC128325	U326680	CAGTAGTTCATCTTCATCACTCGG CCCAACTGACTCTGCACTTCC
4E 25.0	(19) T0891	U320717	GAGGAAGCCGGTTTTGTTCTTGTG GTGCAGAGAACAACCTCATGAACCAC
	(20) T1070	U323007	GCACTTCACCGCAACCTAAGG CTCTGGTCCTTTGACAACATG
	(21) CLED-7-G23	U316425	CTCCAGAACCTTTGAGAAAGC GCCTGAGGGTGAGATGCAATG
	(22) T0635	U313864	GCAGTTCTCCACTTTGGTACTC GAAGTATCCAGTATCCACGCC
	(23) T1054	U319327	GCTTCTTCCTTTTCACCATTTACCC CAAGTTCAGGTATATAGGGAGCCC
	(24) C2_At2g28880	U226093	CTGCCATGTCTTCGTCTATC CTGATGAGAAAGATGCTGCTCTG
	(25) T1317	AK247081*	ATGGCGCTTGCCCCCTCATTC CAGTTGCTTCCATTTTAAGTCCATCC
	(26) C2_At4g39660	U220644	CCGGAATTACCAAGTTAAGGTGGTTC GAGAATAATCCAGTGCACTCACTAGG

	(27) C2_At1g35720	U314161	GTTCCAGCATCAGTTCCAGATCC CTCCGTGCCCAATCAGAGCCAG
	(28) T1719	L13653*	GGTGATTTGAGTAACTTTCTAGTG CTATTCACAGCTGCACAGTG
	(29) T1107	T1107 *	ATGGACGCTCTGAATTCTTACGC GCGTAAGAATTGAGAGCGTCCAT
	(30) T0877	U322584	GGGAACTTTGACTACTTCTCTAGTGG CTTGCAAGCCTTGTTGGATGGTC
	(31) T0883	U313818	ATGGTAGGAACAAGTGCAGTAATC GTGCTGAGGGCAGCAACAG
4I 11.0	(32) T1606	U312809	CGTCGGCGATTGCTTTCTCCG GTGTGGCAGTCACAGTAGAGACC
	(33) T0739	U321142	CGTGCGGAAATTCGTACCCATG CAGGTCAAATGACAGGTCTTCTAG
	(34) T1122	U322245	CAGTGCTGAAATTCGTGAGCTGG GCTACAAGCTCAATATCAGCAACAC
	(35) cLEW-8-J19	U324703	GGAGCTGGTGTGTGTACCG GACTCGTGCTCCCGGCCTC
	(36) cLET-5-D13	U312690	CTGTTACCTCTGCTGCTGTTGC CTTTGCCAACCATTCCAGCTCC
	(37) C2_At1g20575	U224892	GGGGGAGAAGAACAAGTACAG GGTTGCAAAACAACCTCAAGTCTTC
	(38) cTOE-17-L11	U314841	CAGATTACGGCATAGCTCGAG GGATGCAAAGCAGGTACCCC
	(39) CT239	Z94058 *	CCTCTCGGAGTTCCTCAACAG GTTGACCGAGGTACTGTCGTG
	(40) LED50	AJ831581 *	GGCTGCTGATTCTTTAAGAGGC CTTCAGACACTCCAACAATGG
5D 8.0/ 5E 30.0/ 5F 3.0	(41) T0778	U317221	TCTCTTTACCCTCTTCATCTTTCC GCTATCTGAAGCCTTGAAGTGAAGTT
	(42) T1174	U321882	GGGATAAGCACTTTGTGAAACATTC GGAGAAAAGAGGATGAGAAGGTAC
	(43) T0328	U315874	GGCTTCTCTGTCCAGATTTATTGGG CTCCTTAAAATCATCCTTGTCAACAAC
	(44) T1601	U333333	CCAACTTCCCTTGTGTTCCAAT CCATTCGAGTGTAGGGTAAGTG
	(45) C2_At1g27980	U218388	ATCAGTTCAGAGCTTCAGCAAATTCC CACGATTTCCGGTACAGAACTACAC
	(46) cLET-6-I4	U312900	CGAAACGAATATTGAAGGAGC GGACCCAGAAGTATGCCATG
	(47) cTOS-7-03	U314198	GCCGAAGAACAAGGGTAAGGGAG CAATGTCTTCATCCTCAAACCTCAATGT
	(48) cLEX-13-G5	U315595	CACTAGAAATGATAAGACAAC GATCGTGATGGCAGTAAGTTC
	(49) T1746	U323529	GTTTCATCAGCACAGCTTTCTAC CGACAGTTCTTCTAATTTACACC
	(50) T0837	U312572	GCTTCCACACAATGTTTCTTGACCC GCACCCTTAAACCATCTCTTGTC
	(51) cLEF-46-G9	U315616	CACACCCACGTAAGTCTGCTTCG CTAGATCAGGAGTTTCAGCC
	(52) cTOF-29-N17	U319587	CGGCTCTACAGTATTTGGAATCGC CCAAATCAGGAGTTTCAGCTTCC
	(53) C2_At3g17210	U214933	GGAGGGTGGCAAAGGAGGAG CAATTTGAGAATTCAGTTTAGGG
	(54) cLES-1-A11	U312789	GAGAGCGCATTGAAGGATCTGTC CTGTAGCTTCGGTAGTTAGGAG

7B 4.0	(55) T1355	U323609	GACAGTGCTAGAAGCGTATTTAC CTGAAGAAGACCCTGTTTTGG
	(56) C2_At4g30580	U229764	CTCCGACGAGGATTCCGAC CCATGCAACGCTTGAGACATTC
	(57) cLER-17P11	U313426	GTAGTCTGCCTGTCGGAGTTTATT CTTGAAGAGAAGACCACCGTG
7F 29.0	(58) C2_At2g20860	U217893	CACCGCTACACCAGCATCTCC CAAAAGCATCTCAAAACCAGAAGC
	(59) C2_At4g03210	DQ098654*	CAGTTGGGCTTTTGACCATTG TGGTGGTGCTGGCACTCAAC
	(60) C2_At2g42810	U222683	CGGTATGGAAGCTGAGAACTC CATGCGAAGGAAGTTGGC
	(61) C2_At1g53670	U216219	CTCGAACCATACAAATCTCCTC CTTTAGAAGCAACATTATTCGTGC
	(62) T1624	T1624 *	GTCTGTGACTTGCCATAATCTTG CAATTCTCTCCAGATTATACTTC
	(63) C2_At3g14770	U231080	GATGCAGCTGGAATCGCCGGG GAACTGCCATCACCTTGAGCTTGG
	(64) T1171	U313128	ATGTTGAAATCCATCGTCCGC GAGGAGAGCAGCTCTGGC
	(65) C2_At3g15290	U219933	GGATCGGAGTTGTTGGCGCC CGGTAATCATATACCCCAACCCC
	(66) cLET-14-A10	U313308	CTTTGGGTTTCATCAACTCTGTTAC TACTTGAACCAAGTAGGCCGG
	(67) AJ243417 *	AJ243417 *	GGCTACTCGTAATTTGGAGAAAT CAATACCTTTCATGGTCAAGATG
7H 23.5	(68) T0966	U313029	GTCGCACCGGGAAGCTTTTG CATAGCTGCCATGGAAGTTGAAGAC
	(69) T1255	U315727	CCTTACCATTTAGCTTCATGG TCCTCGACCTCCATACCTAC
	(70) cLEX-13-I15	U316193	GGAGGCTATTGGAATGCAGG GTAGGTTGAGTCAGTCCAGCAC
	(71) C2_At1g50575	U222777	GGGGTCTTGTATGAGAAAGGAAAC ACATCTCACAACAGCATCCACCA
	(72) C2_At1g55870	U228097	TAAATTCATTGGTCCACTACCTTC GCTTGCCAGAACTTCATCTAG
	(73) CT223	U143214	GGCAAGCACAGTAATGAGCTC GCGCCAAAGCACTTGTGTTG
	(74) cLEB-3-N22	U313176	GCATCAGCTACTGCTTCCCCAC CTGCAACAGGGGCGTCAGCC
9B 26.0/ 9D 6.5/ 9E 17.0	(75) cLEX-3-N24	U320810	GGCTGATCGCGTACATCCTCG CCTTAACGGTGATTTCCCACG
	(76) T1641	U313327	CTCTTATTGTTATTACCTCTACTTC CATCTTTTCTAATTTACCTTGATC
	(77) C2_At2g41680	U221908	CAACACTGAGACTGTGGATGTGCG CATTTTAACACCTGATACCGTCC
	(78) C2_At2g32600	U218453	GACAGAGAATGGGGTTTGAAG GTGGAGGTAGAGGCCTGGATG
	(79) C2_At3g09920	U215749	CGATGGAGTCTTGAAGGAGCC GGTCTTCCTCCTGGAGCTCC
	(80) T1673	U327399	GAAGCCTCAGATGGAATGGATGTTATG GGAGTTGTGTAGTAGAAAGGGCTAAG
	(81) T0532	U312379	GATCTTTGACAGCCGTGGTAAC GCTCCTGCATAAACAGCCTCTG
	(82) cLET-7-03	U314331	CAAGGGAAAGTATGCTGATGAGC GTAACCTTGTCCATTGCCTCACC

	(83) cLET-3-C15	U315877	GTATGTGATCGTCGGTGGCG GCCCTCCTGTGCCAATTG
	(84) C2_At2g37500	U231168	CAGAACTCTTTAGCTGACCAAC GTTAGGATGAATCATCCCAGAA
	(85) T0641	U319731	GAGAAGGAGATTGCGGCACCC GTTTGCCAAAGAAGACAGCACCC
	(86) cLET-7-D1	U323788	GCTACAACAAGGATCTTGAGGACC CCCGGTTCTTGATGGAGACTTGAT
	(87) T1617	U321884	GTTGAAAGTACACAATGGAGGCAG GCCTTCATCTTCGGTAGCAG
	(88) T1177	U319159	GGGCATAATCGCACTGGGTTT CAGTGTGCCAACTGGATCCATA
	(89) T1212	U316424	AAGTGCTCTAGACAAAAAGACTCC CCAATGTACAATGGAACTCGTTGATG
	(90) cLET-2-D4	U315727	CTTCACTATCAGTAAGATGCAATC CAAGGGAGAGCCACAAAGGCAT
	(91) cLET-7-N21	U312661	GCTACATCCTCGTTCATCGGAACAC GTGTGAAGCGGGTCACTCAAG
	(92) T0443	U315467	GAGGAATGCTGCGTAAACTTGCCAATC GGCCTTGACTGCCTTTTCAGCTG
	(93) C2_At2g20360	U244251	TGAGGTTACCCCAATTACTAG GTACCGATCATCACTGCTGG
	(94) T0649	U315373	GGGTTTCTAGGGATTGGTATTATGGG AAAGTCATGGTCTCCCAAGCCCAAG
	(95) T1785	U318473	CTGAGGTCTCCCAGCACAAAC GTAGAAGCGGAGGCCAACAGC
	(96) cLEX-13-I3	U324385	GGCATGCCCGTATGTGTATCG CTCGACATACTTGTGATAAATTCCCAC
	(97) cTOA-30-C21	U327971	GGGGTGGATTGTGTTATGTTGC GTGTCCCTTGTAGTATTTGAG
	(98) T1267	U326465	GTGATACAGGGAACAGCAAG GATACTCAGGATTTGTTGACAGT
	(99) T0565	U316255	CCCGGGCTGCAGGAATCGG CTGGATCCGGTAAGAGTTAAAC
	(100) T0556	U314531	CATCACTGCTTGCACCACAACCTTC CCAGAAGTGTAACAGTGTAGAG
9J 32.5	(101) cLET-7-D17	U316001	GTCGGTAACGGTTTCTCACTGG CTTTGACAGACTCGCGCCAAG
	(102) T0393	U317251	CTTTGCGTCTGTAAATGTAAATGC GGACCCTTACTACGAACAATGC
	(103) cLET-42-02	U313367	GCAAAGGATCCAAGAGAGGATGTC GCAGCAGCATTAAACAGCACGAC
	(104) cTOA-4-017	U317174	CGCAGATGGGATTATCCCTG GACAGAACGAGTACACCTAGCA
	(105) T1190	U312385	ATAGGGCAAAAGATCCAGTTCGC GCAAGGCAGGAGTAAGCCAATG
	(106) T1519	U332457	CATACTCCATAGAACTGCTAAAC GCACCCTGGTAATGCCAAAC
	(107) cTOF-18-B12	BG128005 *	GGGAGCCCTACTGGCCTTCAG CTGCTGTGCTTTCTCACGTCCG
10B 30.5	(108) T0637	U312980	GGGATTTGAAGGGGAAAAGAG AACAACTTGAGTATAATGTCCAC
	(109) T1720	U314203	CGTTGGTGAGGAGAAGATTTTATTCG GCATGTTTTGTGCCTCTTTCCTGAGA
	(110) cLES-2-K4	U312319	CCCTCGCCATGGCTCATCTTC CTCATTCAGTAGAGTAGACCAGC

	(111) T1038	U317026	CGTCTGCAATTGCTGGAACGTC GATCAACAGCAGTTTTTTCATCTCTTG
	(112) T1577	U315849	CCGGGAATTCCTTGGAGGACAC CCTCAAGAATAAGTTGTGTAGCTTC
	(113) T1164	U320574	GGCAGAAACGCCAAATCGGAG GTTATTGGAGATTCTCACATCCC
	(114) T0308	U316154	GCTAAGCGAACCCTACCCATCC CCAGATTTGCAATGACAGCATC
	(115) cLEY-13-H6	U315415	GCCAGCCATAAAACGAGTCG CGTTCACCTTCCTGCAGTTTACG
	(116) cLED-22-K5	U319194	GCATGCTTTGTGGTTTTGTGC GCATCTTATTCTTTGCCACCATG
11C 18.0	(117) C2_At5g16710	U214041	TCGACCGCAAAGATAACACCGTC CTAACCCATGACTTTTGGTCG
	(118) C2_At2g22570	U248441	GAACGGTGGCGCAAGAGG GACTAAGCAAGCTAAGAAGGTC
	(119) C2_At4g22260	U218630	GCGATTTTCGATTTCTGCTATGAG GTGACTGACTTCTTTATACAATCCACG
	(120) C2_At1g44446	U220686	GCCGCTCTAACAAGTCTTGTAC GATGTGTTTCAGCAGGGGAGC
	(121) T0675	U318602	CCAGTCAAATGCTTCAGCAGC CCTTCATCCTCTGCACTGC
	(122) cLEX-4-G10	U346954	CTTGACTTATCCTCCAGAATTATC GAACTCATAGACCAGTACCCTGTG
	(123) cTOE-7-B4	U315480	GGACGCTCTGAATTCTTACGC GTTTCGACCATCGGCTCTGG
	(124) C2_At2g14260	U220663	GATGAGATTACCCATGAAGTTGGC GAGAAACTGAAAAATGTCCTTGAAGGAG
	(125) CT55	U143394	GCAGACATGAATCAGCATCCAAC GCACCACCAGATCCGTATTTT
	(126) cLED-7-H11	U315661	GGTACAAAAGGGAACTTACAG GTTTAGCATCAGCAGGTGGTG
	(127) cLEC-68-J21	BI421979 *	CTCCGTCGGTCATGACTCAC CACGACCACTCGAATCCACAG

(I) in cM according to the Sol Genomics Network Map 2000 offset (escLA925XpenLA716) (www.sgn.cornell.edu).

(II) number according to the protein functional position in figure 2.

(III) marker according to Sol Genomics Network (www.sgn.cornell.edu)

(IV) unigene according to Sol Genomics Network (www.sgn.cornell.edu).

* When there was no unigene, the sequence used for primer design was the GenBank sequence (NCBI accession number) or the marker sequence according to Sol Genomics Network (www.sgn.cornell.edu).

*Capítulo II: Análise da diversidade
genômica entre o tomate cultivado,
Solanum lycopersicum, e a espécie
selvagem Solanum pennellii.*

1. INTRODUÇÃO

A genômica comparativa é uma abordagem muito útil para a obtenção de informação biológica proveniente de sequências de DNA, permitindo a transferência de dados obtidos do estudo de uma espécie para outra, inclusive quando distantes filogeneticamente. Um caso extremo é o uso dos genomas de *Escherichia coli*, *Homo sapiens*, *A. thaliana* e *Oryza sativa* no entendimento do genoma do trigo (Heslop-Harrison, 2000). A análise da diversidade alélica, ou entre genes ortólogos, permite identificar a origem da variação funcional e estrutural dos sistemas biológicos. Adicionalmente, converte-se em uma ferramenta determinante para estudos evolutivos e de biodiversidade.

A comparação de genomas filogeneticamente próximos tem permitido o descobrimento de variantes alélicas e novos genes, RNAs não-codificantes, elementos regulatórios e diversas sequências conservadas com função até hoje desconhecida (Guigó *et al.*, 2003; Kellis *et al.*, 2003; Siepel *et al.*, 2007; Stark *et al.*, 2007; Katzman *et al.*, 2007; Zheng e Zhang, 2008; Clepet *et al.*, 2011; Reineke *et al.*, 2011). Porém, devido ao reduzido número de espécies de plantas vasculares com o genoma completamente sequenciado, não existem muitas sequências disponíveis de espécies filogeneticamente próximas, com exceção do grupo das gramíneas. Desta forma, as análises comparativas são restritas, sendo que os dados disponíveis estão limitados às regiões codificantes e elementos de transposição (Ku *et al.*, 2000; Quiros *et al.*, 2001; Ilic *et al.*, 2003; Barakat *et al.*, 2011; Sanchez *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011).

Apesar da importância econômica de várias das espécies que compõem Solanaceae, a existência de uma ampla base de dados genéticos e de sequências genômicas e expressas, uma sólida plataforma bioinformática (Mueller *et al.*, 2005, <http://www.sgn.cornell.edu>) e o genoma de tomate sequenciado, poucos são os trabalhos de genômica comparativa de grande escala (Rensink *et al.*, 2005; Kamentzky *et al.*, 2010; Song e Wang, 2010; Bossolini *et al.*, 2011). Um destes trabalhos desenvolvido pelo nosso grupo (Kamentzky *et al.*, 2010, vide anexo 1) comparou os genomas de um tomate silvestre, *S. pennellii* e do cultivado, *S. lycopersicum*, ao longo de cinco regiões genômicas que compreendem mais de 100 QTL associados com o metabolismo primário (Schauer *et al.*, 2006, 2008). Para isso, foi construído um mapa físico ancorando 374 clones de BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*) e cosmídeos, provenientes de bibliotecas genômicas de *S. pennellii*, ao mapa genético de *S. lycopersicum*. A topologia do mapa mostrou que os genomas

podem ser considerados, de forma geral, colineares (Figura 1A). No entanto, algumas regiões apresentaram evidências de rearranjos como inversões ou *indels* (Inserções/Deleções) (Figura 1B). Outra observação interessante foi a convergência de amplas distâncias genéticas de *S. pennellii* em intervalos menores em *S. lycopersicum*, como pode ser claramente evidenciado para o fragmento do cromossomo 4 analisado (Figura 1A). Esse resultado sugere expansões locais do genoma da espécie selvagem as quais se refletem na diferença de tamanho dos genomas, 1.200 Mb e 950 Mb para *S. pennellii* e *S. lycopersicum*, respectivamente (Kamentzky *et al.*, 2010).

Figura 1. Mapas físicos e genéticos integrados de *S. pennellii* e *S. lycopersicum*.

Os marcadores genéticos e suas posições em cM de acordo ao mapa Tomato EXPEN 2000 estão indicados à esquerda e à direita dos fragmentos cromossômicos de *S. pennellii* e *S. lycopersicum*, respectivamente. Os clones ancorados de *S. pennellii* estão indicados com barras cinza. Os clones pertencentes ao mesmo contig estão agrupados em verde. Os clones de BAC de *S. lycopersicum* estão indicados com quadrados pretos. As linhas cinza unem clones de *S. pennellii* com os marcadores com os quais hibridam. As linhas azuis indicam os clones de *S. pennellii* que possuem a sequência do markers na sua sequência terminal. As linhas vermelhas unem os clones de ambas as espécies que possuem sequências ortólogas. As linhas pretas unem os clones de *S. lycopersicum* com seus correspondentes marcadores. (A) Fragmento do cromossomo 4, o clone indicado com uma seta azul foi totalmente sequenciado nesta tese e contém o gene candidato *chaperona DnaJ*. (B) Fragmento do cromossomo 7. Adaptado de Kamenetzky *et al.* (2010).

A fim de avaliar a diversidade genômica entre *S. pennellii* e *S. lycopersicum* por meio de outra abordagem, este trabalho realizou o sequenciamento, anotação e análise de um fragmento genômico do cromossomo 4, região na qual está contido o gene candidato *chaperona DnaJ* identificado no capítulo I (Bermúdez *et al.*, 2008). A escolha dessa região foi motivada pelo grande número de QTL descrito por Schauer *et al.* (2006) -37 QML e 10 YAL- associados a caracteres que determinam a qualidade do fruto. Além disso, as evidências funcionais descritas para a chaperona DnaJ discutidas no capítulo anterior revelam esse gene como um possível regulador metabólico. Desta forma, o sequenciamento da região é altamente desejável para revelar as diferenças genômicas que as determinam, já que as variações no conteúdo de metabólitos descritas nas ILs proveem do fragmento introgridido. Os resultados obtidos formam parte do mesmo artigo que descreve o mapa físico, publicado pelo grupo em 2010 (Kamenetzky *et al.*, 2010).

2. OBJETIVOS

Após ter sido descritos diversos genes candidatos associados a um vasto número de caracteres de interesse agrônômico do fruto de tomate, o segundo objetivo desta Tese foi avaliar a diversidade genômica entre *S. pennellii* e *S. lycopersicum* para melhor entender as diferenças que determinam as mudanças fenotípicas. Considerando as justificativas expostas na introdução deste capítulo, foi escolhido para a análise um fragmento genômico do cromossoma 4 que contém o gene candidato *chaperona DnaJ*.

Desta forma foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- 1) Sequenciar e anotar um clone de BAC da espécie selvagem *S. pennellii* que contém o gene candidato *chaperona DnaJ*;
- 2) Analisar a microsintenia com a região ortóloga da espécie cultivada *S. lycopersicum*; e
- 3) Analisar o padrão de evolução dos genes identificados e estimar o tempo de divergência entre as duas espécies.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Sequenciamento do clone de BAC

O BAC de *S. pennellii* C04SpBP093E005.P4C04 foi identificado a partir da triagem de uma biblioteca genômica da espécie selvagem (Chen *et al.*, 2007) utilizando o marcador molecular T0739 (Kamenetzky *et al.*, 2010). O DNA foi purificado usando o kit R.E.A.L Prep 96 Plasmid Kit (Qiagen) segundo recomendações do fabricante e sequenciado, por pirosequenciamento (plataforma 454 Roche) por meio de uma colaboração realizada com a empresa. O processo de montagem foi realizado usando o programa Phred+Phrap+Consed (Ewing e Green, 1998; Gordon *et al.*, 1998).

3.2. Anotação

A sequência obtida do BAC de *S. pennellii*, assim como a correspondente ao clone ortólogo de *S. lycopersicum* (C04HBa0331L22) obtido da Solanaceae Genomics Network (SGN, <http://solgenomics.net/>), foi anotado usando dois programas de predição gênica FGENESH (Salamov e Solovyev, 2000) e Augustus (Stanke *et al.*, 2004). Cada clone foi comparado independentemente contra a base de dados de unigenes da SGN (versão de Setembro 2009, com 123.550 sequências e 92.327.235 bp) usando o programa de alinhamento global *cross-match* (www.phrap.org). As sequências dos genes preditos foram verificadas manualmente por comparação por BLAST (Altschul *et al.*, 1990) com o unigene correspondente identificado. Quando não foi possível identificar um unigene associado na SGN, foi usada a base de dados do TIGR (Plant Transcript Assemblies) (<http://plantta.tigr.org/>). Apenas os genes preditos pelos dois programas e que apresentaram homologia com uma sequência de RNAm de *S. lycopersicum* e/ou *A. thaliana* foram anotados. Quando os RNAm homólogos eram provenientes de *S. lycopersicum*, foram utilizados parâmetros de corte de 95% de identidade e 90% de cobertura. Quando os RNAm eram provenientes de *A. thaliana*, os critérios considerados foram menos estridentes, com 70% de identidade e 85% de coberturaRNAm. A identificação das sequências repetitivas foi realizada usando o software RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org>), e só foram considerados elementos que cobriram no mínimo 70% da sequência do elemento de referência. Os retrotransposons com LTRs (repetições terminais longas, *Long Terminal Repeats*) foram identificados usando o programa LTR finder

(http://tlife.fudan.edu.cn/ltr_finder/). Os genes encontrados no BAC de *S. pennellii* foram nomeados com a seguinte nomenclatura: Sp04gBP4C04.#, em que Sp pertence a *S. pennellii*, os dois dígitos (04) indicam o número do cromossomo, g representa a sequência genômica, B que identifica o clone de BAC, os cinco dígitos (P4C04) indicam as coordenadas do clone na biblioteca, e o # corresponde a números consecutivos que indicam a ordem dos genes dentro do clone. Para realizar a análise comparativa da região genômica ortóloga entre *S. lycopersicum* e *S. pennellii*, foi escolhido o clone de BAC C04HBa0331L22 de *S. lycopersicum* que foi o que apresentou a maior cobertura da sequência de *S. pennellii*. A identificação de *indels* e SNPs foi calculada usando o algoritmo Needleman-Wunsch global alignment disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align>.

3.3. Análises evolutivas

As sequências codificantes dos genes foram alinhadas usando o software ClustalW multiple alignment (versão 1.5; Thompson *et al.*, 1994). O alinhamento foi manualmente ajustado usando como referência o alinhamento da sequência protéica. As distâncias sinônimas (d_s) e não-sinônimas (d_n) foram estimadas usando o programa MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) e o método Nei-Gojobori (Jukes-Cantor). O desvio no uso de códons foi determinado pelo índice N_c (número efetivo de códons) usando o software DNAsp versão 4.10.9.9 (Rozas *et al.*, 2003). O teste de seleção foi realizado com o programa MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) usando o método Nei-Gojobori (Jukes-Cantor). Para rejeitar a hipótese nula de evolução neutra ($d_s = d_n$) foi considerado um $P < 0,05$ no teste Z. O teste da taxa relativa foi realizado usando o programa HYPHY (<http://www.hyphy.org>) e o modelo de códons proposto por Muse e Gaut (1994). Para rejeitar a hipótese nula de homogeneidade foi considerado um $P < 0,05$ no teste de χ^2 . As taxas de substituição específicas da região genômica (r) e o tempo de divergência entre as espécies foram estimados usando a equação $r = d_s / 2T$, onde: d_s é o número estimado da substituições sinônimas por sítio entre as sequências homólogas (distância sinônima) e T é o tempo de divergência. r foi estimado usando o dado de tempo de divergência entre arabidopsis/Solanaceae baseado em dados fósseis de 120 MAA (milhões de anos atrás) (Bell *et al.*, 2005; Magallon e Sanderson, 2005). Para o cálculo de d_s foram utilizadas as regiões codificantes concatenadas dos genes. A estimativa do tempo de inserção do retrotransposon foi calculado utilizando o alinhamento das duas LTRs (ClustalW multiple alignment, version 1.5, Thompson *et al.*, 1994). A distância

genética (D) entre elas foi estimada com o programa MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) usando o modelo Kimura 2-parâmetros, o qual corrige a homoplasia e as diferenças nas taxas de transição e transversão. A data de inserção do retrotransposon foi estimada usando $T=D/2r$, onde: r corresponde a $1,3 \times 10^{-8}$ substituições por sítio por ano como foi proposto por Ma e Bennetzen (2004). Os intervalos de confiança foram calculados usando o erro padrão da distância média (D) estimado com o programa MEGA 3.1.

4. RESULTADOS

4.1. Anotação e análise de microssintenia

No capítulo I foram identificados 127 genes candidatos que co-localizavam com 106 QTL associados a caracteres de rendimento e qualidade nutricional do fruto de tomate ao longo de 16 regiões cromossômicas. Em particular, localizado a 128 cM do cromossomo 4, existe um gene codificante para uma chaperona DnaJ que se apresentou como possível candidato para explicar as diferenças do conteúdo de aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares observadas entre a linhagem introgridida 4-4 e o controle *S. lycopersicum* (M82) (Schauer *et al.*, 2006). Este gene foi identificado a partir da sequência do marcador T0739 (Figura 1) o qual foi utilizado para triar bibliotecas genômicas de *S. pennellii* (Kamenetzky *et al.*, 2010). Desta forma, foi selecionado o clone de BAC C04SpBP093E005.P4C04 que foi sequenciado com o intuito de realizar um estudo de microssintenia entre *S. pennellii* e *S. lycopersicum*, avaliando: i) ordem gênica, ii) diferenças alélicas e iii) existência de elementos regulatórios ou padrão de inserção de elementos de transposição diferenciais entre ambas as espécies.

Após o sequenciamento do clone C04SpBP093E005.P4C04, cujo tamanho revelado perfaz 83.193 pb, a anotação realizada revelou uma densidade gênica de 0,2 genes/Kb. Para as outras regiões do genoma foi observada uma densidade de 0,1 genes/Kb (Kamenetzky *et al.*, 2010), e uma menor densidade de elementos de transposição. A anotação do clone ortólogo de *S. lycopersicum* e a comparação de ambas as espécies permitiu a identificação de 14 genes ao longo dos 77.972 pb do genoma. Os genes apresentaram alta conservação na ordem, orientação e estrutura gênica (éxons/introns) (Tabela 1, Figura 2). Só foram observadas alterações da colinearidade do tamanho das regiões intergênicas e no padrão de inserção de elementos de transposição, já que foi encontrado um retroelemento presente unicamente na sequência de *S. pennellii* (Figura 2). Adicionalmente, analisando a distribuição dos polimorfismos, foi encontrada, como esperado, uma maior porcentagem de *indels* nas regiões intergênicas do que nas gênicas (Figura 2), e em introns do que nos éxons (Tabela 1).

Figura 2. Microsentinela entre *S. lycopersicum* e *S. pennellii* da região genômica que contém o gene *chaperona DnaJ*. Os genes encontram-se indicados como setas azuis e nomeados de acordo com a Tabela 1. O gene *chaperona DnaJ* encontra-se indicado com a seta vermelha. O retângulo verde representa o retroelemento identificado na sequência de *S. pennellii*, e as suas LTRs encontram-se indicadas como linhas pretas nos extremos do elemento. A porcentagem de identidade e de *indels* entre os genótipos, ao longo das regiões gênicas, incluindo as regiões não traduzidas, e intergênicas, encontram-se indicadas.

Analisando os genes identificados, dois novos candidatos surgem particularmente interessantes como possíveis envolvidos nas alterações no conteúdo de açúcares solúveis observadas. O Sp04gBP4C04.8, que corresponde a uma hexoquinase plastidial e o Sp04gBP4C04.13 que codifica uma β -frutofuranosidase (invertase). Ambos os genes são expressos no fruto e apresentam polimorfismos de aminoácidos (Tabela 1). Interessantemente, foi observada também, em menor escala, uma colinearidade com um fragmento do cromossomo 1 do genoma de *arabidopsis* (Tabela 1).

Tabela 1. Anotação e análise comparativa entre *S. lycopersicum* e *S. pennellii*.

Gene ID ^a	-/+ ^b	Nome ^c	cDNA referência ^d	Biblioteca de cDNA ^e	Homólogo em <i>arabidopsis</i>	Categoria Funcional ^f	% Identidade (% <i>indels</i>) ^g	Exons	Introns	Exons ^h	Comprimento (aa) ⁱ	Polimorfismos de aminoácidos ^j	SI - Sp	SI - At	Sp - At
Sp04gBP4C04.1	-	Difitina sintase	U565114	FR, GFFP	At4g31790	26	99 (0) BC: 100	1 ^l	33 ^m	0					
Sp04gBP4C04.2	-	Chaperona tipo DNAJ	U563083	F, RC,	At1g75690	29	99 (0) BC: 480	5	95.3 (2.7) BC: 2224	2	159	5.3	7.2 ⁿ	7.5 ⁿ	
Sp04gBP4C04.3	-	Gene expresso 1	TA04095/08	F, FR, TF, GFFD, P	-	35	98.6 (0) BC: 633	7	94.9 (1.1) BC: 2077	4	179				
Sp04gBP4C04.4	+	Proteína da família HVA22 de resposta a ácido abscísico	U273145		At5g42560	17	98.4 (0.0) BC: 966	6	96.0 (1.5) BC: 1202	9	321	1.83	2.23 ⁿ	2.15 ⁿ	
Sp04gBP4C04.5	-	Fator de transcrição E2F	U602123	GFFD	At2g36010	27	98.8 (0) BC: 996	10	94.3 (3.3) BC: 5294	8	331				
Sp04gBP4C04.6	-	Fator de iniciação eucariótico da subunidade 3 γ	U573913	R, C, CG, GFFD, CL	At2g45730	29	98.7 (0) BC: 1341	13	95.3 (3.1) BC: 4320	7	446	3.0	3.12 ⁿ	3.11 ⁿ	
Sp04gBP4C04.7	+	Proteína do tipo dedo de zinco (C2H2)	U565583	RC, GFFD, F, TF, FL, P	At1g75710	27	97.6 (0.4) BC: 1359	4	91.4 (5.0) BC: 1865	13	451	3.8 ⁿ	3.9 ⁿ	3.9 ⁿ	
Sp04gBP4C04.8	+	Hexoquinase plastídica	U576979	F, FP	At1g47840	2	99.2 (0) BC: 1500	9	88.8 (8.1) BC: 2111	2	499	11 ⁿ	4.6 ⁿ	4.6 ⁿ	
Sp04gBP4C04.9	+	Proteína do tipo clatrina de montagem AP17	U321683	R, FR, GT, CL, F	At1g47830	31	100 (0) BC: 429	6	73.1(25.2) BC: 3113	0	142	NC	17.8 ⁿ	17.8 ⁿ	

Sp04gBP4C04.10	+	Gene expresso 2	U571353	P, FP, RC	-	35	96.5 (0.6) BC: 909	1	ND	ND
Sp04gBP4C04.11	-	Gene expresso 3	U569610	FR, S, FP, RC	At1g75730	35	98.3 (0.3) BC: 1851	10	608	9
Sp04gBP4C04.12	-	Proteína coativadora da transcrição	U574978	FP, FR, F, RC	At5g03220	27	99.4 (0) BC: 507	5	168	0
Sp04gBP4C04.13	-	β -frutofuranosidase	U579102	FR, F, R, OV, CL, GFFD, RC, CG, RND	At4g34860	2	99.2 (0) BC: 1713	4	570	1
Sp04gBP4C04.14	+	Proteína citomatrix	U564422	F, C	At1g19980	35	99 (0) BC: 1062	4	353	8
									1.1	1.3
									1.3	8.7 ⁿ

a. Identificação do gene

b. Orientação do gene na sequência genômica.

c. Identidade funcional do gene.

d. cDNA de referência de acordo com Sol Genomics Network (SGN) ou TIGR Transcript Assemblies.

e. Biblioteca de cDNA de tomate a partir da qual foi sequenciado o RNAm de acordo com a informação de referência na SGN. F: folha, TF: tricomas de folha, FL: flores, FR: fruto, FP: pericarpo de fruto, S: sementes, P: plântulas, R: raiz, C: caule, CG: galha de coroa, GFFD: gemas florais e flores em desenvolvimento, OV: ovário, GT: tricomas glandulares, CL: calos diferenciados e não-diferenciados, RND: raízes crescidas em diferentes condições de deficiências nutricionais e minerais, RC: coleção rearranjada de cDNAs de *S. lycopersicum*, BV: brotos vegetativos incluindo meristemas e folhas pequenas em expansão, SP: *Solanum pennellii*.

f. Categoria funcional de acordo ao programa MapMan (Urbanczyk-Wochniak et al., 2006). 2: carboidratos principais, 17: hormônios, 26: diversas famílias enzimáticas, 27: regulação de RNA, 29: modificadores de proteínas, 31: célula, 35: função desconhecida.

g. Porcentagem de identidade e *indels* entre *S. lycopersicum* e *S. pennellii* da região analisada. BC: bases comparadas totais.

h. Número de éxons comparados entre os dois genótipos.

i. Número de aminoácidos comparados entre os dois genótipos.

j. Aminoácidos polimórficos na sequência protéica predita. ND: não determinado.

k. Distância sinônima/Distância não-sinônima. *St. S. lycopersicum*, *Sp. S. pennellii*, *At. A. thaliana*.

l. Éxons não incluídos na análise comparativa da região ortóloga entre *S. lycopersicum* e *S. pennellii*.

m. Só foram comparadas sequências parciais porque o gene encontrava-se no extremo do clone.

n. Seleção purificadora estatisticamente significativa ($P < 0.05$). NC: Não calculável porque $d_H = 0$.

Os nomes em negrito indicam os genes que foram encontrados em regiões de microsinetia entre *S. pennellii* e *A. thaliana*.

4.2. Análises evolutivas

Para avaliar o grau de conservação de cada gene, foi estimada a razão entre as distâncias sinônimas e não-sinônimas (d_S/d_N). A escolha dos genes a serem avaliados foi baseado nos seguintes critérios: *i*) apresentar a sequência codificante completa (assim o gene Sp04gBP4C04.1 foi descartado); *ii*) apresentar ortólogos de *A. thaliana*, e; *iii*) mostrar taxas de substituição relativa homogênea entre *S. lycopersicum* e *S. pennellii*, considerando *A. thaliana* como o grupo externo. Para os treze genes analisados, a taxa d_S/d_N foi maior que 1, indicando a ausência de seleção positiva (Tabela 1). Foi realizado um teste de seleção sendo identificados genes sob evolução neutra ($d_S=d_N$) e seleção purificadora ($d_S>d_N$) (Tabela 1). Todos os genes que apresentaram seleção purificadora não-significativa entre *S. lycopersicum* e *S. pennellii* também demonstraram ter polimorfismos na sequência de aminoácidos. É importante ressaltar que a taxa d_S/d_N pode ser mal interpretada quando o desvio no uso de códons é alto, porém, para os dados usados neste trabalho, não foi observado qualquer viés de códons para nenhum gene nas três espécies analisadas.

Os dados obtidos do sequenciamento, anotação e comparação das regiões ortólogas entre *S. pennellii* e *S. lycopersicum* apresentadas neste trabalho constituem uma informação muito valiosa para estimar a data de divergência entre essas duas espécies de tomate. Usando a estimativa de 120 milhões de anos como data de divergência entre *A. thaliana* e Solanaceae (Bell *et al.*, 2005, Magallon e Sanderson, 2005), foram estimadas as taxas de substituição específica para a região genômica analisada e o tempo de divergência entre as espécies. Assim, foi obtida uma taxa de substituição de $4,26 \times 10^{-9}$ por sítio por ano e uma data de divergência estimada de 2,9 ($\pm 690,736$) milhões de anos (Figura 3). A identificação do retrotransposon do tipo *Copia*, SHACOP_I_MT com ambas as LTRs, no genoma de *S. pennellii* unicamente, permitiu estimar a data de inserção do mesmo baseado no relógio molecular. O cálculo resultou em 150 mil anos o qual esta de acordo com a data estimada de divergência entre as duas espécies mencionadas acima (Figura 3).

Figura 3. Estimativa do tempo de divergência das espécies.

As datas estimadas por Bell *et al.* (2005) e Magallon e Anderson (2005) estão em preto. As datas estimadas por Wang *et al.* (2008) estão em azul. A divergência entre *S. pennellii* e *S. lycopersicum*, estimada segundo o relógio molecular, está indicada em verde. A inserção do retrotransposon SHACOP_I_MT está indicada com uma seta em vermelho.

5. DISCUSSÃO

A domesticação das plantas cultivadas é um dos eventos mais recentes que influem drasticamente na evolução das plantas. Existem evidências que as mudanças anatômicas selecionadas durante a domesticação são determinadas pela modificação dos padrões de expressão gênica de poucos locos regulatórios (Doebley *et al.*, 1997). Por exemplo, demonstrou-se que os alelos determinantes do tamanho do fruto não apresentam diferenças na sequência protéica, mas sim nos níveis de transcrição devido a polimorfismos na região promotora (Nesbitt e Tanksley, 2002). Porém, neste trabalho foi observado um padrão diferente identificando-se polimorfismos nas sequências protéicas. Nas 77.972 bases comparadas entre os dois genótipos foram identificados 14 genes dos quais 10 apresentaram polimorfismos na sequência protéica. Ainda mais, dentre os sete genes para os quais foi possível estimar a taxa d_S/d_N , quatro não apresentaram seleção purificadora entre *S. pennellii* e *S. lycopersicum*. Inclusive os três genes que mostraram seleção purificadora também apresentaram polimorfismos de aminoácidos. Estes resultados indicam que as regiões codificantes analisadas estão divergindo com diferentes graus de pressão seletiva desde a divergência entre as duas espécies. Todos os genes analisados, exceto pela proteína codificante para citomatriz (Sp04gBP4C04.14), apresentaram seleção purificadora entre tomate e arabidopsis, indicando que os genes analisados teriam uma função conservada evolutivamente. Em trabalhos prévios, Nesbitt e Tanksley (2002) reportaram uma data de divergência entre *S. pennellii* e *S. lycopersicum* de sete milhões de anos, usando uma taxa de substituição de $6,03 \times 10^{-9}$ e quatro locos. Por outro lado, Wang *et al.* (2008) reportaram a análise de sequências de um segmento sintênico conservado nos genomas de cinco espécies de Solanaceas (petunia [*Petunia hybrida*], pimenta [*Capsicum annuum*], berinjela [*Solanum melongena*], batata [*Solanum tuberosum*] e tomate). Esses resultados indicam que o último ancestral comum entre as espécies viveu há aproximadamente 31,2 milhões de anos e que a divergência entre a batata e o tomate ocorreu há aproximadamente 6,2 milhões de anos atrás, data incompatível com a de Nesbitt e Tanksley (2002). Os nossos dados, baseados em 14 locos, nos permitiram estimar a data de divergência entre *S. pennellii* e *S. lycopersicum* em 2,7 milhões de anos. Estes dados, aliado ao fato de *S. pennellii* ser uma das espécies selvagens mais distantes de *S. lycopersicum*, indicariam que as espécies do gênero *Solanum* divergiram mais recentemente do que tinha sido reportado previamente. O retransposon do tipo *Copia* identificado na sequência de *S.*

pennellii apresenta uma data de inserção estimada de 150 mil anos, como esperado, após a divergência entre as duas espécies. Recentemente, em diversos trabalhos têm sido demonstrado o impacto dos elementos de transposição em caracteres de interesse agrônomo. Como alguns exemplos, podemos citar o efeito da inserção de um retrotransposon no acúmulo de β -caroteno nos plastídios de diferentes órgãos em couve-flor (*Brassica oleracea*) (Lu *et al.*, 2006) e também na duplicação de um gene causando variações morfológicas no fruto de tomate (Xiao *et al.*, 2008). Desta maneira, esse elemento de transposição diferencial identificado poderia ser estudado para avaliar o seu possível efeito em padrões diferenciais de expressão entre *S. pennellii* e *S. lycopersicum*.

Finalmente, estudos funcionais deverão ser desenvolvidos com o intuito de verificar o envolvimento dos novos genes candidatos identificados, uma hexoquinase plastidial e uma β -frutofuranosidase, no metabolismo de açúcares no fruto do tomate.

Não foram encontrados rearranjos na região estudada, no entanto, a existência de polimorfismos tanto nas regiões codificantes como nas não-codificantes, permitem postular que sejam essas as responsáveis pelas mudanças fenotípicas observadas. Desta forma, havendo obtido a sequência genômica do alelo de *S. pennellii* do gene *chaperona DnaJ*, que apresenta polimorfismos tanto na região regulatória quanto na sua sequência protéica, esta tese propôs um estudo funcional deste gene que se desenvolve no capítulo III.

6. CONCLUSÕES

A partir do sequenciamento de uma região genômica de 83,42 Kb da espécie selvagem *S. pennellii* e da análise comparativa com a região ortóloga de *S. lycopersicum*, os resultados obtidos permitiram estabelecer as seguintes conclusões:

1) A região cromossômica analisada apresenta um ordenamento genômico semelhante entre as espécies, tanto a respeito do conteúdo gênico quanto à orientação dos mesmos assim como das regiões intergênicas. A microsintenia foi interrompida unicamente pela inserção de um retrotransposon do tipo *Copia*, SHACOP_I_MT, no genoma de *S. pennellii*;

2) A identificação de genes e a sua comparação com outros segmentos cromossômicos analisados ao longo deste trabalho (Kamenetzky *et al.*, 2010) permitem concluir que se trata de uma região com densidade gênica maior à média (0,2 versus 0,1 genes/Kb); o qual está de acordo com o número de QML e YAL associados a ela, e;

3) Os dados obtidos permitiram estimar a taxa de divergência entre estas duas espécies do gênero *Solanum* em 2,9 milhões de anos que, pela abordagem adotada, representa o valor mais robusto calculado até o momento.

7. REFERÊNCIAS

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410.
- Barakat A, Choi A, Yassin NB, Park JS, Sun Z, Carlson JE. 2011. Comparative genomics and evolutionary analyses of the O-methyltransferase gene family in *Populus*. *Gene* 47, 37-46.
- Bell CD, Soltis DE, Soltis PE. 2005. The age of the angiosperms: a molecular timescale without a clock. *Evolution* 59, 1245-1258.
- Bermúdez L, Urias U, Milstein D, Kamenetzky L, Asís R, Fernie AR, Van Sluys MA, Carrari F, Rossi M. 2008. A candidate gene survey of quantitative trait loci affecting chemical composition in tomato fruit. *Journal of Experimental Botany* 59, 2875-2890.
- Bossolini E, Klahre U, Brandenburg A, Reinhardt D, Kuhlemeier C. 2011. High resolution linkage maps of the model organism *Petunia* reveal substantial synteny decay with the related genome of tomato. *Genome* 54, 327-40.
- Chen KY, Cong B, Wing R, Vrebalov J, Tanksley SD. 2007. Changes in regulation of a transcription factor lead to autogamy in cultivated tomatoes. *Science* 318, 643-645.
- Clepet C, Joobeur T, Zheng Y, Jublot D, Huang M, Truniger V, Boualem A, Hernandez-Gonzalez ME, Dolcet-Sanjuan R, Portnoy V, Mascarell-Creus A, Cano-Delgado AI, Katzir N, Bendahmane A, Giovannoni JJ, Aranda MA, Garcia-Mas J, Fei Z. 2011. Analysis of expressed sequence tags generated from full-length enriched cDNA libraries of melon. *BMC Genomics* 12, 252.
- Doebley J, Stec A, Hubbard L. 1997. The evolution of apical dominance in maize. *Nature* 386, 485-488.
- Ewing B, Green P. 1998. Basecalling of automated sequencer traces using phred II: error probabilities. *Genome Research* 8, 186-194.
- Gordon D, Abajian C, Green P. 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research* 8, 195-202.
- Guigo RET, Dermitzakis P, Agarwal CP, Ponting G, Parra G, Reymond A, Abril J, Keibler E, Lyle R, Ucla C, Antonarakis SE, Brent MR. 2003. Comparison of mouse and human genomes followed by experimental verification yields an estimated 1,019 additional genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 1140-1145.
- Heslop-Harrison, J.S. 2000. Comparative Genome Organization in Plants: From Sequence and Markers to Chromatin and Chromosomes. *The Plant Cell* 12, 617-635.
- Ilic, K, SanMiguel PJ, Bennetzen JL. 2003. A complex history of rearrangement in an orthologous region of the maize, sorghum, and rice genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 12265-12270.
- Kamenetzky L, Asís R, Bassi S, de Godoy F, Bermúdez L, Fernie AR, Van Sluys MA, Vrebalov J, Giovannoni JJ, Rossi M, Carrari F. 2010. Genomic analysis of wild tomato introgressions determining metabolism- and yield-associated traits. *Plant Physiology* 152, 1772-86.
- Katzman S, Kern AD, Bejerano G, Fewell G, Fulton L, Wilson RK, Salama SR, Haussler D. 2007. Human genome ultraconserved elements are ultraselected. *Science* 317, 5840-5915.

- Kellis M, Patterson N, Endrizzi M, Birren B, Lander ES. 2003. Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature* 423, 241-254.
- Ku HM, T Vision, J Liu and SD Tanksley. 2000. Comparing sequenced segments of the tomato and Arabidopsis genomes: large-scale duplication followed by selective gene loss creates a network of synteny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 9121-9126.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefing in Bioinformatics* 5, 50-163.
- Liu W, Huang D, Liu K, Hu S, Yu J, Gao G, Song S. 2010. Discovery, identification and comparative analysis of non-specific lipid transfer protein (nsLtp) family in Solanaceae. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 8, 229-237.
- Lu S, Van Eck J, Zhou X, Lopez AB, O'Halloran DM, Cosman KM, Conlin BJ, Paolillo DJ, Garvin DF, Vrebalov J, Kochian LV, Kupeer H, Earle ED, Cao J, Li L. 2006. The cauliflower gene encodes a dnaj cysteine-rich domain-containing protein that mediates high levels of β -Carotene accumulation. *The Plant Cell* 18, 3594-3605.
- Ma J, Bennetzen JL. 2004. Rapid recent growth and divergence of rice nuclear genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 12404-12410.
- Magallon SA, Sanderson MJ. 2005. Angiosperm divergence times: the effect of genes, codon positions, and time constraints. *Evolution* 59, 1653-1670.
- Mueller LA, Solow TH, Taylor N, Skwarecki B, Buels R, Binns J, Lin C, Wright MH, Ahrens R, Wang Y. 2005. The SOL Genomics Network: a comparative resource for Solanaceae biology and beyond. *Plant Physiology* 138, 1310-1317.
- Muse SV, Gaut BS. 1994. A likelihood approach for comparing synonymous and nonsynonymous nucleotide substitution rates, with application to the chloroplast genome. *Molecular Biology and Evolution* 11, 715-724.
- Nesbitt TC, Tanksley SD. 2002. Comparative sequencing in the genus *Lycopersicon*: implications for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated tomatoes. *Genetics* 162, 365-379.
- Quiros CF, Grellet F, Sadowski J, Suzuki T, Li G, Wroblewski T. 2001. Arabidopsis and Brassica comparative genomics: sequence, structure and gene content in the ABI-Rps2-Ck1 chromosomal segment and related regions. *Genetics* 157, 1321-1330.
- Reineke AR, Bornberg-Bauer E, Gu J. 2011. Evolutionary divergence and limits of conserved non-coding sequence detection in plant genomes. *Nucleic Acids Research* [Epub ahead of print].
- Rensink W, Lee Y, Liu J, Iobst S, Ouyang S, Buell CR. 2005. Comparative analyses of six solanaceous transcriptomes reveal a high degree of sequence conservation and species-specific transcripts. *BMC genomics* 6, 124.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496-2497.
- Salamov AA, Solovyev VV. 2000. Ab initio gene finding in Drosophila genomic DNA. *Genome Research* 10, 516-522.
- Sanchez DH, Pieckenstain FL, Szymanski J, Erban A, Bromke M, Hannah MA, Kraemer U, Kopka J, Udvardi MK. 2011. Comparative functional genomics of salt stress in related model and cultivated plants identifies and overcomes limitations to translational genomics. *Public Library of Science one* 6, e17094.

- Schauer N, Semel Y, Balbo I, Steinfath M, Repsilber D, Selbig J, Pleban T, Zamir D, Fernie AR. 2008. Mode of inheritance of primary metabolic traits in tomato. *Plant Cell* 20, 509-523.
- Schauer N, Semel Y, Roessner U, Gur A, Balbo I, Carrari F, Pleban T, Perez-Melis A, Bruedigam C, Kopka J, Willmitzer L, Zamir D, Fernie A. 2006. Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nature Biotechnology* 24, 447-454.
- Siepel A, Diekhans M, Brejov B, Langton L, Stevens M, Comstock CLG, Davis C, Ewing B, Oommen S, Lau C, Yu HC, Li J, Roe BA, Green P, Gerhard DS, Temple G, Haussler D, Brent MR. 2007. Targeted discovery of novel human exons by comparative genomics. *Genome Research* 17, 1763-1773.
- Song C, Wang Y. 2010. Microsynteny analysis of tomato and peach genome. *Yi Chuan* 32, 966-73.
- Stanke M, Steinkamp R, Waack S, Morgenstern B. 2004. AUGUSTUS: a Web server for gene finding in eukaryotes. *Nucleic Acids Research* 32, 309-312.
- Stark A, Lin M, Kheradpour P, Pedersen J, Parts L, et al. 2007. Discovery of functional elements in 12 Drosophila genomes using evolutionary signatures. *Nature* 450, 219-232.
- Thompson J, Higgins D, Gibson T. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- Urbanczyk-Wochniak E, Usadel B, Thimm O, Nunes-Nesi A, Carrari F, Davy M, Bläsing O, Kowalczyk M, Weicht D, Polinceusz A, Meyer S, Stitt M, Fernie AR. 2006. Conversion of MapMan to allow the analysis of transcript data from Solanaceous species: effects of genetic and environmental alterations in energy metabolism in the leaf. *Plant Molecular Biology* 60, 773-792.
- Wang Y, Diehl A, Wu F, Vrebalov J, Giovannoni J, Siepel A, Tanksley SD. 2008. Sequencing and comparative analysis of a conserved syntenic segment in the Solanaceae. *Genetics* 180, 391-408.
- Xiao H, Jiang N, Schaffner E, Stockinger EJ, Van der Knaap E. 2008. A retrotransposon-mediated gene duplication underlies morphological variation of tomato fruit. *Science* 319, 1527-1530.
- Zheng WX, Zhang CT. 2008. Ultraconserved elements between the genomes of the plants *Arabidopsis thaliana* and rice. *Journal of biomolecular structure & dynamics* 26, 1-8

*Capítulo III: Caracterização e
estudo funcional do gene chaperona
DnaJ*

1. INTRODUÇÃO

A introgressão de um segmento cromossômico proveniente de *S. pennellii*, no *bin* I do cromossomo 4 de *S. lycopersicum*, resultou em uma alteração massiva nos conteúdos de diversos metabólitos em fruto maduro (Schauer *et al.*, 2006, Figura 1). Uma tendência interessante foi que a maioria dos compostos que apresentaram mudanças pertencem a mesma categoria metabólica, principalmente açúcares e aminoácidos. Também foram evidenciadas alterações em vias completas como na que liga o citrato à glutamina e GABA (ácido gama-aminobutírico) e da rota de glicerato a ácidos graxos. Devido à mudança drástica no metabolismo do fruto, essa região foi definida como um QTL “de rota” por Schauer e Fernie (2006). Por outro lado, foi evidenciada uma correlação significativa entre as variações nos níveis de transcrito de alguns dos genes candidatos identificados neste *bin*, e o conteúdo de alguns dos metabólitos identificados ao longo do desenvolvimento do fruto (Figura 2).

Figura 1. Alterações no conteúdo de metabólitos no fruto da IL 4-4.

Em vermelho encontram-se identificados os metabólitos alterados significativamente. Os genes candidatos encontram-se indicados pelo marcador molecular correspondente e localizados na rota metabólica associada. (T1606) proteinase pre-pro-cisteína. (T0739) chaperona DnaJ. (T1122) RNA helicase ATP dependente DEAD-box. (cLEW-8-J19) receptor quinase CLAVATA 1. (cLET-5-D13) precursor plastidial de plastocianina. (C2_At1g20575) Dolichil-fosfato β-D-manosiltransferase. (cTOE-17-L11) subunidade da pirofosfato frutose 6-fosfato 1-fosfotransferase. (CT239) pectinesterase. (LED50) fenilalanine amônio liase. Adaptado de Bermudez *et al.* (2008).

As chaperonas são proteínas que interagem fisicamente com outros peptídeos, seja auxiliando-os a atingir a sua correta estrutura terciária, prevenindo o agrupamento destes com outras proteínas, ou alterando a sua atividade (Li e Chui, 2010). As chaperonas do tipo DnaJ constituem uma super-família gênica, encontrada tanto em organismos procariontes como eucariontes e compostas por três domínios protéicos (Kampinga e Craig, 2010; Rajan e D'Silva, 2009). O domínio J consiste em uma região de 70 aminoácidos com estrutura secundária α -hélice que interage com proteínas do tipo Hsp70 estimulando a sua atividade ATPase. O domínio G/F é uma região de 30 a 40 aminoácidos, rica em glicina e fenilalanina que confere a especificidade de interação com a proteína alvo (Miernyk, 2001). Finalmente, o domínio dedo de zinco ou DnaJ, rico em cisteína, consiste em quatro repetições do motivo CXXCXGXG. Este domínio é altamente conservado desde bactérias a humanos (Lu *et al.*, 2006) e media a interação proteína-proteína (Banecki *et al.*, 1996; Szabo *et al.*, 1996; Linke *et al.*, 2003). As chaperonas do tipo DnaJ se classificam em três grandes grupos de acordo com a combinação de domínios na sua estrutura primária (Figura 3).

Figura 3. Representação esquemática dos tipos de proteínas chaperonas DnaJ.

I. Proteínas que conservam a estrutura protéica de *E. coli* com os três domínios. II. Proteínas sem domínio de dedo de zinco. III. Proteínas só com domínio J. Modificado de Cheetman e Caplan (1998).

Em plantas, as chaperonas DnaJ têm sido identificadas em diversos compartimentos celulares: no citosol (Thomas e Baneyx, 1996), na mitocôndria (Kroczyńska *et al.*, 1996; Voos e Rotgers, 2002), no retículo endoplasmático (Nicoll *et al.*, 2006) e nos cloroplastos (Orme *et al.*, 2001). Devido a sua função em processos fundamentais como na diferenciação e funcionamento dos plastídeos, as chaperonas DnaJ que atuam nesta organela têm sido objeto de diversos estudos nos últimos anos. Em 2003, Vitha *et al.* identificaram a proteína ARC6 (*Accumulation and Replication of Chloroplasts 6*) localizada no envelope do cloroplasto e com função na divisão dos plastídeos. A proteína CYO1 (*Cotyledon-Specific Chloroplast Biogenesis Factor*), caracterizada por Shimada *et al.* (2007), encontra-se localizada nas membranas dos tilacóides e atua na diferenciação dos cloroplastos (Shimada *et al.*, 2007). Em

arabidopsis, as proteínas AtJ têm sido relacionadas com a eficiência fotossintética, dada pela estabilidade do fotossistema II e, mais ainda, análises funcionais revelaram que essas proteínas interagem com fatores de transcrição relacionados a estresse (Chen *et al.*, 2010, 2011).

Genes da superfamília DnaJ que possuem unicamente o domínio de dedos de zinco apresentaram também papel chave no metabolismo plastidial. Lu *et al.* (2006) demonstraram que o alelo mutante do gene *Or* determina a diferenciação de proplastídeos em cromoplastos, com o consequente acúmulo de carotenóides, em tecidos como a inflorescência e talos jovens em couve-flor (Figura 4). Por outro lado, em tabaco, Ham *et al.* (2006) identificaram a chaperona TSIP1 (*Tobacco Stress-Induced1-Interacting Protein*) associada à membrana do cloroplasto, a qual é recrutada pelo fator de transcrição TSI1 ativando a transcrição de genes relacionados a estresse mediado por ácido salicílico.

Figura 4. Fenótipo da *B. oleracea* mutante *Or* que apresenta acúmulo de carotenóides comparada com o fenótipo selvagem (Li *et al.*, 2006).

Desta maneira, pelas evidências discutidas, a presença do alelo selvagem do gene *chaperona DnaJ* poderia, ao menos parcialmente, explicar as mudanças fenotípicas observadas no perfil metabólico da IL 4-4 quando comparado ao de *S. lycopersicum*. Adicionalmente, o estudo do perfil transcricional deste gene realizado pelo grupo (de Godoy, comunicação pessoal) revelou diferenças nos níveis de expressão entre os alelos de *S. pennellii* e *S. lycopersicum*, em diferentes tecidos da planta (Figura 5). Com estes antecedentes, espera-se que com a caracterização e estudo funcional do gene possam ser somadas evidências que reforcem o seu envolvimento nas alterações metabólicas observadas.

Figura 5. Padrão de expressão do gene *chaperona DnaJ*.

A expressão relativa está calculada como quantidade de RNAm do gene *chaperona DnaJ*/ quantidade de RNAm do gene de referência EF1 α . * Diferença estatística $P < 0,05$.

2. OBJETIVOS

Devido ao impacto no fenótipo que possui o *bin* I do cromossomo 4, demonstrado pela presença 37 QML e 10 YAL e, havendo descrito a região genômica que compreende o gene *chaperona DnaJ* (Kamenetzy *et al.*, 2010) foi proposto realizar a caracterização e estudo funcional deste gene.

Para atingir este objetivo geral foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Analisar a estrutura gênica e realizar um estudo filogenético;
- Estudar a atividade transcricional dos promotores dos alelos de *S. pennellii* e *S. lycopersicum*;
- Estudar a localização subcelular da proteína; e
- Estudar o efeito sobre o metabolismo central de carbono do silenciamento gênico por RNA de interferência.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

As sementes de tomate de *S. lycopersicum* (cv M82 e Moneymaker) foram gentilmente cedidas pelo Tomato Genetic Resource Center (<http://tgrc.ucdavis.edu>). As sementes de *Nicotiana benthamiana* foram obtidas do Instituto de Biotecnología do INTA – Argentina. As plantas de tomate e *N. benthamiana* foram crescidas em casa de vegetação, em potes de 20 e 1 L, respectivamente, contendo terra vegetal e vermiculita (1:1). As condições da casa vegetação foram: fotoperíodo de 16/8 h, temperatura de 24 ± 3 °C, 60% umidade e fotoirradiância de $140 \pm 40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.2. Cepas bacterianas e plasmídeos

***Escherichia coli*:** foram utilizadas as cepas DH5 α , DH10 β e DB3.1. Todos os cultivos foram realizados em meio LB (meio de Luria-Bertani). A temperatura de crescimento foi de 37 °C e nos casos de cultivo líquido a agitação foi de 200 rpm. Quando as cepas bacterianas foram transformadas com um vetor plasmidial, foi adicionado o antibiótico de seleção correspondente ao meio de cultivo.

***Agrobacterium tumefaciens*:** foram utilizadas as cepas GV3101 e GV2260. GV3101 possui resistência a rifampicina (25 mg/l) e gentamicina (50 mg/l) e foi utilizada para experimentos de expressão transitória. GV2260 é resistente a rifampicina (25 mg/l) (Hoeckema *et al.*, 1983) e foi utilizada para a transformação estável. As bactérias foram cultivadas em meio LB a uma temperatura de 28 °C e nos casos de cultivo líquido a agitação foi de 200 rpm.

Plasmídeos: os vetores utilizados para os diferentes métodos experimentais estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Vetores utilizados neste trabalho.

Vetores	Resistência em bactéria	Resistência em plantas	Características	Origem
pENTR/D-TOPO	canamicina		Vetor linearizado com sítio de clonagem direcional para produtos de PCR de ponta cega. Possui os sítios <i>attL1</i> e <i>attL2</i> para recombinação sítio-específica do clone de entrada com um vetor destino no sistema Gateway®.	Invitrogen
pK7FWG2	spectinomicina streptomicina	canamicina	Vetor binário que possui o promotor <i>35s</i> , sítios <i>attR1</i> e <i>attR2</i> , para recombinação sítio-específica no sistema Gateway®, para fusão da proteína de interesse a GFP (<i>Green Fluorescent Protein</i>) e terminador <i>35s</i> .	Karimi <i>et al.</i> (2002)
pHGWF57	spectinomicina streptomicina	higromicina	Vetor binário que possui sítios <i>attR1</i> e <i>attR2</i> para recombinação sítio-específica no sistema Gateway® para região promotora putativa seguida pelos genes repórteres <i>gfp</i> (<i>green fluorescent protein</i>) e <i>gus</i> (β -glucoronidase) e terminador <i>35s</i> .	Karimi <i>et al.</i> (2002)
p7GWIWG2(I)	spectinomicina streptomicina	canamicina	Vetor binário que possui o promotor <i>35s</i> , um íntron flanqueado por sítios <i>attR1</i> e <i>attR2</i> , para recombinação sítio-específica no sistema Gateway®, e terminador <i>35s</i> . Contém um fragmento gênico em ambas as orientações separados por um íntron permitindo a formação de uma estrutura de alça.	Karimi <i>et al.</i> (2002)
pHGWF5735S	spectinomicina streptomicina	canamicina	pHGWF57 contendo o promotor <i>35S</i> .	Karimi <i>et al.</i> (2002)

3.3. Obtenção das sequências dos alelos do gene *chaperona DnaJ*, análise da estrutura gênica e filogenia

A sequência completa do alelo de *S. lycopersicum* foi obtida do clone de BAC C04HBa0331L22 (Projeto de Sequenciamento Internacional de Tomate, SGN) disponível na página da Sol Genomics Network (Mueller *et al.*, 2005, 2008, 2009). O alelo de *S. pennellii* foi clonado e sequenciado pelo nosso grupo, clone C04SpBP093E005.P4C04 (Kamenetzky *et al.*, 2010) como descrito no capítulo 2. As UTRs foram determinadas de acordo com o unigene de referência (U563083) disponível na página da SGN. A comparação das sequências foi realizada com o auxílio

do programa MULTALIN (<http://www-archbac.u-psud.fr/genomics/multalin.html>; Corpet, 1988).

Foi realizada uma busca no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e na literatura para identificar proteínas com domínio DnaJ com função experimentalmente demonstrada. Utilizando as sequências identificadas e a proteína chaperona DnaJ de tomate como referência, foram obtidas da base de proteínas não-redundantes (nr) do NCBI sequências ortólogas de *Arabidopsis* e tomate por meio do algoritmo BLASTX (Altschul *et al.*, 1990). O critério estabelecido para a escolha das sequências foi identidade de aminoácidos $\geq 40\%$ e cobertura $\geq 65\%$. Para todas as sequências protéicas foi predita a localização subcelular utilizando o programa TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>). A estrutura secundária e terciária da proteína DnaJ foi analisada utilizando o programa TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Para a construção da árvore filogenética, as sequências de aminoácidos foram alinhadas utilizando o programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). A matriz de distância foi construída utilizando o método de Neighbor-joining (Saito e Nei, 1987) com o programa MEGA (Tamura *et al.*, 2007). Os valores de *bootstrap* foram determinados a partir de 1000 réplicas.

3.4. Obtenção das construções para o estudo da atividade das regiões promotoras dos alelos de *S. lycopersicum* e *S. pennellii*

Segundo o protocolo do CIMMYT (2005), foi extraído DNA genômico da IL 4-4 e da variedade M82 para a amplificação das regiões promotoras dos alelos de *S. pennellii* e *S. lycopersicum*, respectivamente. A reação de PCR foi realizada utilizando 100 ng de DNA molde, 0,2 mM de cada dNTPs, 0,2 mM de cada iniciador [PROM-DnaJ-F (5'-CACCCGCTGATCTGCCTATGGTTAAAAG-3') e PROM-DnaJ-R (5'-GCCTTTGGATTGTGTGGGGAC-3')], 1,5 mM de Mg_2SO_4 , e 2,5 unidades de enzima TAQ polymerase® (Invitrogen, 10342-020). O ciclo de amplificação utilizado foi de 94 °C por 3 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 52 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min; e uma extensão final a 72 °C por 5 min. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o Kit GFX (Amersham Biosciences 27-9602-01), de acordo com especificações do fabricante.

Os fragmentos foram clonados no vetor de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen, K240020) e posteriormente foram recombinados utilizando a enzima LR clonase (Invitrogen 11791-020) no vetor binário de pHGWFS7 (Tabela 1). Os clones obtidos

pHGWFS7DnaJPromLyc e pKGWFS7DnaJPromPen foram analisados por restrição com endonucleases e confirmados por sequenciamento. Após confirmação da identidade dos clones, os mesmos foram incorporados em *A. tumefaciens* cepa GV3101 segundo protocolo de Wen-Jun e Forde (1989).

3.5. Obtenção da construção para estudo da localização subcelular da proteína chaperona DnaJ

Tecido de folha fonte (segundo e terceiro folíolos da terceira folha totalmente expandida) de *S. lycopersicum* (cv. M82), foi processado em nitrogênio líquido e uma alíquota de 200 mg foi submetida a extração de RNA total empregando-se o reagente Trizol (Invitrogen, 15596018), segundo o protocolo recomendado pelo fabricante. A extração foi realizada utilizando clorofórmio (0,2 V/V de TRIZOL) e o ácido nucléico precipitado com isopropanol (0,6 V/V de solução). O RNA foi ressuscitado em 20 µl de água 0,1% DEPC (livre de RNase) e a amostra estocada a -80 °C. A concentração foi avaliada por absorbância a 260 nm em espectrofotômetro. Para estimar a pureza da preparação, foi levada em consideração a relação entre as absorbâncias obtidas a 260 nm e 280 nm, sendo que as amostras com razões acima de 1,8 foram consideradas puras. Quando necessário, uma nova precipitação com 1 volume de LiCl (5M) foi realizada. Aproximadamente 1 µg de RNA foi tratado com 1 µl de DNase (Invitrogen 18068-015), e posteriormente foi realizada a síntese de cDNA utilizando a enzima SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen 18080-044), segundo instruções do fabricante. Cada reação conteve: 11 µl do RNA tratado com DNase (aproximadamente 1 µg), 1 µl de iniciadores OligoDT (Invitrogen 18418-012) (150 µg/ml) e 0,2 mM dNTPs. Após incubação a 65 °C por 5 minutos foi adicionado 1x tampão da enzima, 5 mM DTT, 40 unidades de inibidor de RNase (40 u/µl) RNaseOUT (Invitrogen 10777-019) e 200 unidades da enzima SuperScript III RT (200 u/µl). Essa reação foi incubada por 5 minutos a 25 °C, 50 °C por 1 hora e, finalmente, 70 °C por 15 min. Para testar a pureza do cDNA (livre de DNA genômico), foi realizada uma PCR usando 0,2 mM de cada dNTPs, 0,2 mM de cada iniciador ActinaUp (5'- TGGCATCATACCTTTTACAA -3') e ActinaLow (5'- TCCGGGCATCTGAACCTCT -3'), 1,5 mM de Mg₂SO₄ e 2,5 unidades de enzima TAQ polymerase® (Invitrogen, 10342-020). O ciclo de amplificação utilizado foi de 94 °C por 3 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 55 °C por 1 min, 72 °C por 2 min; e uma extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos da amplificação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 0,8% TAE 1x.

A amplificação do cDNA completo do gene foi realizada por PCR utilizando 50 ng de cDNA, 0,2 mM de cada dNTPs, 0,2 mM de cada iniciador [FUS-DnaJ-F (5'-CACCATGTTGACGGCACCTTCAC-3') e FUS-DnaJ-R (5'-ATCATCGTCCTTGAATCCCTG-3')], 1,5 mM de Mg₂SO₄ e 2 unidades de enzima Elongase® DNA polimerase (Invitrogen, 10480-010). O ciclo de amplificação utilizado foi de 94 °C por 3 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 50 °C por 30 seg, 68 °C por 2 min, e; uma extensão final a 68 °C por 10 min. O fragmento amplificado foi purificado utilizando o Kit GFX (Amersham Biosciences 27-9602-01), de acordo com especificações do fabricante e clonado no vetor de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen, K240020). Posteriormente, foi recombinado utilizando a enzima LR clonase II (Invitrogen 11791-020) no vetor binário de pK7FWG2 (Tabela 1). O clone obtido pK7FWG2DnaJLyc foi analisado por restrição com endonucleases e confirmado por sequenciamento. Após confirmação da identidade, o clone foi inserido em *A. tumefaciens* cepa GV3101 segundo protocolo de Wen-Jun e Forde (1989).

3.6. Obtenção da construção para avaliação do efeito do silenciamento gênico por RNA de interferência

DNA plasmidial do clone contendo o alelo de *S. lycopersicum* do gene *chaperona DnaJ* obtido no capítulo 1 (Bermúdez *et al.*, 2008) foi purificado segundo Sambrook *et al.* (1989). Para a amplificação do fragmento para RNAi, foram usados 10 ng de DNA molde, 0,2 mM de cada dNTPs, 0,2 mM de cada iniciador [DnaJRNAi-F (5'-CACCTTGCATGGGTACTGGCAG-3') e DnaJRNAi-R (5'-CGAGGTTGAATGCCACTGCC-3')], 1,5 mM de Mg₂SO₄ e 2,5 unidades de enzima TAQ polymerase® (Invitrogen, 10342-020). O ciclo de amplificação utilizado foi de 94 °C por 3 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 52 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min; e uma extensão final a 72 °C por 10 min.

O fragmento amplificado correspondente a 129 pb do éxon 5 foi purificado utilizando o Kit GFX (Amersham Biosciences 27-9602-01), de acordo com especificações do fabricante. O fragmento foi clonado no vetor de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen, K240020) e posteriormente recombinado utilizando a enzima LR clonase (Invitrogen 11791-020) no vetor binário de p7GWIWG2(I) (Tabela 1). O clone obtido pK7GWIWG2(I)DnaJ foi analisado por restrição com endonucleases e confirmado por sequenciamento. Após confirmação da identidade, o clone foi inserido em *A. tumefaciens* cepa GV2260 segundo protocolo de Wen-Jun e Forde (1989).

3.7. Infiltração e ensaio histoquímico de folhas de *N. benthamiana* para o estudo da atividade das regiões promotoras dos alelos de *S. lycopersicum* e *S. pennellii*

As células de *A. tumefaciens* cepa GV3101 contendo os plasmídeos pHGWFS7DnaJPromPen e pHGWFS7DnaJPromLyc foram cultivadas a 28 °C durante 16 horas em 20 ml de meio LB com rifampicina (25 µg/ml), spectinomicina (50 µg/ml) e gentamicina (50 µg/ml), até se obter uma densidade óptica (OD) a 600 nm de 0,5. Posteriormente, as células foram coletadas a 4000 rpm por 10 min a temperatura ambiente e ressuspensas em MES 10 mM com acetosiringona (100 mM). A suspensão foi incubada por quatro horas a temperatura ambiente e a infiltração foi realizada em plantas de seis semanas na superfície abaxial das folhas intermediárias com uma seringa de 1 ml sem agulha.

Três dias após a infiltração, as folhas foram retiradas e a atividade da β -glucoronidase identificada por meio de um ensaio histoquímico utilizando X-Glu (5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-glucurônido) como substrato (McCabe *et al.*, 1988). As folhas infiltradas foram incubadas em placas de Petri com um volume suficiente para cobrir o tecido com tampão de reação GUS [X-Glu (0,5 mg/ml), Na₂PO₄H₂ (100 mM), EDTA (10 mM), K₄Fe(CN)₆·3H₂O (5 mM), Triton X-100 (0,1%), pH 7]. Posteriormente, foram incubadas a 37 °C por 18 h, tempo no qual foi detectada a presença de um precipitado azul no tecido. Para a melhor visualização e fixação do tecido, foram realizadas várias lavagens com etanol 70%.

3.8. Infiltração de folhas de *N. benthamiana* para o estudo da localização subcelular da proteína chaperona DnaJ

As células de *A. tumefaciens* cepa GV3101 contendo o plasmídeo pK7FWG2-DnaJLyc foram cultivadas a 28 °C durante 16 horas em 20 ml de meio LB com rifampicina (25 µg/ml), spectinomicina (50 µg/ml) e gentamicina (50 µg/ml), até se obter uma densidade óptica (OD) de 0,5 a 600 nm. Posteriormente, as células foram coletadas a 4.000 rpm por 10 min a temperatura ambiente e ressuspensas em MES 10 mM com acetosiringona (100 mM). A suspensão foi incubada por 4 horas a temperatura ambiente e a infiltração realizada em plantas de aproximadamente seis semanas na superfície abaxial da folha com uma seringa de 1 ml sem agulha.

Após 48 h, as folhas infiltradas foram analisadas e fotografadas no microscópio de laser confocal espectral Leica TCS-SP5, usando o objetiva de 63x (HCX PL APO CS 63.0x1.20 WATER UV). A linha de 488 nm do laser de Argon foi usada para excitar as partículas de GFP e da clorofila. A emissão da fluorescência foi detectada a 525-600 nm para GFP e a 700-800 nm para a clorofila. As imagens de cada plano foram tomadas em modo sequencial para evitar o cruzamento de espectros de ambos os fluoróforos. A configuração geral do microscópio foi ajustada para otimizar o contraste e a resolução de cada imagem individualmente.

3.9. Obtenção de plantas transgênicas de tomate

3.9.1. Transformação genética

A obtenção de linhagens transgênicas de *S. lycopersicum* (cv. Moneymaker), via *Agrobacterium*, foi realizada segundo o protocolo utilizado pelo Instituto de Biotecnologia do INTA Castelar, Argentina (<http://www.inta.gov.ar/biotec/actividad/transformaciondeplantas.htm>).

A micropropagação das linhagens transgênicas selecionadas foi realizada assepticamente em fluxo laminar horizontal (Nuair, EUA) a partir de ápices de plantas cultivadas *in vitro*. Foram mantidas em tubos de vidro de 2,5 cm de diâmetro e 10 cm de altura com meio de cultura MSS (sais Murashige-Skoog com 20% sacarose), em câmaras de cultura a 22 °C, e fotoperíodo de 16 h claro (5000 lux) - 8 h escuro.

3.9.2. Verificação da presença do transgene

Para conferir a presença do transgene, DNA genômico das linhagens foi extraído segundo CIMMYT (2005) e foi realizada uma PCR usando 50 ng de DNA molde, 0,2 mM de cada dNTPs, 0,2 mM de cada iniciador [35S-right (5'-CCCACTATCCTTCGCAAG-3') e 35S-left (5'-GCAGGTCCTGGATTTTGG-3')], 1,5 mM de Mg₂SO₄ e 2,5 unidades de enzima TAQ polymerase® (Invitrogen, 10342-020). O ciclo de amplificação utilizado foi de 94 °C por 3 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 55 °C por 1 min, 72 °C por 2 min, e; uma extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos amplificados foram verificados por eletroforese em gel de agarose 0,8% TAE 1x.

3.9.3. Análise de expressão do gene *chaperona DnaJ* nas linhagens transgênicas obtidas

As linhagens crescidas *in vitro* em meio seletivo com antibiótico, para as quais foi confirmada a presença do transgene por PCR, foram levadas a casa de vegetação. Após quatro semanas, foram retiradas gemas vegetativas para sincronização das plantas com o respectivo controle. Uma vez que as plantas apresentavam oito folhas completamente expandidas, foi coletado o terceiro folíolo da quarta folha totalmente expandida para a análise do silenciamento por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR). A extração de RNA e posterior síntese de cDNA foi realizado como descrito no item 3.5. A reação de qPCR foi realizada com 1 µl de uma diluição de cDNA 1:5, 0,2 mM de cada iniciador [RNAi-trans-DnaJ-F (5'-CAGCACCTTCACTTTCCCGC-3') e RNAi-trans-DnaJ-R (5'-CGTGTTTTGATCAAGATCCACAGC-3') para o gene alvo, e EF-1α-up (5'-ATTGGAACGGATATGCTCCA-3') e EF-1α-Low (5'-TCCTTACCTGAACGCCTGTCA-3'), para o gene de referência] e 2x SYBR Green Master Mix (Qiagen, 204054). Foi utilizado um termociclador 7300 PCR Real Time (Applied Biosystems) e o ciclo de amplificação foi de 95 °C por 10 min e 40 ciclos de: 95 °C por 15 seg, 55 °C por 1 min e 72 °C por 30 seg (momento no qual ocorre a leitura do sinal emitido pelo SYBR Green). Os dados obtidos foram analisados com o software LinRegPCR (Ruijter *et al.*, 2009) para calcular os valores de Ct (*cycle threshold*) e a eficiência da reação. A expressão relativa foi calculada segundo fórmula abaixo (Pfaffl *et al.*, 2002) com o software fgStatistics (Di Rienzo, 2009). O mesmo software foi utilizado para as análises estatísticas.

$$ER = \frac{E_f^{\text{alvo}}^{\Delta (\text{média de Ct do controle} - \text{média de Ct da linhagem})}}{E_f^{\text{ref}}^{\Delta (\text{média de Ct do controle} - \text{média de Ct da linhagem})}}$$

Onde:

ER: expressão relativa

Ef: eficiência da qPCR para cada par de iniciadores

alvo: gene alvo (*DnaJ*)

Ct do controle: média dos Cts das réplicas biológicas do controle

Ct da linhagem: média dos Cts das réplicas biológicas de cada linhagem

ref: gene de referência (*EF1α*)

3.10. Caracterização fenotípica das linhagens transgênicas

3.10.1. Cultivo e parâmetros de produção

As cinco linhagens que apresentaram a maior redução dos níveis de RNAm do gene *chaperona DnaJ* foram selecionadas para caracterização fenotípica: RNAi:*DnaJ*-7, RNAi:*DnaJ*-12, RNAi:*DnaJ*-39, RNAi:*DnaJ*-40, RNAi:*DnaJ*-43. Foram estabelecidas seis

réplicas de cada linhagem por meio de propagação por estaquia, em setembro de 2010. Foram feitas duas coletas no período das 10 h às 14 h: uma após cinco semanas e outra aos quatro meses, quando todas as plantas já apresentavam frutos maduros. Na primeira foi coletado o segundo e terceiro folíolo da terceira folha totalmente expandida e na coleta final foram amostrados pericarpos de fruto verde e maduro, de 37 e 52 dias após antese, respectivamente. Foram separados, contados e pesados todos os frutos restantes e, finalmente, a parte aérea da planta foi cortada no colo da raiz e pesada como parâmetro de biomassa. Para calcular o índice de colheita foi usada a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de colheita} = (\text{peso total de frutos verdes e maduros}) * 100 / \text{peso fresco da parte aérea.}$$

3.10.2. Verificação do nível de silenciamento nas linhagens transgênicas

Uma nova verificação do nível de silenciamento do gene *chaperona DnaJ* foi realizada para as seis réplicas de cada linhagem selecionada. Foram testadas por qPCR amostras de folhas fonte e fruto maduro, segundo descrito no item 3.9.3.

3.10.3. Medição dos parâmetros fotossintéticos

As medidas de trocas gasosas e fluorescência da clorofila foram realizadas com o sistema portátil Licor-6400 (Li-Cor; www.licor.com) que consiste em um sistema aberto contendo um analisador de gases por infravermelho (IRGA) e uma câmara fluorométrica acoplada (Modelo 6400-40, Li-Cor).

As medidas foram realizadas no segundo folíolo da terceira folha totalmente expandida de plantas em estado vegetativo de quatro semanas, no período das 10 h às 14 h. Antes de realizar as medições, as folhas a serem analisadas passaram por um processo de adaptação à escuridão durante no mínimo 30 min. Foram realizadas curvas de resposta à luz com uma câmara que possui uma área de exposição foliar de 2 cm², as condições padrão para as medições foram de 400 PPM de CO₂ e temperatura foliar de 25 °C.

Os parâmetros fotossintéticos foram determinados segundo Maxwell e Johnson (2000). Foram calculadas as fluorescências mínimas de folhas adaptadas à escuridão (F₀) e adaptadas à luz (F₀'). Após um pulso de luz saturante branca (3.000 µmoles E m⁻² s⁻¹) foi determinada a fluorescência máxima da clorofila nas folhas adaptadas ao escuro (F_m) e à luz (F_m'). A fluorescência variável foi determinada pelo cálculo de F_v=F_m-F₀ em folhas adaptadas à escuridão, ou F_v'=F_m'-F₀' em folhas adaptadas à luz variando a densidade de fluxo de fótons (PFD) entre 200 e 1200 µmoles E m⁻² s⁻¹. A

relação entre a eficiência variável e a eficiência máxima F_v/F_m , a eficiência do fotossistema II $(F_m' - F_s)/F_m'$, o *quenching* fotoquímico $qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_0')$, o *quenching* não-fotoquímico $NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$ e a acumulação de quinonas reduzidas $1-pQ = (F_s - F_0')/(F_m' - F_0')$ também foram calculados. Finalmente, foi avaliada a taxa de transferência de elétrons:

$$ETR = [(F_m' - F_s) / F_m'] * f I a_{folha}$$

onde F_s é o estado estável de fluorescência, f é a fração de *quanta* absorvido que é usado pelo fotossistema II o qual se assume ser de 0,5 para plantas C3, I é a densidade de fluxo de fótons incidente e a_{folha} é a absorbância da folha que se assume ser 0,85 (Sienkiewicz-Porzupek *et al.*, 2010).

3.10.4. Extração e quantificação de pigmentos

Para a quantificação de pigmentos, foram coletados um disco foliar de área $0,38 \text{ cm}^2$ do segundo folíolo da terceira folha totalmente expandida, 400 mg de pericarpo de fruto verde e 400 mg de pericarpo de fruto maduro para cada uma das réplicas das cinco linhagens transgênicas selecionadas, na coleta final. As amostras foram trituradas em nitrogênio líquido.

A extração de pigmentos para o tecido foliar e fruto verde foi realizada como descrito por Lichtenthaler (1987). As amostras foram maceradas em um tubo contendo 1 ml de acetona 80% (V/V) por 2 horas em escuridão até observar a descoloração total do material e, posteriormente, centrifugadas por 10 min a 10.000 rpm. A absorbância do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro a 663, 645 e 470 nm. Baseada nas absorbâncias obtidas foi calculada a concentração dos pigmentos pelas equações a seguir e o conteúdo total foi normalizado pela massa (fruto verde) ou área (folha fonte) de tecido.

Clorofila a = $12,25 * \text{Abs } 663 - 2,79 * \text{Abs } 645$

Clorofila b = $21,50 * \text{Abs } 645 - 5,10 * \text{Abs } 663$

Carotenóides totais = $(1000 * \text{Abs } 470 - 1,82 * \text{Clorofila a} - 85,02 * \text{Clorofila b})/198$

Para a quantificação dos pigmentos de fruto maduro foi utilizado o protocolo descrito por Heredia *et al.* (2009). 400 mg de tecido foram macerados em 4 ml de etanol absoluto e 3 ml de hexano (99%) por 1 h no escuro com agitação de 150 rpm. Posteriormente, foi acrescentado 1 ml de água MilliQ deionizada para permitir a separação das duas fases. A absorbância de 500 μl da fase superior (hexano) foi lida

em espectrofotômetro a 503 e 478 nm. Baseada nas absorbâncias obtidas foi calculada a concentração dos pigmentos pelas equações a seguir e o conteúdo total foi normalizado pela massa de tecido.

$$\frac{\text{mg } \beta\text{-caroteno}}{100 \text{ g}} = \frac{[A_{478} - (A_{503} * 0,9285)] * M_{\beta\text{-car}} * V * 100}{m * E_{\beta\text{-car}}}$$

$$\frac{\text{mg licopeno}}{100 \text{ g}} = \frac{A_{503} * M_{\text{LIC}} * V * 100}{m * E_{\text{LIC}}}$$

onde A é a absorbância; M_{LIC} e $M_{\beta\text{-car}}$ são os pesos moleculares do licopeno (537 g/mol) e β -caroteno (533,85 g/mol), respectivamente; V é o volume da fase de hexano na extração (3 ml); m é a massa da amostra analisada, e; E_{LIC} e $E_{\beta\text{-car}}$ são os coeficientes de extinção do licopeno ($172\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e do β -caroteno ($139\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), respectivamente (Zscheille e Porter, 1947).

3.10.5. Extração e quantificação de aminoácidos, açúcares solúveis e amido

As extrações de açúcares solúveis, aminoácidos totais e amido para folhas fonte e frutos maduros foram realizados usando protocolos estabelecidos pelo nosso grupo (Ferne *et al.*, 2001).

Extração

Foram adicionados 250 μl de etanol 80% a 10 mg de tecido triturado, seguido de agitação por 20 min a 80 °C. Após centrifugação por 5 min a 14.000 rpm, o sobrenadante foi recuperado e o *pellet* submetido a duas novas extrações, com 150 μl de etanol 80% e 250 μl de etanol 50%, respectivamente. Os três sobrenadantes foram reunidos para posterior quantificação de açúcares e aminoácidos.

Ao *pellet* obtido foram adicionados 500 μl de etanol 40% e centrifugado por 10 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 400 μl de KOH 0,2 M. A suspensão foi incubada durante 1 h a 95 °C e, posteriormente, foram adicionados 70 μl de ácido acético 1 M seguido de uma centrifugação por 10 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi recuperado, e as amostras diluídas 1:3.

Determinação de açúcares

Para uma placa de 96 poços foi preparada uma mistura com 15,5 ml de tampão (HEPES/KOH 1 M, MgCl_2 30 mM pH 7,0) 0,1x, 480 μl de ATP [60 mg/ml], 480 μl de

NADP [36 mg/ml] e 80 µl de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) [5 mg/ml]. Em cada poço, foram adicionados 50 µl do extrato etanólico e 160 µl da mistura descrita anteriormente. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 340 nm com medições a cada minuto. Uma vez que a OD se estabilizou foram adicionadas sucessivamente 1 µl de hexoquinase [1500 U/ml], 1 µl de fosfoglicose isomerase [2 mg/ml] e finalmente 1 µl de invertase 0,1 M. Para fazer os cálculos da concentração dos respectivos açúcares, foi usada a seguinte equação:

$$\mu\text{mol NADPH} = \Delta \text{OD} / (2.85 * 6.22)$$

Os valores foram normalizados pelo volume utilizado na medição e a massa de tecido.

Determinação de aminoácidos

Em um tubo de 1,5 ml foram adicionados 50 µl de tampão citrato/NaOH 1 M pH 5,2 com ácido ascórbico 0,2%, 50 µl de extrato etanólico, obtido como descrito anteriormente e 100 µl de solução de ninhidrina 1% (P/V em etanol 70%). Os tubos foram selados e incubados por 20 min a 95 °C, centrifugados por 10 seg a 10.000 rpm e finalmente as amostras foram dispostas em placa de 96 poços e lidas em espectrofotômetro a 570 nm.

Para realizar a estimativa do conteúdo total de aminoácidos, foi realizada uma curva padrão de Leucina substituindo os 50 µl da amostra por 0-2-5-10-20-50 µl de padrão de leucina completado com 50-48-45-40-30-0 µl de etanol 70%, respectivamente. Os valores foram normalizados pelo volume utilizado na medição e a massa de tecido.

Determinação de amido

A determinação enzimática foi realizada com o kit Starch (GO/P) Assay da empresa SIGMA (STA20), segundo instruções do fabricante. A produção de NADH foi medida em espectrofotômetro a 340 nm. Foi realizada uma curva padrão com glicose e o cálculo do conteúdo de amido foi realizado segundo a seguinte fórmula:

$$\mu\text{g/g peso fresco de amido} = \mu\text{mol de glicose} * 162 \text{ (massa da anidroglicose)}$$

Os valores foram normalizados pelo volume utilizado na medição e a massa de tecido.

3.10.6. Análise estatística

Os diferentes parâmetros analisados nas linhagens transgênicas foram avaliados estatisticamente de acordo com Sokal e Rohlf (1981). Quando o conjunto de dados obedeceu ao critério de homoscedasticidade, com ou sem transformação logarítmica ou de raiz quadrada, os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Duncan e/ou Tukey ($P < 0,05$) para comparação dos parâmetros entre as linhagens transgênicas silenciadas e o controle. Na falta de homoscedasticidade, uma comparação não-paramétrica foi feita por meio do teste Kruskal Wallis ($P < 0,05$ e $0,1$). Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa InfoStat v. 2009 (www.infostat.com, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

4. RESULTADOS

4.1. A proteína chaperona DnaJ agrupa em um clado diferente das chaperonas previamente descritas

A partir da sequência do BAC de *S. pennellii* (C04SpBP093E005.P4C04), descrita no capítulo II, e do clone ortólogo de *S. lycopersicum* (C04HBa0331L22) foram obtidas as sequências completas de ambos os alelos do gene *chaperona DnaJ*. As regiões intergênicas amontante do sítio de início da transcrição, até o começo do cDNA do gene vizinho, foram consideradas como as respectivas regiões promotoras. As regiões transcritas apresentaram um tamanho de 3.019 e 3.063 nt para *S. lycopersicum* e *S. pennellii*, respectivamente. A estrutura gênica dos alelos foi similar variando apenas no tamanho dos íntrons e pela presença de um intron adicional na região 3' não-traduzida de *S. pennellii* (Figura 6). Para ambas as sequências foi identificado o domínio DnaJ, contendo os motivos ricos em cisteínas (CXXCXGXG), característico desta família protéica. Adicionalmente, foram preditos peptídeos de direcionamento ao cloroplasto, sendo que o do alelo de *S. lycopersicum* apresentou 65 aa e o de *S. pennellii* 47 aa. Finalmente, uma análise da estrutura protéica *in silico* permitiu identificar um domínio transmembrana entre os aminoácidos 54 e 76 para ambos os alelos, sendo que o domínio de interação proteína-proteína (DnaJ) ficaria exposto no citoplasma. Ao todo foram detectados dois polimorfismos de aminoácidos ambos sobre o peptídeo sinal (Figura 7).

Figura 6. Análise comparativa da estrutura gênica entre os alelos de *S. lycopersicum* e *S. pennellii* para o gene *chaperona DnaJ*.

E: éxon, I: íntron, UTR: região transcrita não-traduzida. As setas verdes e vermelhas indicam os códons de início e fim da tradução, respectivamente. A porcentagem de identidade e *indels* (XX) entre ambos os genótipos encontra-se indicada para cada região individualmente.

Figura 7. Análise comparativa da sequência proteica entre os alelos de *S. lycopersicum* e *S. pennellii* para a proteína chaperona DnaJ.

Os polimorfismos de aminoácidos entre os genótipos encontram-se indicados com linhas vermelhas. Os peptídeos de direcionamento a cloroplasto estão indicados com uma linha vermelha e verde para *S. lycopersicum* e *S. pennellii*, respectivamente. Os domínios protéicos identificados estão demarcados com blocos cinza.

Para ganhar evidências sobre a função da chaperona DnaJ de tomate foi analisada a sua sequência proteica no contexto das chaperonas funcionalmente caracterizadas em plantas por meio de uma análise filogenética. A topologia da árvore permitiu identificar quatro clados, os quais podem ser diferenciados claramente segundo a sua estrutura proteica. As proteínas de *S. lycopersicum* e *S. pennellii* estudadas neste trabalho agrupam junto à ortóloga de arábida e possuem o domínio transmembrana que as diferencia das descritas por Lu *et al.* (2006) e Ham *et al.* (2006) (Figura 8).

Figura 8. Análise da diversidade das chaperonas DnaJ.

Os quatro clados estão marcados em verde, laranja, cinza e azul. Na direita da árvore estão indicadas as estruturas proteicas de cada clado, assim como as funções demonstradas para cada grupo. Os genes envolvidos na determinação da eficiência fotossintética foram descritos por Chen *et al.* (2010). As sequências relacionadas ao processamento de proteínas foram caracterizadas funcionalmente por Kroczyńska *et al.* (1996). As sequências associadas à diferenciação de plastídeos e regulação da expressão gênica foram relatadas por Lu *et al.* (2006) e Ham *et al.* (2006), respectivamente. As sequências descritas neste trabalho estão ressaltadas em negrito.

4.2. Os promotores dos alelos selvagem e cultivado apresentam atividade transcricional diferencial

Para avaliar a atividade transcricional dos promotores dos alelos de *S. pennellii* e *S. lycopersicum* do gene *chaperona DnaJ* foram obtidas construções fusionando os respectivos promotores às regiões codificantes dos genes repórteres *gfp* (*green fluorescent protein*) e *gus* (β -glucuronidase). Folhas de *N. benthamiana* foram infiltradas com cultivos de *A. tumefaciens* contendo as construções pHGWFS7DnaJPromLyc (promotor de *S. lycopersicum*::*gus*), pHGWFS7DnaJPromPen (promotor de *S. pennellii*::*gus*), pHGWFS735s (controle positivo com promotor 35S::*gus*) e pHGWFS7 (controle negativo sem promotor) de acordo à distribuição apresentada na Figura 9. Três dias após a infiltração, foi realizado o ensaio histoquímico para detecção da atividade da proteína repórter GUS. A Figura 9 apresenta uma folha representativa do experimento, confirmando que o fragmento clonado de *S. lycopersicum* corresponde ao promotor do gene, e apresenta maior atividade transcricional que o promotor de *S. pennellii*, o qual apresentou um nível de atividade não detectável pela metodologia aplicada.

Figura 9. Estudo da atividade dos promotores por meio de ensaios de expressão transitória em folhas de *N. benthamiana*.

O precipitado azul revela a presença de atividade da proteína GUS. pHGWFS7DnaJPromLyc: promotor de *S. lycopersicum* fusionado a *gus*. pHGWFS7DnaJPromPen: promotor de *S. pennellii* fusionado a *gus*. pHGWFS735S: controle positivo com promotor 35S fusionado a *gus*. pHGWFS7: controle negativo sem promotor. LB: borda esquerda. Higro: cassete de resistência a higromicina. p35S: promotor 35S do CaMV. Egfp: *green fluorescent protein*. Gus: β -glucuronidase. T35S: terminador 35S do CaMV. RB: borda direita.

4.3. A proteína DnaJ é direcionada a cloroplasto

Para somar evidências sobre a função da chaperona DnaJ foi desenhado um experimento de localização com o intuito de identificar o compartimento celular onde essa proteína atua. Para isso, foi obtida a construção pK7FWG2DnaJLyc contendo o cDNA completo do gene *chaperona DnaJ* de 480 pb, de *S. lycopersicum*, abrangendo desde o ATG até o códon anterior ao de fim da tradução, fusionado à sequência codificante da proteína GFP. Um cultivo de *A. tumefaciens* contendo a construção supramencionada foi infiltrado em folhas de *N. benthamiana*. Após 48 h, foram montadas lâminas com discos de folhas infiltradas e visualizadas ao microscópio confocal. A proteína de fusão foi localizada no cloroplasto das células, evidenciada pela sobreposição da emissão da proteína GFP e da clorofila (Figura 10).

Figura 10. Localização subcelular da proteína de fusão chaperona DnaJ::GFP.

Esquema da construção pK7FWG2-DnaJLyc (A). Células de mesófilo de folhas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com *A. tumefaciens* (GV3101) contendo a construção pK7FWG2DnaJLyc (B, C, D). Sobreposição das imagens de fluorescência da clorofila e GFP (B). Imagem da fluorescência da clorofila (C). Imagem da fluorescência de GFP (D). A barra da escala corresponde a 10 µm. LB: borda esquerda. Kan: cassete de resistência a canamicina. T35s terminador 35S: do CaMV. eGFP: *green fluorescent protein*. cDNA completo: cDNA do alelo de *S. lycopersicum*. p35S: promotor 35s do CaMV. RB: borda direita.

4.4. Obtenção das plantas silenciadas para o gene *chaperona DnaJ*

Para demonstrar o envolvimento do gene *chaperona DnaJ* na determinação das diferenças observadas entre *S. lycopersicum* (cv. M82) e a IL 4-4 no conteúdo de metabólitos dos frutos, foi adotada a estratégia de silenciamento gênico por RNA de interferência. Desta forma, foi obtida a construção pK7GWIWG2(I)DnaJ contendo um fragmento de 129 pb do quarto éxon do gene (Figura 11). A escolha desse fragmento foi determinada a partir do alinhamento utilizado para a análise filogenética, realizada

no item 4.1 deste capítulo, de maneira que o silenciamento fosse específico para o gene de interesse evitando interferir na expressão de outros genes parálogos. Por meio da transformação genética mediada por *A. tumefaciens*, foram obtidas 36 linhagens independentes de tomate que enraizaram em presença do agente seletivo.

Figura 11. Representação esquemática do vetor pK7GWIWG2(I)DnaJ.

Construção utilizada para a obtenção das plantas transgênicas de tomate *S. lycopersicum* (cv. Moneymaker) RNAi:DnaJ. LB: borda esquerda. Kan: cassete de resistência a canamicina. T: terminador 35s do CaMV. 129b: fragmento da sequência codificante do gene *chaperona DnaJ*. p35s: promotor 35s do CaMV. RB: borda direita.

A presença do transgene nas linhagens obtidas foi verificada por meio de PCR utilizando iniciadores específicos para o promotor 35S. Dessa forma, foram identificados seis escapes e determinada uma eficiência de transformação de 75% (Tabela 2). Posteriormente, 15 das linhagens positivas foram sincronizadas por meio de estaquia junto aos respectivos controles, e foi avaliado o silenciamento do gene alvo utilizando qPCR. A Figura 12 apresenta os dados de expressão relativa do gene *chaperona DnaJ* demonstrando que 13 das linhagens transgênicas possuem níveis de RNAm mais baixos que o controle selvagem, resultando em uma eficiência de silenciamento de 86,6% (Tabela 2).

Tabela 2. Eficiência da transformação de tomate com a construção para silenciamento do gene *chaperona DnaJ*.

Gene	Linhagens regeneradas	Linhagens positivas por PCR	Eficiência de transformação %	Linhagens avaliadas por qPCR	Linhagens silenciadas	% Plantas silenciadas
Chaperona DnaJ	36	27	75	14	13	92,8

Figura 12. Análise de expressão do gene *chaperona DnaJ* nas linhagens transgênicas.

Os resultados representam a média de três réplicas técnicas. Os valores estão expressos como a abundância relativa do RNAm comparado ao controle *S. lycopersicum* (cv. Moneymaker). Na caixa preta destacam-se as linhagens selecionadas para avaliação fenotípica. *Diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,005$).

4.5. Caracterização fenotípica das linhagens transgênicas

Para a avaliação fenotípica, foram selecionadas as cinco linhagens (RNAi:*DnaJ*-7, RNAi:*DnaJ*-12, RNAi:*DnaJ*-39, RNAi:*DnaJ*-40, RNAi:*DnaJ*-43) que apresentaram a maior redução dos níveis de RNAm do gene *chaperona DnaJ* (Figura 12). As plantas escolhidas foram propagadas vegetativamente por meio de estaquia gerando seis réplicas para caracterização fenotípica.

4.5.1. Verificação do nível de silenciamento nas linhagens transgênicas

Com o intuito de confirmar o silenciamento nas réplicas biológicas, os níveis de RNAm do gene *chaperona DnaJ* foram novamente verificados em folhas e frutos por qPCR. De forma geral, os dados de expressão relativa confirmaram o silenciamento previamente observado para ambos os tecidos (Figura 13). No caso da linhagem RNAi:*DnaJ*-40 a redução não foi significativa, mas devido à verificação de outras alterações fenotípicas, esta linhagem não foi descartada.

Figura 13. Análise de expressão do gene *chaperona DnaJ* nas linhagens transgênicas selecionadas.

Os resultados representam a média de seis réplicas biológicas com três réplicas técnicas cada. Os valores estão expressos como a abundância relativa do RNAm comparado ao controle *S. lycopersicum* (cv. Moneymaker). *Diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,005$).

4.5.2. O silenciamento do gene *chaperona DnaJ* não impacta os parâmetros fotossintéticos

Para avaliar o possível efeito do silenciamento do gene *chaperona DnaJ* na fotossíntese foram realizadas medições de intercâmbio gasoso e fluorescência da clorofila a diferentes densidades de fluxo de fótons. Embora tenha sido observada uma tendência de maior taxa de assimilação de CO_2 para as linhagens RNAi:DnaJ-7, RNAi:DnaJ-12, RNAi:DnaJ-39, as diferenças não apresentaram significância estatística (Figura 14). O mesmo padrão foi observado para a condutância estomática e consequentemente para a transpiração. Pelo contrário, não foram observadas alterações em nenhum dos parâmetros avaliados da fluorescência de clorofila (Tabela 3).

Figura 14. Taxa de assimilação de CO₂ nas linhagens transgênicas.

Os valores apresentam a média obtida entre seis réplicas biológicas. Não foram encontradas diferenças significativas ($P < 0,05$). PFD: Densidade de fluxo de fótons.

Tabela 3. Parâmetros fotossintéticos e de trocas gasosas nas linhagens transgênicas.

	Condutância estomática ¹	Transpiração ²	ETR ³	Quenching fotoquímico	Quenching não fotoquímico	1-pQ ⁴	Eficiência do fotossistema II
RNAi:DnaJ-7	0,09 ± 0,02	2,36 ± 0,41	156,37 ± 7,17	0,6 ± 0,03	1,48 ± 0,14	0,4 ± 0,03	0,3 ± 0,01
RNAi:DnaJ-12	0,12 ± 0,01	2,46 ± 0,41	164,29 ± 7,17	0,6 ± 0,03	1,2 ± 0,14	0,4 ± 0,03	0,32 ± 0,01
RNAi:DnaJ-39	0,07 ± 0,01	1,83 ± 0,38	118,91 ± 6,42	0,5 ± 0,02	1,54 ± 0,13	0,5 ± 0,02	0,23 ± 0,01
RNAi:DnaJ-40	0,07 ± 0,02	1,9 ± 0,41	126,77 ± 6,42	0,52 ± 0,02	1,73 ± 0,13	0,48 ± 0,02	0,25 ± 0,01
RNAi:DnaJ-43	0,05 ± 0,01	1,64 ± 0,41	122,66 ± 7,17	0,48 ± 0,03	1,68 ± 0,14	0,52 ± 0,03	0,23 ± 0,01
Controle	0,06 ± 0,01	1,7 ± 0,35	148,72 ± 6,42	0,57 ± 0,02	1,47 ± 0,13	0,43 ± 0,02	0,29 ± 0,01

1. (mol/m²/s)

2. (mmol/m²/s)

3. Taxa relativa de transporte de elétrons.

4. Acumulação de quinonas reduzidas.

Valores medidos a uma densidade de fluxo de fótons de 1200 μmol m⁻²s⁻¹. Não foram encontradas diferenças significativas ($P < 0,05$).

4.5.3. O silenciamento do gene chaperona DnaJ altera os conteúdos de clorofilas e carotenóides em tecidos verdes

A quantificação dos pigmentos revelou, de forma geral, que todas as linhagens transgênicas apresentaram um aumento significativo no conteúdo de pigmentos fotossintéticos em ambos tecidos verdes avaliados: folhas fonte e frutos verdes (Figura 15). Já no fruto maduro não houve alteração no conteúdo de licopeno e β-caroteno.

Figura 15. Conteúdo de pigmentos nos diferentes tecidos nas linhagens transgênicas.

As barras indicam a média obtida em no mínimo três ou quatro réplicas biológicas para frutos e folha fonte, respectivamente. *Diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$). PF: peso fresco.

4.5.4. O silenciamento do gene *chaperona DnaJ* altera o conteúdo de açúcares e amido

A determinação do conteúdo de açúcares solúveis e amido, demonstrou que o metabolismo de carbono das linhagens silenciadas para o gene *chaperona DnaJ* foi alterado dramaticamente. Enquanto na folha fonte há uma queda tanto de hexoses e sacarose, quanto de reservas na forma de amido, no tecido dreno há um acúmulo deste último polímero (Figura 16).

Figura 16. Conteúdo de açúcares e amido nas linhagens transgênicas.

As barras indicam a média obtida em no mínimo três ou cinco réplicas biológicas para fruto maduro e folha fonte, respectivamente. *Diferenças estatisticamente significativas ($P<0,05$). PF: Peso fresco.

4.5.5. O silenciamento do gene *chaperona DnaJ* não altera o conteúdo de aminoácidos totais

Com o intuito de avaliar o efeito do silenciamento do gene no metabolismo de aminoácidos, foram feitas quantificações para os tecidos de folha fonte e fruto maduro. Como pode ser observado na Figura 17 não foi possível detectar, pela técnica utilizada, nenhum padrão determinado no conteúdo de aminoácidos totais para as linhagens transgênicas.

Figura 17. Conteúdo de aminoácidos totais nas linhagens transgênicas.

As barras indicam a média obtida em no mínimo três ou cinco réplicas biológicas para fruto maduro e folha fonte, respectivamente. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($P<0,05$).

4.5.6. O silenciamento do gene *DnaJ* não altera os indicadores de produção das linhagens transgênicas

Para corroborar se o silenciamento do gene *chaperona DnaJ* impacta os parâmetros de produção, foi medido o peso médio de frutos verdes e maduros, a biomassa fresca da planta e o índice de colheita. Para nenhum dos parâmetros foram encontradas diferenças significativas (Tabela 4). Estes resultados indicam que as alterações observadas no metabolismo de hidratos de carbono não afetam a produção da planta.

Tabela 4. Indicadores de produção das linhagens transgênicas.

Linhagem	FRUTO VERDE (g/fruto)	FRUTO MADURO (g/fruto)	BIOMASSA (g/planta sem raiz)	ÍNDICE DE COLHEITA
RNAi:DnaJ -7	14,56 ± 4,77	41,98 ± 2,76	892 ± 83,38	36,15 ± 10,28
RNAi:DnaJ -12	22,48 ± 4,35	34,24 ± 2,52	968,17 ± 76,11	40,06 ± 9,38
RNAi:DnaJ -39	17,37 ± 4,35	35,66 ± 2,52	873,17 ± 76,11	35,7 ± 9,38
RNAi:DnaJ -40	18,83 ± 5,33	30,3 ± 3,09	1095,75 ± 93,22	25,98 ± 11,49
RNAi:DnaJ -43	20,75 ± 4,35	30,88 ± 2,52	793 ± 76,11	54,98 ± 9,38
Controle	20,63 ± 3,33	38,28 ± 1,60	843,38 ± 97,49	42,1 ± 11,55

Dados correspondentes à colheita das plantas após quatro meses. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

As proteínas de *S. lycopersicum* e *S. pennellii* estudadas neste trabalho possuem domínio DnaJ e peptídeo sinal para cloroplasto. Chaperonas com essa mesma estrutura foram descritas por Lu *et al.* (2006) e por Ham *et al.* (2006) como proteínas que atuam na diferenciação de plastídeos e reguladoras da expressão gênica, respectivamente. Porém, *S. lycopersicum* DnaJ e *S. pennellii* DnaJ apresentam um domínio transmembrana que ancoraria essas proteínas no envelope plastídial deixando o domínio de interação proteína-proteína voltado para o citoplasma (Figura 7). A presença desse domínio diferencial permite o agrupamento dessas sequências de tomate em um clado separado, juntamente com o gene ortólogo de arábidoide identificado, reforçando a provável diferenciação funcional dessas proteínas em relação as demais chaperonas descritas (Figura 8). A caracterização estrutural *in silico* foi em parte confirmada pelo experimento de direcionamento subcelular, demonstrando que *S. lycopersicum* DnaJ se encontra de fato localizada no cloroplasto (Figura 10). Assim, a localização demonstrada experimentalmente sugere a participação desta proteína no controle do metabolismo plastídial, o qual está de acordo com as alterações nos conteúdos de aminoácidos, açúcares solúveis e ácidos orgânicos observadas por Schauer *et al.* (2006) na IL 4-4 que levaram à identificação dos QTL mapeados no *bin 4I* (Figura 1).

É oportuno mencionar que os alelos apresentaram duas substituições não-sinônimas que determinam a alteração do tamanho do peptídeo sinal. Enquanto a sequência de direcionamento na proteína selvagem é menor, na espécie cultivada, ela se sobrepõe ao domínio transmembrana. Desta forma, é possível levantar três hipóteses: *i)* o polimorfismo de aminoácidos não altera a distribuição subcelular das proteínas, *ii)* a proteína selvagem é menos eficientemente direcionada à membrana plastídial e *iii)* a excisão do peptídeo sinal da proteína do alelo cultivado compromete o ancoramento da mesma. Nesses dois últimos casos, haveria menos proteína ativa no cloroplasto. Para esclarecer este ponto, já está em andamento o estudo da localização subcelular do alelo de *S. pennellii*.

Um estudo do perfil transcricional *S. lycopersicum* DnaJ e *S. pennellii* DnaJ realizado pelo nosso grupo revelou que há expressão em folhas fonte e dreno, caule, flor e frutos verdes e maduros, sendo que apenas níveis mínimos de expressão foram observados em caule e frutos, verdes e maduros. Comparativamente, o alelo cultivado possui maior expressão em folhas fonte que o selvagem (de Godoy *et al.*, comunicação

peçoal). Os resultados da análise funcional de ambos os promotores permitem concluir que a diferença nos níveis de expressão é ocasionada pela maior atividade transcricional do alelo de *S. lycopersicum*, não podendo descartar, de qualquer maneira, a participação de algum outro mecanismo de regulação transcricional ou pós-transcricional (Figura 9).

Para avaliar o envolvimento da chaperona DnaJ no metabolismo plastidial foi adotada a estratégia de silenciamento estável por RNAi. Foram obtidas plantas transgênicas de tomate expressando uma molécula dupla fita de RNA correspondente a um fragmento da região codificante do gene, das quais foram selecionadas cinco linhagens que apresentaram uma redução aproximada de 80% nos níveis de RNAm em folhas. Já em frutos foram observados níveis de silenciamento menores, provavelmente pelo baixo nível de expressão nesse tecido.

As folhas fonte das linhagens silenciadas apresentam uma queda no conteúdo de açúcares solúveis e no acúmulo de amido. De alguma maneira, esses carboidratos são desviados para o fruto onde se evidencia maior nível desse polímero sem alteração no conteúdo de hexoses (Figura 16). Por outro lado, as plantas apresentam um discreto aumento na taxa de assimilação de CO₂ coincidente com a condutância estomática e a transpiração (Tabela 3).

Uma análise conjunta da estrutura e localização protéica, análise de expressão e efeito fenotípico das transgênicas nos permite propor que o silenciamento da chaperona DnaJ mimetize em parte o alelo selvagem e, desta maneira, a hipótese da menor eficiência de ancoramento da proteína de *S. lycopersicum* seria descartada.

As folhas fonte mantêm altas taxas de fotossíntese em diversas condições fisiológicas que não dependem exclusivamente da coordenação entre as reações que acontecem nos tilacóides e no estroma, mas também, do intercâmbio de metabólitos com o citoplasma e organelas, assim como da necessidade de outros órgãos (Paul e Foyer, 2001). Desta maneira, diversos mecanismos garantem a manutenção do estado redox (para evitar a saturação da cadeia de transporte de elétrons), da relação ATP/ADP e do potencial redutor (NADPH, NADH e ferredoxina). No entanto, mudanças nas demandas metabólicas, sejam por alterações ambientais ou da relação fonte-dreno, podem levar os mecanismos homeostáticos ao seu limite. Por este motivo, os níveis de adenilato e o estado redox são permanentemente controlados. Embora alguns trabalhos apontem a existência de um mecanismo de percepção de ATP em condições de estresse ambiental, só recentemente foram realizados estudos que apresentam evidências de um sistema de transdução de sinal via adenilatos

(Geigenberger *et al.*, 2010). Em contrapartida, a regulação da fotossíntese por *feedback* exercida pelo estado redox e pelas trioses fosfato (triosesP) é bem conhecida em plantas (Smith e Stitt, 2007). A taxa de utilização dos produtos finais da fotossíntese (sacarose, aminoácidos e amido) determina a taxa de reciclagem do fosfato inorgânico (Pi), de forma que qualquer condição que restrinja o uso de triosesP poderia limitar a fotossíntese. Nesta linha de pensamento, tem sido demonstrado que altas taxas de fosfogliceraldeído 3-fosfato/Pi, 3-PGA/Pi, ativam a ADP-glicose pirofosforilase (AGPase) e, conseqüentemente, a síntese de amido (Preiss, 1988; Preiss e Romeo, 1994). Nestas condições, a sacarose fosfato sintase (SPS) é inativada por fosforilação pela ação das quinases relacionadas à sacarose não-fermentativa, (SnRKs), aumentando os níveis de frutose 2,6-bifosfato (F26BP) que, por sua vez, como demonstrado em fumo, reduz o fluxo de açúcares solúveis aumentando ainda mais o acúmulo de amido em folhas (Scott *et al.*, 1995).

Frente aos resultados obtidos, propõe-se que a chaperona DnaJ medeia a percepção do balanço triosesP/Pi e a ativação/inativação da SPS, participando assim, na regulação da relação fonte-dreno. Na sua presença, ocorreria a inibição da fotossíntese pelo acúmulo de amido como conseqüência da queda na produção de sacarose para exportação e ativação da AGPase. Silenciando a chaperona, a SPS não seria inibida aumentando assim o consumo de triosasP para a produção de sacarose a qual seria exportada ao fruto. Assim, não haveria acúmulo de amido na folha nem queda na atividade fotossintética, justificando também a tendência no aumento de trocas gasosas garantindo o suprimento de carbono. Já nos frutos a sacarose seria degradada pela invertase de parede (Fridman *et al.*, 2004) ou pela sacarose sintase (SuSy) e as hexoses incorporadas seriam desviadas para o acúmulo de amido (Figura 18) (Wang *et al.*, 1993; D'Aoust *et al.*, 1999).

Para corroborar essa hipótese, a quantificação dos níveis de expressão e atividade de algumas das enzimas chave do metabolismo de açúcares, como a SPS, SuSy e a AGPase, nas linhagens silenciadas seria muito esclarecedor.

Recentemente, Centeno *et al.* (2011) reportaram que o silenciamento da fumarase em frutos de tomate leva à diminuição no conteúdo de malato que altera o estado redox mitocondrial. Esta alteração é transmitida para o cloroplasto onde é ativada a AGPase, provocando o acúmulo de amido nos frutos maduros. Isto possui um forte impacto no amadurecimento e na fisiologia pós-colheita, já que o incremento da osmolariedade diminui a perda de água prolongando assim a vida de prateleira do fruto.

De acordo com os resultados obtidos é provável que o aumento nos níveis de amido no fruto seja devido à ativação da AGPase nas plantas silenciadas, o qual está de acordo com a observação de Schauer *et al.* (2005) que mostraram que os frutos de *S. pennellii* acumulam mais do dobro de amido que *S. lycopersicum*. Da mesma maneira, em um trabalho publicado recentemente foi observado que os níveis da enzima AGPase são significativamente maiores em frutos do tomate selvagem no começo do amadurecimento, 42 dias após antese (Steinhauser *et al.* 2010)

O silenciamento da chaperona DnaJ não modificou o conteúdo de aminoácidos totais em folhas nem em frutos. A respeito deste ponto, vale a pena mencionar que as plantas foram sistematicamente adubadas de forma de eliminar a falta de nitrogênio como um possível fator limitante. De qualquer forma, a determinação da relação C/N, assim como, uma quantificação por cromatografia de aminoácidos é altamente desejável.

Embora o silenciamento da chaperona DnaJ sugira uma alteração na relação fonte-dreno, não foram evidenciadas diferenças na massa de frutos ou parte aérea, nem no índice de colheita. Mesmo que esta observação possa parecer *a priori* contraditória, as casas de vegetação para as plantas transgênicas usadas neste trabalho requerem condições que podem mascarar diferenças na distribuição de fotoassimilados. Outra possibilidade é que o aumento da exportação da fonte para o dreno leve à aceleração fenológica, parâmetro que não foi avaliado neste estudo.

A relação entre chaperonas e regulação da fotossíntese tem sido muito pouco estudada. Recentemente, em 2010, Chen *et al.* descreveram três chaperonas cloroplásticas que atuam na estabilização do fotossistema II (PSII). Os genes que codificam estas proteínas são transcritos e traduzidos no escuro e o tratamento com alta intensidade de luz ($500 \mu\text{mol de fótons m}^{-1} \text{s}^{-1}$) resultou na completa depleção destas proteínas em folhas. Embora esta proteína possua um papel diferente ao proposto para a DnaJ de tomate, esses resultados demonstram também a participação das chaperonas no controle da maquinaria fotossintética.

O incremento da produtividade de culturas de interesse agrônomo por meio da redistribuição de fotoassimilados sem alterar a biomassa parece ter atingido o limite. Para melhorar o rendimento e sustentar uma população crescente cuja estimativa atinge 10 bilhões em 2050, além de cobrir as necessidades de sequestro de carbono no contexto das mudanças climáticas globais, será necessário aumentar a biomassa incrementando a fixação de carbono por meio da manipulação da fotossíntese. Porém, devido ao fato que a comunicação entre fotossíntese e

crescimento é uma relação de ida e volta, é altamente provável que a falta de demanda do dreno frustre a manipulação genética direta da fotossíntese (Paul e Foyer, 2001). Por este motivo, o entendimento da natureza do controle dos mecanismos que regem o balanço fonte-dreno surge como uma necessidade fundamental para o melhoramento das culturas no curto prazo e este trabalho abre uma porta neste sentido.

Figura 18. Modelo proposto da função da chaperona DnaJ no metabolismo plastidial.

A esquerda e direita encontram-se esquematizadas células de folha fonte e fruto maduro, respectivamente. No cloroplasto da folha encontra-se representado ciclo de Calvin, síntese de amido e produtos da fase luminica da fotossíntese. No citosol encontra-se esquematizada a síntese de sacarose. A chaperona DnaJ encontra-se na membrana do cloroplasto mediando a percepção das trioses-fosfato e, inibindo a sacarose fosfato sintase (SPS) ou ativando a quinase não-fermentativa (SnRK). A sacarose chega ao fruto onde é degradada através da invertase de parede (CWIN) ou pela sucrose sintase (SuSy). No plastídeo do fruto ocorre a síntese e acúmulo de amido.

6. CONCLUSÕES

Com os dados gerados da análise da estrutura gênica e protéica, atividade promotora, determinação da localização subcelular e, análise fenotípica de plantas silenciadas para o gene *chaperona DnaJ* é possível formular as seguintes conclusões:

- 1) A localização plastidial assim como o padrão de expressão diferencial levaria a uma maior quantidade de proteína em *S. lycopersicum*;
- 2) A deficiência nesta proteína leva a um aumento do armazenamento de amido no fruto maduro;
- 3) As mudanças no conteúdo de açúcares e pigmentos identificadas demonstram o envolvimento dessa proteína no metabolismo plastidial, e;
- 4) A proteína DnaJ atua no controle da relação fonte-dreno limitando a exportação de sacarose ao fruto.

7. REFERÊNCIAS

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410.
- Banecki B, Liberek K, Wall D, Wawrzynow A, Georgopoulos C, Bertoli E, Tanfani F, Zylicz M. 1996. Structure-function analysis of the zinc finger region of the DnaJ molecular chaperone. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 14840-14848.
- Bermúdez L, Urias U, Milstein D, Kamenetzky L, Asis R, Fernie AR, Van Sluys MA, Carrari F, Rossi M. 2008. A candidate gene survey of quantitative trait loci affecting chemical composition in tomato fruit. *Journal of Experimental Botany* 59, 2875-90.
- Caplan AJ, Cyr DM, Douglas MG. 1993. Eukaryotic homologues of *Escherichia coli* dnaJ: a diverse protein family that functions with hsp70 stress proteins. *Molecular Biology of the Cell* 6, 555-63.
- Centeno DC, Osorio S, Nunes-Nesi A, Bertolo AL, Carneiro RT, Araújo WL, Steinhauser MC, Michalska J, Rohrmann J, Geigenberger P, Oliver SN, Stitt M, Carrari F, Rose JK, Fernie AR. 2011. Malate plays a crucial role in starch metabolism, ripening, and soluble solid content of tomato fruit and affects postharvest softening. *The Plant Cell* 23, 162-184.
- Cheetham ME, Caplan AJ. 1998. Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress and Chaperones* 3, 28-36.
- Chen KM, Holmström M, Raksajit W, Suorsa M, Piippo M, Aro EM. 2010. Small chloroplast-targeted DnaJ proteins are involved in optimization of photosynthetic reactions in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 7, 10-43.
- Chen KM, Piippo M, Holmström M, Nurmi M, Pakula E, Suorsa M, Aro EM. 2011. A chloroplast-targeted DnaJ protein AtJ8 is negatively regulated by light and has rapid turnover in darkness. *Journal of Plant Physiology*. [Epub ahead of print].
- CIMMYT. 2005. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Third Edition. México D.F.
- Corpet T. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* 16, 10881-10890.
- D'Aoust MA, Yelle S, Nguyen-Quoc B. 1999. Antisense inhibition of tomato fruit sucrose synthase decreases fruit setting and the sucrose unloading capacity of young fruit. *The Plant Cell* 11, 2407-2418.
- Di Rienzo JA. 2009. Statistical software for the analysis of experiments of functional genomics. RDNDA. Argentina. 756587.<http://sites.google.com/site/fgStatistics/>.
- Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe G, Kruger NJ. 2001. Fructose 2,6-biphosphate actiates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Plantta* 212, 250-263.
- Fridman E, Carrari F, Liu Y, Fernie A, Zamir D. 2004. Zooming In on a quantitative Trait for Tomato Yield Using Interspecific Introgressions. *Science* 305, 1786-1789.
- Geigenbenger P, Riewe D, Fernie AR. 2010. The central regulation of plant physiology by adenylates. *Trends in Plant Science* 15, 98-105.
- Ham BK, Park JM, Lee SB, Kim MJ, Lee IJ, Kim KJ, Kwon CS, Paek KH. 2006. Tobacco Tsp1, a DnaJ-type Zn finger protein, is recruited to and potentiates Tsi1-mediated transcriptional activation. *Plant Cell* 18, 2005-2020.
- Heredia A, Peinado I, Barrera C, Grau AA. 2009. Influence of process variables on colour changes, carotenoids retention and cellular tissue alteration of cherry

- tomato during osmotic dehydration. *Journal of Food Composition and Analysis* 22, 285-294.
- Hoeckema A, Hirsch PR, Hooykas PJ, Schilperoot RA. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303, 179-180.
- Kamenetzky L, Asís R, Bassi S, de Godoy F, Bermúdez L, Fernie AR, Van Sluys MA, Vrebalov J, Giovannoni JJ, Rossi M, Carrari F. 2010. Genomic analysis of wild tomato introgressions determining metabolism- and yield-associated traits. *Plant Physiology* 152, 1772-86.
- Kampinga HH, Craig EA. 2010. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 579-92.
- Karimi M, Inzé D, Depicker A. 2002. GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* 7, 193-195.
- Kroczyńska B, Zhou R, Wood C, Miernyk JA. 1996. AtJ1, a mitochondrial homologue of the *Escherichia coli* DnaJ protein. *Plant Molecular Biology* 31, 619-629.
- Lichtenthaler HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148, 350-382.
- Linke K, Wolfram T, Bussemer J, Jakob U. 2003. The roles of the two zinc binding sites in DnaJ. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 44457-66.
- Li L, Lu S, Cosman KM, Earle ED, Garvin DF, O'Neill J (2006). β -Carotene accumulation induced by the cauliflower Or gene is not due to an increased capacity of biosynthesis. *Phytochemistry* 67, 1177-1184.
- Li HM, Chiu CC. 2010. Protein transport into chloroplasts. *Annual Review of Plant Biology* 61, 157-80.
- Lu S, Van Eck J, Zhou X, Lopez AB, O'Halloran DM, Cosman KM, Conlin BJ, Paolillo DJ, Garvin DF, Vrebalov J, Kochian LV, Kupeer H, Earle ED, Cao J, Li L. 2006. The cauliflower or gene encodes a dnaJ cysteine-rich domain-containing protein that mediates high levels of β -Carotene accumulation. *The Plant Cell* 18, 3594-3605.
- Maxwell K e Jonson G. 2000. Chlorophyll fluorescence a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 345, 659-668.
- Miernyk JA. 2001. The J-domain proteins of *Arabidopsis thaliana*: an unexpectedly large and diverse family of chaperones. *Cell Stress Chaperones* 6, 209-218.
- Mueller LA, Solow TH, Taylor N, Skwarecki B, Buels R, Bins J, Lin C, Wright MH, Ahrens R, Wang Y, Herbst EV, Keyder ER, Menda N, Zamir D, Tanksley SD. 2005. The SOL Genomics Network. A Comparative Resource for Solanaceae Biology and Beyond. *Plant Physiology* 138, 1310-1317.
- Mueller L, Mills A, Skwarecki B, Buels R, Menda N, Tanksley S. 2008. The SGN comparative map viewer. *Bioinformatics* 24, 422-423.
- Mueller, L. et al. 2009. A snapshot of the emerging tomato genome sequence. *The Plant Genome* 2, 78-92.
- Nicoll WS, Boshoff A, Ludewig MH, Hennessy F, Jung M, Blatck GL. 2006. Approaches to the isolation and characterization of molecular chaperones. *Protein Expression and Purification* 46, 1-15.
- Orme W, Walker AR, Gupta R, Gray JC. 2001. A novel plastid-targeted J-domain protein in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 46, 615-626.
- Paul MJ, Foyer CH. 2001. Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 52, 1383-1400.
- Preiss J. 1988. Biosynthesis of starch and its degradation. Em: Preiss J, ed. *Biochemistry of plants*, Vol. 13. San Diego: Academic Press, 181-254.
- Preiss J, Romeo T. 1994. Molecular biology and regulatory aspects of glycogen synthesis in bacteria. Em: Cohen WE, Moldane KE, eds. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, Vol. 47. San Diego: Academic Press, 112-138.

- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30, 9 -36.
- Rajan VB, D'Silva P. 2009. Arabidopsis thaliana J-class heat shock proteins: cellular stress sensors. *Functional e Integrative Genomics* 9, 433–46.
- Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, Moorman AF. 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research* 37, 45.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning, a laboratory manual. Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saitou N e Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425.
- Shimada H, Mochizuki M, Ogura K, Froehlich JE, Osteryoung KW, Shirano Y, Shibata D, Masuda S, Mori K, Takamiya K. 2007. Arabidopsis cotyledon-specific chloroplast biogenesis factor CYO1 is a protein disulfide isomerase. *Plant Cell* 19, 3157-69.
- Schauer N, Fernie AR. 2006. Plant metabolomics: towards biological function and mechanism. *Trends Plant Science* 10, 508-16.
- Schauer N, Semel Y, Roessner U, Gur A, Balbo I, Carrari F, Pleban T, Perez-Melis A, Bruedigam C, Kopka J, Willmitzer L, Zamir D, Fernie A. 2006. Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nature Biotechnology* 24, 447-454.
- Scott P, Lange AJ, Pilgis SJ, Kruger NJ. 1995. Carbon metabolism in leaves of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) containing elevated fructose- 2,6- biphosphate levels. *The Plant Journal* 7, 461–469.
- Sienkiewicz-Porzućka A, Sulpice R, Osorio S, Krahnert I, Lisse A, Urbanczyk-Wochniak E, Hodges. M, Fernie AR, Nunes-Nesi A. 2010. Mild reductions in mitochondrial NAD-dependent isocitrate dehydrogenase activity result in altered nitrate assimilation and pigmentation but do not impact growth. *Molecular Plant Biology* 3, 156–173.
- Smith AM, Stitt M. 2007. Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell and Environment* 30, 1126-1149.
- Sokal RR, Rohlf JF. 1995. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 3rd ed. W.H. Freeman, New York, 887p.
- Steinhauser MC, Steinhauser D, Koehl K, Carrari F, Gibon Y, Fernie AR, Stitt M. 2010. Enzyme activity profiles during fruit development in tomato cultivars and *Solanum pennellii*. *Plant Physiology* 153, 80-98.
- Szabo A, Korszun R, Hartl FU, Flanagan J. 1996. A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. *EMBO Journal* 15, 408-417.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596-1599.
- Thomas JG, Baneyx F.1996. Protein folding in the cytoplasm of Escherichia coli: requirements for the DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES molecular chaperone machines. *Molecular Microbiology* 21, 1185-1196.
- Thompson J, Higgins D, Gibson T. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- Vitha S, Froehlich JE, Koksharova O, Pyke KA, van Erp H, Osteryoung KW. 2003. ARC6 is a J-domain plastid division protein and an evolutionary descendant of the cyanobacterial cell division protein Ftn2. *Plant Cell* 15, 1918-33.

- Voos W, Rottgers K. 2002. Molecular chaperones as essential mediators of mitochondria biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1592, 52-62.
- Wang F, Sanz A, Brenner ML, Smith A. 1993. Sucrose synthase, starch accumulation, and tomato fruit sink strength. *Plant Physiology* 101, 321–327.
- Wen-Jun S e Forde B. 1989. Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by high electroporation. *Nucleic Acids Research* 17, 8385.
- Zscheille F e Porter J. 1947. Analytical methods for carotenes of *Lycopersicon* species and strains. *Analytical Chemistry* 19, 47-51

*Capítulo IV : Caracterização e
estudo funcional do gene sec14*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Vitamina E, biossíntese e função

Como mencionado na introdução geral, o tomate constitui uma fonte notável de antioxidantes na dieta humana devido ao alto teor desses compostos. Os principais antioxidantes não-enzimáticos encontrados nos frutos de tomate são o ácido ascórbico (VTC), licopeno e carotenóides, compostos fenólicos e vitamina E (VTE) (Frusciante *et al.*, 2007; Abushita *et al.*, 1997).

Os compostos com atividade VTE são moléculas anfipáticas e lipossolúveis sintetizadas exclusivamente nos organismos fotossintéticos. A estrutura molecular consiste em um anel hidroxicromanol polar, derivado do homogentisato, e uma cadeia lateral lipofílica, produtos da via do chiquimato (SK) e metil-eritritrofosfato (MEP), respectivamente (Figura 2). São coletivamente chamados de tococromanóis, e podem ser classificados em dois grupos de acordo ao grau de saturação da cadeia lipofílica, tocoferóis e tocotrienóis. Os tocoferóis, mais abundantes em plantas, têm cadeia lateral saturada derivada do fitil-2P, e os tocotrienóis, possuem a cauda derivada de GGDP (geranil geranil difosfato) com instaurações nas posições 3', 7' e 11' (Munné-Bosch e Alegre, 2002; Figura 1). Existem quatro isômeros de tocoferóis e tocotrienóis - α , β , γ e δ - que variam quanto ao número e posição dos grupos metil junto ao anel cromanol (Kamal-Eldin e Appelqvist, 1996).

Figura 1. Estrutura química dos tococromanóis. A tabela indica o número/posição do radical metil no anel em α , β , γ e δ -tocoferol e tocotrienol. A atividade vitamínica de cada composto é relativa ao α -tocoferol (100%). nm, não-mensurável. As diferenças estruturais estão destacadas por círculos cinza. Adaptado de Dellapenna e Last (2006).

Mesmo apresentando uma estrutura química similar, os tococromanóis possuem propriedades bioquímicas que dependem da sua cadeia lateral. Os tocoferóis encontram-se presentes em todos os organismos fotossintéticos, enquanto que os

tocotrienóis são encontrados unicamente em grupos específicos de plantas. Adicionalmente, nos casos em que ambos os compostos encontram-se presentes na mesma espécie, esses não necessariamente compartilham o mesmo tecido, indicando assim, possíveis diferenças funcionais na planta (Falk e Munné-Bosch, 2010). O α -tocopherol é o composto que apresenta maior atividade de VTE, a forma predominante encontrada nos tecidos verdes das plantas e em sementes de algumas espécies oleaginosas (Munné-Bosch e Alegre, 2002; DellaPenna e Last, 2006).

Pelas propriedades antioxidantes destes compostos, diversos trabalhos têm estudado as suas características químicas, localização e função nas membranas biológicas (Wang e Quinn, 2000); benefícios na saúde humana (Pryor, 2000; Ricciarelli *et al.*, 2001; Bell e Grochoski, 2008; Ros 2009; Zhang *et al.*, 2009; Das *et al.*, 2009); aplicações biotecnológicas para sua produção (Ogbonna, 2009) e; biossíntese (DellaPenna, 2005 a, 2005b; DellaPenna e Pogson, 2006) e função em plantas (Munné-Bosch e Alegre, 2002; Kruk *et al.*, 2005; Abassi *et al.*, 2007, 2009; Munné-Bosh *et al.*, 2005; Falk e Munné-Bosh, 2010; Zbierzak *et al.*, 2010).

Nos vegetais, a VTE está associada à proteção de pigmentos, proteínas e ácidos graxos poliinsaturados da maquinaria fotossintética contra espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas durante a fotossíntese (Semchuk *et al.*, 2009). Além disso, tem sido proposto que a VTE interage com outros sistemas antioxidantes com o intuito de manter a homeostase redox intracelular (Kruk *et al.*, 2005; Foyer e Noctor, 2005; Zbierzak *et al.*, 2010). A biossíntese dos tococromanóis foi descrita nos plastídeos e, até o momento, não foi demonstrada a possibilidade de transporte para nenhum dos isômeros de VTE dentro do corpo da planta (Sun *et al.*, 2009).

A rota biossintética de tocoferol foi elucidada em 1979 (Soll e Schultz, 1979), porém, a identificação dos genes nela envolvidos ocorreu apenas recentemente. Por meio de diversas abordagens genéticas e genômicas, assim como com caracterização de mutantes, os genes que codificam para as enzimas da rota central da VTE foram identificados e clonados para algumas espécies vegetais (Li *et al.*, 2008; Mène-Saffrané e DellaPenna, 2009; Falk e Munné-Bosch, 2010; Mène-Saffrané e DellaPenna, 2009). Esses estudos sugerem que a VTE desempenha um papel além de sua função antioxidante, que incluiria participação em diversos processos fisiológicos como germinação, senescência foliar, resposta ao stress abiótico, crescimento e particionamento de fotoassimilados (Falk e Munné-Bosch, 2010). Em concordância com a diversidade de processos nos quais está envolvida, vários trabalhos evidenciam uma estreita interação entre VTE e outras vias metabólicas, como síntese de carotenóides,

glutathiona e ascorbato (outros sistemas antioxidantes de defesa), além da degradação da clorofila.

Assim, devido à sua importância na fisiologia da planta e para a nutrição humana, muitos esforços têm sido empreendidos para entender os mecanismos responsáveis pela síntese, transporte e acúmulo de VTE em plantas, especialmente nas espécies cultivadas, com o objetivo de melhorar a produtividade e os níveis desses micronutrientes. Porém, apesar de muitos avanços terem sido alcançados nos últimos anos, aspectos relacionados à rota biossintética e sua regulação precisam ser melhor compreendidos. Só assim, será possível a manipulação do metabolismo a fim de aumentar os conteúdos de tocoferol nas espécies de interesse agrônômico.

1.2. Antecedentes do projeto

Recentemente, o nosso grupo identificou todos os genes envolvidos na rota biossintética da VTE de tomate desde os seus precursores do metabolismo primário (Almeida *et al.*, 2011, vide anexo 2). As 28 atividades enzimáticas compreendidas nas rotas do MEP, SK e central de tocoferol são catalisadas por 27 enzimas codificadas por 41 locos (Figura 2). Baseando-se na ligação física entre as sequências expressas, genômicas e de marcadores moleculares foi possível estabelecer a localização genômica de cada um dos genes identificados (Figura 3). Os mesmos se encontram distribuídos ao longo do genoma, no entanto, constatou-se que os locos que codificam para seis das sete enzimas da rota central de tocoferol se encontram agrupados nos cromossomos 7, 8 e 9. Em estudo anterior, Schauer *et al.* (2006), por meio da análise dos perfis metabólicos das ILs por GC-MS (*Gas Chromatography – Mass Spectrometry*), descreveram dois QTL para o conteúdo de α -tocoferol em fruto maduro localizados no cromossomo 6 e 9. Notavelmente, os quatro genes mapeados no cromossomo 9, *vte3*(1), *vte5*, *tyra*(2), e *ggps*(4) co-localizam com um dos QTL identificados por Schauer *et al.* (2006). Nesse sentido, a fim de investigar a presença de outros possíveis QTL para os diferentes isômeros de tocoferol, foi determinado o conteúdo desses compostos por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). As buscas por QTL concentraram-se nas ILs, cujos fragmentos introgrididos abrangem os genes da rota central da VTE e os QTL descritos por Schauer *et al.* (2006). Dessa forma, foram obtidos perfis completos dos quatro isômeros (α -, β -, γ - e δ -) de tocoferol em fruto das ILs 6-1, 6-2, 7-4, 7-4-1, 7-5, 8-2, 8-2-1, 9-1, 9-2-6 e nos frutos controle correspondentes de *S. lycopersicum* (cv M82), além de tocoferol total.

plantas e animais, o qual sugere uma origem evolutiva ancestral e uma função conservada (Joannic *et al.*, 1998). Além da ligação a moléculas hidrofóbicas, as proteínas Sec14 têm sido associadas a funções ainda mais complexas como transdução de sinal para a integração do metabolismo de lipídeos com outros processos bioquímicos (Saito *et al.*, 2007, Bankaitis *et al.*, 2009). Devido a essas proteínas não possuírem uma função enzimática, acredita-se que atuem principalmente como sensores de lipídeos controlando espaço-temporalmente a atividade de enzimas específicas (Bankaitis *et al.*, 2010).

Em mamíferos, proteínas SEC14 têm demonstrado atuar como transportadoras de α -tocoferol (Stocker e Baumann, 2003; Stocker *et al.*, 1999; Bankaitis *et al.*, 2010). Já em plantas, os estudos são limitados e restritos a poucas espécies. Em soja, foram identificados dois genes homólogos, Ssh1p e Ssh2p (*soybean homolog-1* e *-2*), cujos produtos protéicos apresentam propriedades de ligação e transferência de fosfolipídeos, e encontram-se associadas à resposta da planta a estresse ambiental de diversos tipos, especialmente, condições de elevada osmolaridade (Kearns *et al.*, 1998). Em *Arabidopsis*, Jouannic *et al.* (1998) reportaram uma proteína SEC14 envolvida com secreção protéica e na transferência de fosfatidilinositol. Na mesma espécie, Vincent *et al.* (2005) descreveram a proteína AtSfh1p que regula a sinalização por Ca^{+2} e a função do citoesqueleto, determinando o crescimento polarizado das raízes. Em *Lotus japonicus*, tem sido reportada uma proteína SEC14 que atua na síntese e função de proteínas de transferência de fosfolipídeos em nódulos de fixação de nitrogênio (Kapranov *et al.*, 2001). Finalmente, Peterman *et al.* (2004 e 2006) caracterizaram a proteína PATL1 (*patellin 1*) que liga fosfoinosítídeos e está associada a tráfego de membrana durante a biogênese da placa celular em *arabidopsis*.

Os antecedentes supramencionados permitem postular a hipótese que o gene *sec14* identificado em tomate seja, pelo menos em parte, responsável pelo QTL de α -tocoferol localizado no cromossomo 9 e, desta forma, o presente capítulo propõe a caracterização funcional deste gene.

2. OBJETIVOS.

Devido ao interesse nutricional da VTE e ao seu papel na regulação do equilíbrio oxidativo foi proposto realizar a caracterização e estudo funcional do gene *sec14* para melhor compreender os mecanismos que regulam a biossíntese e acúmulo desta vitamina na planta de tomate.

Para atingir este objetivo foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- 1) Analisar a estrutura gênica e realizar um estudo filogenético;
- 2) Estudar a localização subcelular da proteína, e;
- 3) Estudar o efeito sobre o metabolismo do silenciamento gênico por RNA de interferência.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

As sementes de tomate de *S. lycopersicum* L. (cv M82 e Moneymaker) e da linhagem introgridida IL 9-2 de *S. pennellii* foram gentilmente cedidas pelo Tomato Genetic Resource Center (<http://tgrc.ucdavis.edu>). As sementes de *Nicotiana benthamiana* foram obtidas do Instituto de Biotecnología do INTA – Argentina. As plantas de tomate e *N. benthamiana* foram crescidas em casa de vegetação, em potes de 20 e 1 L, respectivamente, contendo terra vegetal e vermiculita (1:1). As condições da casa vegetação foram: fotoperíodo de 16/8 h, temperatura de 24 ± 3 °C, 60% umidade e fotoirradiância de $140 \pm 40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.2. Cepas bacterianas e plasmídeos

***Escherichia coli*:** foram utilizadas as cepas DH5 α , DH10 β e DB 3.1. Todos os cultivos foram realizados em meio LB (meio de Luria-Bertani). A temperatura de crescimento foi de 37 °C e nos casos de cultivo líquido a agitação foi de 200 rpm. Quando as cepas bacterianas foram transformadas com um vetor plasmidial, foi adicionado o antibiótico de seleção correspondente ao meio de cultivo.

***Agrobacterium tumefaciens*:** foram utilizadas as cepas GV3101 e GV2260. GV3101 possui resistência a rifampicina (25 mg/l) e gentamicina (50 mg/l) e foi utilizada para experimentos de expressão transitória. GV2260 é resistente a rifampicina (25 mg/l) (Hoeckema *et al.*, 1983) e foi utilizada para a transformação estável. As bactérias foram cultivadas em meio LB a uma temperatura de 28 °C e nos casos de cultivo líquido a agitação foi de 200 rpm.

Plasmídeos: os vetores utilizados para os diferentes métodos experimentais estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos vetores utilizados neste trabalho.

Vetores	Resistência em bactéria	Resistência em plantas	Características	Origem
pENTR/D-TOPO	canamicina		Vetor linearizado com sítio de clonagem direcional para produtos de PCR de ponta cega. Possui os sítios <i>attL1</i> e <i>attL2</i> para recombinação sítio-específica do clone de entrada com um vetor destino no sistema Gateway®.	Invitrogen
pK7FWG2	spectinomicina/ streptomomicina	canamicina	Vetor binário que possui o promotor <i>35s</i> , sítios <i>attR1</i> e <i>attR2</i> , para recombinação sítio-específica no sistema Gateway®, para fusão da proteína de interesse a GFP (<i>Green Fluorescent Protein</i>) e terminador <i>35s</i> .	Karimi <i>et al.</i> (2002)
p7GWIWG2(I)	spectinomicina/ streptomomicina	canamicina	Vetor binário que possui o promotor <i>35s</i> , um íntron flanqueado por sítios <i>attR1</i> e <i>attR2</i> , para recombinação sítio-específica no sistema Gateway®, e terminador <i>35s</i> . Contém um fragmento gênico em ambas as orientações separados por um íntron permitindo a formação de uma estrutura de alça.	Karimi <i>et al.</i> (2002)

3.3. Obtenção das sequências dos alelos do gene *sec14*, análise da estrutura gênica e filogenia

A sequência completa do alelo de *S. lycopersicum* foi obtida do contig SL2.31ct07099 (Projeto de sequenciamento internacional de Tomate, SGN) disponível na página da Sol Genomics Network (Mueller *et al.*, 2005, 2008, 2009). O alelo correspondente a *S. pennellii* foi clonado e sequenciado pelo nosso grupo (Almeida *et al.*, 2011). As UTRs foram determinadas de acordo com o unigene de referência (U583419) disponível na página da SGN. A comparação das sequências foi realizada com o auxílio do programa MULTALIN (Corpet, 1988).

Foi realizada uma busca no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e na literatura para identificar proteínas com domínio SEC14 com função experimentalmente

demonstrada. Utilizando as sequências identificadas e a proteína SEC14 de tomate como referência, foram obtidas da base de proteínas não redundantes (nr) do NCBI, sequências ortólogas de outras espécies vegetais por meio do algoritmo BLASTX (Altschul *et al.*, 1990). O critério estabelecido para a escolha das sequências foi identidade de aminoácidos $\geq 40\%$ e cobertura $\geq 65\%$. Para todas as sequências protéicas foi predita a localização subcelular utilizando o programa TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>). A estrutura secundária e terciária da proteína DnaJ foi analisada utilizando o programa TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Para a construção da árvore filogenética, as sequências de aminoácidos foram alinhadas utilizando o programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). A matriz de distância foi construída utilizando o método de Neighbor-joining (Saito e Nei, 1987) com o programa MEGA (Tamura *et al.*, 2007). Os valores de *bootstrap* foram determinados a partir de 1000 réplicas.

3.4. Obtenção da construção para estudo da localização subcelular da proteína SEC14

Tecidos de folha fonte (segundo e terceiro folíolos da terceira folha totalmente expandida), da IL 9-2 e de *S. lycopersicum* (cv. M82), foram processados em nitrogênio líquido e alíquotas de 200 mg de tecido triturado foram submetidas à extração de RNA total empregando-se o reagente Trizol (Invitrogen, 15596018), segundo o protocolo recomendado pelo fabricante. A extração foi realizada utilizando clorofórmio (0,2 V/V de Trizol) e a precipitação do ácido nucléico com isopropanol (0,6 V/V de solução). O RNA foi ressuspendido em 20 μ l de água 0,1% DEPC (livre de RNase) e as amostras estocadas a -80°C . As amostras foram quantificadas por absorbância a 260 nm em espectrofotômetro. Para estimar a pureza da preparação, foi levada em consideração a relação entre as absorbâncias obtidas a 260 nm e 280 nm, sendo que as amostras com razões acima de 1,8 foram consideradas puras. Quando necessário, uma nova precipitação com 1 volume de LiCl (5M) foi realizada. Aproximadamente 1 μ g de RNA foi tratado com 1 μ l de DNase (Invitrogen 18068-015), e posteriormente foi realizada a síntese de cDNA utilizando a enzima SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen 18080-044), segundo instruções do fabricante. Cada reação conteve: 11 μ l do RNA tratado com DNase (aproximadamente 1 μ g), 1 μ l de iniciadores OligoDT (Invitrogen 18418-012) (150 μ g/ml) e 0,2 mM dNTPs. Após incubação a 65°C por 5 minutos foi adicionado 1x tampão da enzima, 5 mM DTT, 40

unidades de inibidor de RNase (40 u/μl) RNaseOUT (Invitrogen 10777-019), e 200 unidades da enzima SuperScript III RT (200 u/μl). Essa reação foi incubada por 5 minutos a 25 °C, 50 °C por 1 hora e, finalmente, 70 °C por 15 min. Para testar a pureza do cDNA (livre de DNA genômico), foi realizada uma PCR usando 0,2 mM de cada dNTPs, 0,2 mM de cada iniciador ActinaUp (5'- TGGCATCATACCTTTTACAA -3') e ActinaLow (5'- TCCGGGCATCTGAACCTCT -3'), 1,5 mM de Mg₂SO₄, e 2,5 unidades de enzima TAQ polymerase® (Invitrogen, 10342-020). O ciclo de amplificação utilizado foi de 94 °C por 3 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 55 °C por 1 min, 72 °C por 2 min; e uma extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos da amplificação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 0,8% TAE 1x.

A amplificação do cDNA completo do gene para ambos os alelos foi realizada por PCR utilizando a 50 ng de cDNA de cada um dos genótipos, 0,2 mM de cada dNTPs, 0,2 mM de cada iniciador [FUS-SEC14-F (5'- CACCATGGATTCTTCATCCCCC-3') e FUS-SEC14-R (5'- GGCTGAAATAGTTGCAGATTTGC -3')], 1,5 mM de Mg₂SO₄, e 2 unidades de enzima Elongase® DNA polimerase (Invitrogen, 10480-010). O ciclo de amplificação utilizado foi de 94 °C por 3 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 50 °C por 30 seg, 68 °C por 2 min; e uma extensão final a 68 °C por 10 min. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o Kit GFX (Amersham Biosciences 27-9602-01), de acordo com especificações do fabricante e clonados no vetor de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen, K240020). Posteriormente, foram recombinados utilizando a enzima LR clonase II (Invitrogen 11791-020) no vetor binário de pK7FWG2 (Tabela 1). Os clones obtidos pK7FWG2-SEC14Lyc e pK7FWG2-SEC14Pen foram analisados por restrição com endonucleases e confirmados por sequenciamento. Após confirmação da identidade, os clones foram inseridos *A. tumefaciens* cepa GV3101 segundo protocolo de Wen-Jun e Forde (1989).

3.5. Obtenção da construção para avaliação do efeito do silenciamento gênico por RNA de interferência

DNA plasmidial do clone contendo o alelo de *S. lycopersicum* do gene *sec14* obtido pelo nosso grupo foi purificado segundo Sambrook *et al.* (1989). Para a amplificação do fragmento para RNAi, foram usados 10 ng de DNA molde, 0,2 mM de cada dNTPs, 0,2 mM de cada iniciador [RNAi-sec14-F (5'- CACCGTAGTAGGAGGATGGGACTTGG-3') e RNAi-sec14-R (5'- GCAGATTTGCGGACAATGTATCGATAG-3')], 1,5 mM de Mg₂SO₄, e 2,5 unidades de

enzima TAQ polymerase® (Invitrogen, 10342-020). O ciclo de amplificação utilizado foi de 94 °C por 3 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 52 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min; e uma extensão final a 72 °C por 10 min.

O fragmento amplificado foi purificado utilizando o Kit GFX (Amersham Biosciences 27-9602-01), de acordo com especificações do fabricante. O fragmento foi clonado no vetor de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen, K240020) e posteriormente recombinado utilizando a enzima LR clonase II (Invitrogen 11791-020) no vetor binário de p7GWIWG2(I) (Tabela 1). O clone obtido pK7GWIWG2(I)sec14 foi analisado por restrição com endonucleases e confirmado por sequenciamento. Após confirmação da identidade, o clone foi inserido em *A. tumefaciens* cepa GV2260 segundo protocolo de Wen-Jun e Forde (1989).

3.6. Infiltração de folhas de *N. benthamiana* para estudo da localização subcelular da proteína SEC14

As células de *A. tumefaciens* cepa GV3101 contendo os plasmídeos pK7FWG2-SEC14Lyc e pK7FWG2-SEC14Pen foram cultivadas a 28 °C durante 16 horas em 20 ml de meio LB com rifampicina (25 µg/ml), spectinomicina (50 µg/ml) e gentamicina (50 µg/ml), até obter uma densidade óptica (OD) de 0,5 a 600 nm. Posteriormente, as células foram coletadas a 4.000 rpm por 10 min a temperatura ambiente e ressuspensas em MES 10 mM com acetosiringona (100 mM). A suspensão foi incubada por 4 horas a temperatura ambiente e a infiltração realizada em plantas de aproximadamente seis semanas na superfície abaxial da folha com uma seringa de 1ml sem agulha.

Após 48h, as folhas infiltradas foram analisadas e fotografadas no microscópio de laser confocal espectral Leica TCS-SP5, usando o objetivo 63x (HCX PL APO CS 63.0x1.20 WATER UV). A linha de 488 nm do laser de Argon foi usada para excitar as partículas de GFP e da clorofila. A emissão da fluorescência foi detectada a 525-600 nm para GFP e a 700-800 nm para a clorofila. As imagens de cada plano foram tomadas em modo sequencial para evitar o cruzamento de espectros de ambos os fluoróforos. A configuração geral do microscópio foi ajustada para otimizar o contraste e a resolução de cada imagem individualmente.

3.7. Obtenção de plantas transgênicas de tomate

3.7.1. Transformação genética

A obtenção de linhagens transgênicas de *S. lycopersicum* (cv. MoneyMaker), via *Agrobacterium*, foi realizada segundo o protocolo utilizado pelo Instituto de Biotecnologia do INTA Castelar, Argentina (<http://www.inta.gov.ar/biotec/actividad/transformaciondeplantas.htm>).

A micropropagação das linhagens transgênicas selecionadas foi realizada assepticamente em fluxo laminar horizontal (Nuair, EUA) a partir de ápices de plantas cultivadas *in vitro*. Foram mantidas em tubos de vidro de 2,5 cm de diâmetro e 10 cm de alto com meio de cultura MSS (Sais de Murashige-Skoog comercial com 20% sacarose), em câmaras de cultura a 22°C, e um fotoperíodo de 16 h claro (5.000 lux) - 8 h escuro.

3.7.2. Verificação da presença do transgene

Para conferir a presença do transgene, DNA genômico das linhagens foi extraído segundo CIMMYT (2005) e foi realizada uma PCR usando 50 ng de DNA molde, 0,2 mM de cada dNTPs, 0,2 mM de cada iniciador [35S-right (5'-CCCACTATCCTTCGCAAG-3') e 35S-left (5'-GCAGGTCCTGGATTTTGG-3')], 1,5 mM de Mg₂SO₄, e 2,5 unidades de enzima TAQ polymerase® (Invitrogen, 10342-020). O ciclo de amplificação utilizado foi de 94 °C por 3 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 55 °C por 1 min, 72 °C por 2 min; e uma extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos amplificados foram verificados por eletroforese em gel de agarose 0,8% TAE 1x.

3.7.3. Análise de expressão do gene *sec14* nas linhagens transgênicas obtidas

As linhagens crescidas *in vitro* em meio seletivo com antibiótico, para as quais foi confirmada a presença do transgene por PCR, foram levadas a estufa. Após quatro semanas, foram retiradas gemas vegetativas para sincronização das plantas com o respectivo controle. Uma vez que as plantas apresentavam 8 folhas completamente expandidas, foi coletado o terceiro folíolo da quarta folha totalmente expandida para a análise do silenciamento por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR). A extração de RNA e posterior síntese de cDNA foi realizado como descrito no item 3.4. A reação de qPCR foi realizada com 1 µl de uma diluição de cDNA 1:5, 0,2 mM de cada iniciador [Rnaitrans-SEC14-F (5'-CATCCCCCATTACTGTTCAAAAAGCTC-3') e Rnaitrans-SEC14-R (5'-GGTTTAAGGTGAGAAGTGAAG-3') para o gene alvo, e EF-1 α-up

(5'- ATTGGAAACGGATATGCTCCA-3') e EF-1 α -Low (5'- TCCTTACCTGAACGCCTGTCA - 3'), para o gene de referência] e 2x SYBR Green Master Mix (Qiagen, 204054). Foi utilizado um termociclador 7300 PCR Real Time (Applied Biosystems), e o ciclo de amplificação foi de 95 °C por 10 min e 40 ciclos de: 95 °C por 15 seg, 55 °C por 1 min e 72 °C por 30 seg (momento no qual ocorre a leitura do sinal emitido pelo SYBR Green). Os dados obtidos foram analisados com o software LinRegPCR (Ruijter *et al.*, 2009) para calcular os valores de Ct (*cycle threshold*) e a eficiência da reação. A expressão relativa foi calculada segundo fórmula abaixo (Pfaffl *et al.*, 2002) com o software fgStatistics (Di Rienzo, 2009). O mesmo software foi utilizado para as análises estatísticas.

$$ER = \frac{Ef_{\text{alvo}}^{\Delta (\text{média de Ct do controle} - \text{média de Ct da linhagem})}}{Ef_{\text{ref}}^{\Delta (\text{média de Ct do controle} - \text{média de Ct da linhagem})}}$$

Onde:

ER: expressão relativa

Ef: eficiência da qPCR para cada par de iniciadores

alvo: gene alvo (*sec14*)

Ct do controle: média dos Cts das réplicas biológicas do controle

Ct da linhagem: média dos Cts das réplicas biológicas de cada linhagem

ref: gene de referência (*EF1a*)

3.8. Caracterização fenotípica das linhagens transgênicas

3.8.1. Cultivo e parâmetros de produção

As cinco linhagens que apresentaram a maior redução dos níveis de RNAm do gene *sec14* foram selecionadas para caracterização fenotípica: RNAi:*sec14-2*, RNAi:*sec14-15*, RNAi:*sec14-18*, RNAi:*sec14-19* e RNAi:*sec14-24*. Foram estabelecidas seis réplicas de cada linhagem por meio de propagação por estaquia, em setembro de 2010. Foram feitas duas coletas no período das 10h às 14h: uma após cinco semanas e outra aos quatro meses, quando todas as plantas já apresentavam frutos maduros. Na primeira foi coletado o segundo e terceiro folíolo da terceira folha totalmente expandida e na coleta final foram amostrados pericarpos de fruto verde e maduro, de 37 e 52 dias após antese, respectivamente. Foram separados, contados e pesados todos os frutos restantes e, finalmente, a parte aérea da planta foi cortada no colo da raiz e pesada como parâmetro de biomassa. Para calcular o índice de colheita foi usada a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de colheita} = (\text{peso total de frutos verdes e maduros}) * 100 / \text{peso fresco da parte aérea.}$$

3.8.2. Verificação do nível de silenciamento nas linhagens transgênicas

Uma nova verificação do nível de silenciamento do gene *sec14* foi realizada para as seis réplicas de cada linhagem selecionada. Foram testadas por qPCR amostras de folhas fonte e fruto maduro, segundo descrito no item 3.7.3.

3.8.3. Avaliação da expressão dos genes da rota central de biossíntese do tocoferol

Para avaliar possíveis alterações na expressão dos genes relacionados à rota central de biossíntese de tocoferol, foram desenhados iniciadores específicos para cada um dos genes (Tabela 2), e avaliadas amostras de folhas fonte e fruto maduro por qPCR, segundo descrito no item 3.7.3.

Tabela 2. Iniciadores usados para análise de expressão por qPCR dos genes da rota central da biossíntese de tocoferol.

Gene	Nome do iniciador	Sequência 5' - 3'
Tocoferol ciclase, VTE1	RT-VTE1-F	CGAACTCCTCATAGCGGGTATC
	RT-VTE1-R	CACGCCAGTAAACCGAGGC
Homogentisato fitil transferase, VTE2	RT-VTE2-F	CAATTCAGTTCCTGCTGAG
	RT-VTE2-R	CCTCCAACATGCTCTTGCGTG
Dimetil-fitolquinol metil transferase, VTE3 (1)	VTE3-RT-F	GAGGGTGATGCTGAGGATC
	VTE3-RT-R	CGAGACAACCAAAAGGTAGGG
γ -tocoferol C-metil transferase, VTE4	RT-VTE4-F	CAGATCATCGTGCTGCTCAG
	RT-VTE4-R	CCTCTCTGCTTGACAGGAC
4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase, HPPD (1)	HPPD-RT-F	CAGGGCAGGGGATATACTGA
	HPPD-RT-R	CTCCACATCCACCCTTCTG

3.8.4. Medição dos parâmetros fotossintéticos

As medidas de trocas gasosas e fluorescência da clorofila foram realizadas com o sistema portátil Licor-6400 (Li-Cor; www.licor.com) que consiste em um sistema aberto contendo um analisador de gases por infravermelho (IRGA) e uma câmara fluorométrica acoplada (Modelo 6400–40, Li-Cor).

As medidas foram realizadas no segundo folíolo da terceira folha totalmente expandida de plantas em estado vegetativo de quatro semanas, no período das 10 h às 14 h. Antes de realizar as medições, as folhas a serem analisadas passaram por um processo de adaptação a escuridão durante no mínimo 30 min. Foram realizadas curvas de resposta à luz com uma câmara que possui uma área de exposição foliar de 2 cm², as condições padrão para as medições foram de 400 PPM de CO₂ e temperatura foliar de 25 °C.

Os parâmetros fotossintéticos foram determinados segundo Maxwell e Johnson (2000). Foram calculadas as fluorescências mínimas de folhas adaptadas à escuridão (F0) e adaptadas à luz (F0'). Após um pulso de luz saturante branca (3.000 $\mu\text{moles E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) foi determinada a fluorescência máxima da clorofila quando todos os centros do fotossistema II encontram-se na escuridão (Fm) ou adaptados à luz (Fm'). A fluorescência variável foi determinada pelo cálculo de $F_v = F_m - F_0$ em folhas adaptadas à escuridão, ou $F_v' = F_m' - F_0'$ em folhas adaptadas à luz variando a densidade de fluxo de fótons (PFD) entre 200 e 1200 $\mu\text{moles E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. A relação entre a eficiência variável e a eficiência máxima F_v/F_m ; a eficiência do fotossistema II $(F_m' - F_s)/F_m'$; o *quenching* fotoquímico $qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_0')$; o *quenching* não fotoquímico $NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$; e a acumulação de quinonas reduzidas $1 - pQ = (F_s - F_0')/(F_m' - F_0')$ também foram calculados. Finalmente, foi avaliada a taxa de transferência de elétrons:

$$ETR = [(F_m' - F_s) / F_m'] * f I \alpha \text{ folha}$$

onde F_s é o estado estável de fluorescência; f é a fração de *quanta* absorvido que é usado pelo fotossistema II o qual se assume ser de 0,5 para plantas C3; I é a densidade de fluxo de fótons incidente; e α folha é a absorbância da folha que se assume ser 0,85 (Sienkiewicz-Porzucek *et al.*, 2010).

3.8.5. Extração e quantificação de pigmentos

Para a quantificação de pigmentos, no momento da coleta final das plantas foi coletado um disco foliar de área 0,38 cm^2 do segundo folíolo da terceira folha totalmente expandida, 400 mg de pericarpo de fruto verde, e 400mg de pericarpo de fruto maduro para cada uma das réplicas das 5 linhagens transgênicas selecionadas. As amostras foram trituradas em nitrogênio líquido.

A extração de pigmentos para o tecido foliar e fruto verde foi realizada como descrito por Lichtenthaler (1987). As amostras foram maceradas em um tubo contendo 1 ml de acetona 80% (V/V) por 2 horas em escuridão até observar a descoloração total do material e, posteriormente, centrifugadas por 10 min a 10.000 rpm. A absorbância do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro a 663, 645 e 470 nm. Baseada nas absorbâncias obtidas foi calculada a concentração dos pigmentos pelas equações a seguir e o conteúdo total foi normalizado pela massa (fruto verde) ou área (folha fonte) de tecido.

Clorofila a = $12,25 * \text{Abs } 663 - 2,79 * \text{Abs } 645$

Clorofila b = $21,50 * \text{Abs } 645 - 5,10 * \text{Abs } 663$

Carotenóides totais = $(1000 * \text{Abs } 470 - 1,82 * \text{Clorofila a} - 85,02 * \text{Clorofila b})/198$

Para a quantificação dos pigmentos de fruto maduro foi utilizado o protocolo descrito por Heredia *et al.* (2009). 400 mg de tecido foram macerados em 4 ml de etanol absoluto e 3 ml de hexano (99%) por 1 h no escuro com agitação de 150 rpm. Posteriormente, foi acrescentado 1 ml de água MilliQ deionizada para permitir a separação das duas fases. A absorbância de 500 µl da fase superior (hexano) foi lida em espectrofotômetro a 503 e 478 nm. Baseada nas absorbâncias obtidas foi calculada a concentração dos pigmentos pelas equações a seguir e o conteúdo total foi normalizado pela massa de tecido.

$$\frac{\text{mg } \beta\text{-caroteno}}{100 \text{ g}} = \frac{[A_{478} - (A_{503} * 0,9285)] * M_{\beta\text{-car}} * V * 100}{m * E_{\beta\text{-car}}}$$

$$\frac{\text{mg licopeno}}{100 \text{ g}} = \frac{A_{503} * M_{\text{LIC}} * V * 100}{m * E_{\text{LIC}}}$$

onde A é a absorbância; M_{LIC} e $M_{\beta\text{-car}}$ são os pesos moleculares do licopeno (537 g/mol) e β -caroteno (533,85 g/mol), respectivamente; V é o volume da fase de hexano na extração (3 ml); m é a massa da amostra analisada, e; E_{LIC} e $E_{\beta\text{-car}}$ são os coeficientes de extinção do licopeno ($172 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e do β -caroteno ($139 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), respectivamente (Zscheille e Porter, 1947).

3.8.6. Extração e quantificação de aminoácidos, açúcares solúveis e amido

A extração de açúcares solúveis, aminoácidos totais e amido para folhas fonte e frutos maduros foram realizadas usando protocolos estabelecidos pelo nosso grupo (Fernie *et al.*, 2001).

Extração

A 10 mg de tecido triturado foram adicionados 250 µl de etanol 80% seguido de agitação por 20 min a 80 °C. Após centrifugação por 5 min a 14.000 rpm, o sobrenadante foi recuperado e o pellet submetido a duas novas extrações, com 150 µl de etanol 80% e 250 µl de etanol 50%, respectivamente. Os três sobrenadantes foram reunidos para posterior quantificação de açúcares e aminoácidos.

Ao pellet obtido foram adicionados 500 µl de etanol 40% e centrifugado por 10 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 400 µl de KOH 0,2 M. A suspensão foi incubada durante 1 h a 95 °C e, posteriormente, foram adicionados 70 µl de ácido acético 1 M seguido de uma centrifugação por 10 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi recuperado, e as amostras diluídas 1:3.

Determinação de açúcares

Para uma placa de 96 poços foi preparada uma mistura com 15,5 ml de tampão (HEPES/KOH 1 M, MgCl_2 30 mM pH 7,0) 0,1x, 480 μl de ATP [60 mg/ml], 480 μl de NADP [36 mg/ml] e 80 μl de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) [5 mg/ml]. Em cada poço, foram adicionados 50 μl do extrato etanólico e 160 μl da mistura descrita anteriormente. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 340 nm com medições a cada minuto. Uma vez que a OD se estabilizou foram adicionadas sucessivamente 1 μl de hexoquinase [1500 U/ml], 1 μl de fosfoglicose isomerase [2 mg/ml] e finalmente 1 μl de invertase 0,1 M. Para fazer os cálculos da concentração dos respectivos açúcares, foi usada a seguinte equação:

$$\mu\text{mol NADPH} = \Delta \text{OD} / (2.85 * 6.22)$$

Os valores foram normalizados pelo volume utilizado na medição e a massa de tecido.

Determinação de aminoácidos

Em um tubo de 1,5 ml foram adicionados 50 μl de tampão citrato/NaOH 1 M pH 5,2 com ácido ascórbico 0,2%, 50 μl de extrato etanólico, obtido como descrito anteriormente e 100 μl de solução de ninhidrina 1% (P/V em etanol 70%). Os tubos foram selados e incubados por 20 min a 95 °C, centrifugados por 10 seg a 10.000 rpm e finalmente as amostras foram dispostas em placa de 96 poços e lidas em espectrofotômetro a 570 nm.

Para realizar a estimativa do conteúdo total de aminoácidos, foi realizada uma curva padrão de Leucina substituindo os 50 μl da amostra por 0-2-5-10-20-50 μl de padrão de leucina completado com 50-48-45-40-30-0 μl de etanol 70%, respectivamente. Os valores foram normalizados pelo volume utilizado na medição e a massa de tecido.

Determinação de amido

A determinação enzimática foi realizada com o kit Starch (GO/P) Assay da empresa SIGMA (STA20), segundo instruções do fabricante. A produção de NADH foi medida em espectrofotômetro a 340 nm. Foi realizada uma curva padrão com glicose e o cálculo do conteúdo de amido foi realizado segundo a seguinte fórmula:

$$\mu\text{g/g peso fresco de amido} = \mu\text{mol de glicose} * 162 \text{ (massa da anidroglicose)}$$

Os valores foram normalizados pelo volume utilizado na medição e a massa de tecido.

3.8.7. Extração e quantificação de tocoferóis

A extração dos tocoferóis foi realizada como descrito por Fraser *et al.* (2000) com algumas modificações. Os tecidos analisados foram moídos em nitrogênio líquido e 400 mg do material extraídos com 1,5 ml de metanol puro. Após agitação por 1 min foi adicionado 1 ml de clorofórmio com BHT 0,1% (P/V) seguido de uma sonicação por 5 minutos. Posteriormente, foi agregado 1 ml de tampão Tris (pH 7,5 20 mM) /NaCl 1 M e as amostras foram centrifugadas por 1 min a 3.000 rpm por 5 min. A fase clorofórmica foi recuperada e o pellet submetido a duas novas re-extrações com clorofórmio + BHT 0,1% (P/V) uma primeira com 2 ml e uma última com 1 ml da solução. Os três extratos foram reunidos e o volume final ajustado a 4 ml com clorofórmio. Uma alíquota de 2 ml foi secada em nitrogênio gasoso, ressuspensas em 0,2 ml de solução hexano/isopropanol (99,5:0,5) e, antes da injeção, filtradas duas vezes.

O conteúdo de tocoferol foi determinado utilizando o cromatógrafo líquido Hewlett-Packard series 1100 HPLC System acoplado a um detector de fluorescência (Agilent Technologies, série 1200). A separação cromatográfica foi realizada em coluna de fase normal Metasil Si (250 mm × 4.6 mm, 5 µm, Varian, Metachem, Torrance, CA) operada em temperatura ambiente utilizando um sistema de eluição isocrático (fase móvel) de 99,5:0,5 hexano/isopropanol com fluxo de 1 ml min⁻¹. Os compostos eluídos foram detectados por fluorescência com excitação a 296 nm e emissão a 340 nm. Os diferentes isômeros de tocoferol foram identificados e quantificados por meio da comparação do tempo de retenção e das áreas dos picos dos padrões adquiridos comercialmente (Merck, tocopherol set Calbiochem, #613424). Uma curva de calibração foi realizada utilizando uma solução de tocoferóis com concentração variando entre 0,31 e 5 µg/mL para cada isômero. Desse modo, foi feita uma correlação linear entre as áreas dos picos e as concentrações injetadas de cada composto. A equação de regressão linear obtida para cada isômero foi utilizada para quantificar o conteúdo dos tocoferóis nas amostras.

3.8.8. Análise estatística

Os diferentes parâmetros analisados nas linhagens transgênicas foram avaliados estatisticamente de acordo com Sokal e Rohlf (1981). Quando o conjunto de dados obedeceu ao critério de homoscedasticidade, com ou sem transformação logarítmica ou de raiz quadrada, os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Duncan e/ou Tukey ($P < 0,05$) para comparação dos parâmetros entre as linhagens

transgênicas silenciadas e o controle. Na falta de homoscedasticidade, uma comparação não-paramétrica foi feita por meio do teste Kruskal Wallis ($P < 0,05$ e $0,1$). Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa InfoStat v. 2009 (www.infostat.com, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

4. RESULTADOS

4.1. A proteína SEC14 possui o domínio CRAL/TRIO e um peptídeo de direcionamento a cloroplastos

A partir do clone de *S. pennellii* contendo o gene *sec14* obtido pelo nosso grupo (Almeida *et al.*, 2011), e da região ortóloga de *S. lycopersicum* identificada no banco da SGN (Solanaceae Genmics Network), *contig* SL2.31ct07099, foram obtidas as sequências genômicas completas do gene *sec14* de ambas as espécies. Os alelos, incluindo as UTRs, possuem 2.669 e 2.624 pb para *S. lycopersicum* e *S. pennellii*, respectivamente, e apresentaram a mesma estrutura gênica com cinco éxons e quatro íntrons, variando apenas no tamanho dos íntrons (Figura 4). Em ambas sequências foi identificado o domínio CRAL/TRIO na região amino-terminal e o domínio SEC14 de ligação a lipídeos, característico da família protéica. Adicionalmente, foram preditos peptídeos de direcionamento ao cloroplasto, sendo que o do alelo de *S. lycopersicum* apresentou 59 aa e o de *S. pennellii* 36 aa. Não foram detectados domínios transmembrana pela análise *in silico*. Ao todo, foram detectados quatro polimorfismos de aminoácidos, um em cada domínio, outro no peptídeo sinal e por último um na região carboxi-terminal da proteína (Figura 5).

Figura 4. Análise comparativa da estrutura gênica entre os alelos de *S. lycopersicum* e *S. pennellii* para o gene *sec14*.
Os blocos cinza e verdes correspondem às UTRs e éxons, respectivamente. A porcentagem de identidade e *indels* (XX) entre ambos os genótipos encontra-se indicada para cada região individualmente.

Figura 5. Análise comparativa da sequência protéica entre os alelos de *S. lycopersicum* e *S. pennellii* para a proteína SEC14.
Os polimorfismos de aminoácidos entre os genótipos encontram-se indicados com linhas vermelhas. Os peptídeos de direcionamento a cloroplasto estão indicados com uma linha vermelha e verde para *S. lycopersicum* e *S. pennellii*, respectivamente. Os domínios protéicos identificados estão demarcados com blocos cinza. O motivo típico de ligação a moléculas hidrofóbicas LLRFL^R/_K AR, encontra-se marcado em azul.

Para avaliar a diversidade das proteínas SEC14 foi realizada uma análise filogenética contendo sequências de *A. thaliana*, *Ricinus communis*, *O. sativa* e *Z. mays*, homólogas às previamente caracterizadas funcionalmente, e foram incluídas as sequências obtidas neste trabalho de *S. lycopersicum* e *S. pennellii*. A topologia da árvore permitiu identificar dois clados, os quais podem ser diferenciados claramente pela presença dos domínios protéicos diferenciais (Figura 6). As proteínas de *S. lycopersicum* e *S. pennellii* estudadas neste trabalho, embora possuam os mesmos domínios, CRAL/TRIO e SEC14, que as descritas por Peterman *et al.* (2004), possuem peptídeo sinal para cloroplasto o qual não tinha sido reportado na literatura neste tipo de proteínas.

Figura 6. Análise filogenética das proteínas SEC14.

À direita da árvore estão indicadas as estruturas protéicas de cada clado, assim como as funções demonstradas para cada grupo. * Sequências extraídas de Vincent *et al.* (2005). * Sequências extraídas de Peterman *et al.* (2004). As sequências descritas neste trabalho estão destacadas na caixa laranja. At: *A. thaliana*; Rc: *R. communis*; Os: *O. sativa*; Zm: *Z. mays*; Sl: *S. lycopersicum*; Sp: *S. pennellii*. PATL: proteína patelina. CytFac: Fator citosólico. RetBin: Proteína de ligação a retinaldeído.

4.2. A proteína SEC14 é direcionada a cloroplasto

Para somar evidências sobre a função da proteína SEC14 foi desenhado um experimento de localização subcelular com o intuito de identificar o compartimento onde essa proteína atua. Devido ao fato de ter sido identificada uma substituição não-sinônima entre as sequências protéicas de *S. lycopersicum* e *S. pennellii*, que altera o tamanho do peptídeo sinal determinado *in silico*, foram analisados ambos os alelos.

Para isso, foram obtidas as construções pK7FWG2-SEC14Lyc e pK7FWG2-SEC14Pen contendo o fragmento de 1.272 pb correspondente ao cDNA completo das proteínas SEC14, desde o ATG até o códon anterior ao de fim da tradução, fusionado à sequência codificante da proteína GFP. Cultivos de *A. tumefaciens* contendo cada uma das construções supramencionadas foram infiltrados em folhas de *N. benthamiana*. Após 48 h, foram montadas lâminas com discos de folhas infiltradas e visualizadas ao microscópio confocal. As proteínas de fusão de ambos os alelos, foram localizadas no cloroplasto das células, evidenciada pela sobreposição da emissão da proteína GFP e da clorofila, sem apresentar diferenças no padrão (Figura 7).

Figura 7. Localização subcelular da proteína de fusão SEC14::GFP.

Esquema da construção pK7FWG2-SEC14 (A). Células de mesófilo de folhas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com *A. tumefaciens* (GV3101) contendo a construção pK7FWG2-SEC14Lyc (B, C, D) e pK7FWG2-SEC14Pen (E, F, G). Sobreposição das imagens de fluorescência da clorofila e de GFP (B e E). Imagem da fluorescência de GFP (C e F). Imagem da fluorescência da clorofila (D e G). A barra da escala corresponde a 10 µm. LB: borde esquerdo. Kan: cassete de resistência a canamicina. T35s terminador 35s do CaMV. eGFP: proteína fluorescente verde. cDNA completo: cDNA dos respectivos alelos. p35s: promotor 35s do CaMV. RB: Borde direito.

4.3. Obtenção das plantas silenciadas para o gene *sec14*

Para demonstrar o envolvimento do gene *sec14* na determinação das diferenças observadas entre *S. lycopersicum* (cv. M82) e a IL 9-2 no conteúdo de tocoferol nos frutos, foi adotada a estratégia de silenciamento gênico por RNA de

interferência. Dessa forma, foi obtida a construção pK7GWIWG2(I)Sec14 contendo um fragmento de 224 pb do quinto éxon do gene (Figura 8). A escolha desse fragmento foi determinada a partir do alinhamento utilizado para a análise filogenética, realizada no item 4.1 deste capítulo, de maneira que o silenciamento fosse específico para o gene de interesse evitando interferir na expressão de outros genes homólogos. Por meio da transformação genética mediada por *A. tumefaciens*, foram obtidas 19 linhagens independentes de tomate que enraizaram em presença do agente seletivo.

Figura 8. Representação esquemática do vetor pK7GWIWG2(I)sec14.

Construção utilizada para a obtenção das plantas transgênicas de tomate *S. lycopersicum* (cv. Moneymaker) RNAi:sec14. LB: borda esquerda. Kan: cassette de resistência a canamicina. T: terminador 35s do CaMV. 224b: fragmento da sequência codificante do gene *sec14*. p35s: promotor 35s do CaMV. RB: borda direita.

A presença do transgene nas linhagens obtidas foi verificada por meio de PCR utilizando iniciadores específicos para o promotor 35S. Assim, foram identificados três escapes e determinada uma eficiência de transformação de 84,2% (Tabela 3). Posteriormente, nove das linhagens positivas foram sincronizadas por meio de estaquia junto aos respectivos controles, e foi avaliado o silenciamento do gene alvo utilizando qPCR. A Figura 9 apresenta os dados de expressão relativa do gene *sec14* demonstrando que sete das linhagens transgênicas possuem níveis de RNAm mais baixos que o controle selvagem, resultando assim em uma eficiência de silenciamento do 77,8% (Tabela 3).

Tabela 3. Eficiência da transformação de tomate com a construção para silenciamento do gene *sec14*.

Gene	Linhagens regeneradas	Linhagens positivas por PCR	Eficiência de transformação %	Linhagens avaliadas por qPCR	Linhagens silenciadas	% Plantas silenciadas
<i>sec14</i>	19	16	84,2	9	8	88,8

Figura 9. Análise de expressão do gene *sec14* nas linhagens transgênicas.

Os resultados representam a média de três réplicas técnicas. Os valores estão expressos como a abundância relativa do RNAm comparado ao controle *S. lycopersicum* (cv. Moneymaker). Na caixa preta destacam-se as linhagens selecionadas para avaliação fenotípica. *Diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,005$).

4.4. Caracterização fenotípica das linhagens transgênicas

Para a avaliação fenotípica foram selecionadas cinco linhagens (RNAi:*sec14-2*, RNAi:*sec14-15*, RNAi:*sec14-18*, RNAi:*sec14-19* e RNAi:*sec14-24*) que apresentaram a maior redução dos níveis de RNAm do gene *sec14* (Figura 9). As linhagens selecionadas foram propagadas vegetativamente por meio de estaquia gerando seis réplicas de cada uma para caracterização fenotípica. Ao longo do experimento foi descartada a linhagem RNAi:*sec14-2* já que quatro dos seis clones morreram, ficando assim quatro linhagens a serem caracterizadas.

4.4.1. Verificação do nível de silenciamento nas linhagens transgênicas.

Para verificar o silenciamento nas réplicas biológicas obtidas, os níveis de RNAm do gene *sec14* foram verificados novamente em folhas fonte e frutos maduros por qPCR. As quatro linhagens selecionadas mostraram a redução na expressão inicialmente verificada, para ambos os tecidos avaliados (Figura 10). Unicamente, a linhagem RNAi:*sec14-24* não apresentou uma redução significativa nos níveis de RNAm em fruto maduro, porém, o fenótipo mostrou-se conservado ao longo da caracterização.

Figura 10. Análise de expressão do gene *sec14* nas linhagens transgênicas selecionadas.

Os resultados representam a média de seis réplicas biológicas com três réplicas técnicas cada uma. Os valores estão expressos como a abundância relativa do RNAm comparado ao controle *S. lycopersicum* (cv. Moneymaker). *Diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

4.4.2. O silenciamento do gene *sec14* altera o funcionamento da maquinaria fotossintética

Para avaliar o possível efeito do silenciamento do gene *sec14* na fotossíntese foram realizadas medições de intercâmbio gasoso e fluorescência da clorofila a diferentes densidades de fluxo de fótons. Não foram observadas alterações na taxa de assimilação de CO₂, condutância estomática e transpiração (Figura 11). De forma contrastante, a redução da expressão do gene *sec14* provocou uma alteração clara na taxa de transporte de elétrons, no *quenching* fotoquímico e não-fotoquímico, eficiência do fotossistema II e no acúmulo de quinona reduzida (Figura 11 e 12).

Figura 11. Parâmetros fotossintéticos e de trocas gasosas nas linhagens transgênicas.

ETR: taxa relativa de transporte de elétrons. Transpiração e condutância estomática a 1.200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os valores apresentam a média obtida em seis réplicas biológicas. *Diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

Figura 12: Parâmetros da fluorescência da clorofila nas linhagens transgênicas.

qP: *quenching* fotoquímico. NPQ: *quenching* não-fotoquímico. 1-pQ: acúmulo do aceitador quinona reduzida. Os dados representam a média obtida em seis réplicas biológicas. *Diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

4.4.3. O silenciamento do gene *sec14* não altera o conteúdo de pigmentos

De forma geral, o conteúdo de pigmentos em folha fonte, frutos verdes e maduros, não apresentou diferenças significativas quando comparado ao controle *S. lycopersicum* (cv. Moneymaker) (Figura 13). Mesmo que algumas linhagens (RNAi:sec14-15 e 18) mostrassem alterações nos pigmentos para fruto verde e maduro, respectivamente, não foi um perfil conservado no restante das linhagens.

Figura 13. Conteúdo de pigmentos nos diferentes tecidos nas linhagens transgênicas.

As barras indicam a média obtida em no mínimo três e quatro réplicas biológicas para frutos e folha fonte, respectivamente. * Diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$). PF: peso fresco.

4.4.4. O silenciamento do gene *sec14* altera parcialmente o conteúdo de açúcares e amido

A determinação do conteúdo de açúcares solúveis e amido revelou uma alteração parcial no perfil desses metabólitos nas linhagens transgênicas. Em folha fonte é observada uma queda conteúdo dos fotoassimilados avaliados. No fruto maduro não foi possível observar uma tendência homogênea para todas as linhagens, sendo que para duas linhagens foi observado menor conteúdo de frutose e maior de amido (Figura 14).

Figura 14. Conteúdo de açúcares e amido nas linhagens transgênicas.

As barras indicam a média obtida em no mínimo quatro e cinco réplicas biológicas para fruto maduro e folha fonte, respectivamente. *Diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

4.4.5. O silenciamento do gene *sec14* não altera o conteúdo de aminoácidos totais

Foram quantificados os aminoácidos totais em folha fonte e fruto maduro das plantas transgênicas, para assim, avaliar o possível efeito do silenciamento do gene *sec14* no metabolismo de nitrogênio. Não foram detectadas alterações nos conteúdos dos aminoácidos para nenhuma das linhagens (Figura 15).

Figura 15. Conteúdo de aminoácidos totais nas linhagens transgênicas.

As barras indicam a média obtida em no mínimo três e cinco réplicas biológicas para fruto maduro e folha fonte, respectivamente. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

4.4.6. O silenciamento do gene *sec14* altera os conteúdos de tocoferóis em folha fonte e fruto maduro

Com o objetivo de testar a hipótese do envolvimento do gene *sec14* no metabolismo de vitamina E, foram quantificados os quatro isômeros de tocoferol (α , β , γ , e δ) em folha fonte e dreno e, fruto verde e maduro. Foi possível detectar os isômeros α e γ para todos os tecidos, porém β e δ só foram observados em folha dreno e fruto maduro. Em folha dreno e fruto verde não foram detectadas alterações no conteúdo dos diferentes isômeros analisados nem no tocoferol total (Figura 16 e 18). Já em folha fonte houve uma queda no conteúdo de ambos isômeros identificados, α e γ , e consequentemente no tocoferol total (Figura 17). Por último, no fruto maduro, três das linhagens transgênicas apresentaram baixos níveis de α -tocopherol quando comparados ao genótipo controle, que se refletiu numa queda no conteúdo de tocoferol total (Figura 19).

Figura 17. Conteúdo de tocoferóis em folhas fonte das linhagens transgênicas. As barras indicam a média em no mínimo cinco réplicas biológicas. * Diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$). PF: peso fresco.

Figura 18. Conteúdo de tocoferóis em frutos verdes das linhagens transgênicas. As barras representam a média obtida em no mínimo três réplicas biológicas. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$). PF: peso fresco.

4.4.7. A expressão dos genes que codificam para as enzimas da rota central de VTE não foi alterada

Com o intuito de avaliar o papel da proteína SEC14 na regulação da biossíntese de tocoferol, foram verificados os níveis de RNAm das enzimas da rota central (Figura 2). De forma geral, não foram encontradas variações nos níveis de RNAm dos genes avaliados, mas no caso da enzima γ-tocoferol C-metil transferase (VTE4) foi observada uma alteração da sua expressão unicamente nas linhagens RNAi:sec14-19 e RNAi:sec14:24, não sendo representativo quando comparado com o restante das linhagens (Figura 20).

Figura 20. Análise de expressão das enzimas da rota central de biossíntese de tocoferol nas plantas transgênicas.

Os resultados representam a média de três réplicas técnicas de, no mínimo, quatro e cinco réplicas biológicas para fruto maduro e folha fonte, respectivamente. Os valores estão expressos como abundância relativa do RNAi comparado ao controle *S. lycopersicum* (cv. Moneymaker).

*Diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

4.4.8. O silenciamento do gene *sec14* não altera os indicadores de produção das linhagens transgênicas

Para avaliar a produção das linhagens transgênicas foi medido o peso médio de frutos verdes e maduros, a biomassa fresca da planta e posteriormente o índice de colheita. Para nenhum dos parâmetros foram encontradas diferenças significativas (Tabela 4). Estes resultados indicam que a redução dos níveis da proteína SEC14 não tem efeito direto na produção da planta assim como na repartição de fotoassimilados.

Tabela 4. Indicadores de produção das linhagens transgênicas RNAi:sec14

Linhagem	FRUTO VERDE (g/fruto)	FRUTO MADURO (g/fruto)	BIOMASSA (g/planta sem raiz)	ÍNDICE DE COLHEITA*
RNAi : SEC14 -15	15,67 ± 5,44	49 ± 5,89	806 ± 182,66	31,52 ± 5,06
RNAi : SEC14 -18	24,44 ± 3,85	37,02 ± 2,31	1013 ± 116,21	37,24 ± 9,08
RNAi : SEC14 -19	22,6 ± 4,71	35,34 ± 1,88	855,5 ± 104,40	39,06 ± 15,24
RNAi : SEC14 -24	21,07 ± 4,21	39,94 ± 3,92	980,2 ± 72,84	31,58 ± 6,21
Controle	20,63 ± 3,33	38,28 ± 1,60	843,38 ± 97,49	42,1 ± 11,55

Dados correspondentes à colheita das plantas após quatro meses em casa de vegetação. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

As proteínas SEC14, de *S. lycopersicum* e *S. pennellii*, associadas a um QTL de α -tocoferol no cromossomo 9 (Almeida *et al.*, 2011) possuem uma estrutura relativamente conservada com as previamente descritas. Na sua estrutura foram preditos domínios de ligação a moléculas hidrofóbicas como o SEC14, característico da família, e o CRAL-TRIO, descrito em mamíferos como de ligação a α -tocoferol (Figura 5). Mais ainda, as proteínas apresentaram o motivo LLRFL^R/_k AR, conservado nas espécies mais distantes e que parece ser determinante na especificidade da ligação a moléculas hidrofóbicas (Joaunicc *et al.*, 1998). Uma característica diferencial encontrada foi a presença de um peptídeo de direcionamento a cloroplasto para ambos os alelos, o qual não tinha sido identificado previamente nessa família e que sugere uma função inédita. As proteínas *S. pennellii* SEC14 e *S. lycopersicum* SEC14, apresentaram polimorfismos de aminoácidos nos domínios funcionais identificados que poderiam determinar, eventualmente, diferenças na atividade. A presença de um polimorfismo no extremo N-terminal da proteína determina a variação no comprimento do peptídeo sinal dos alelos, no entanto não foi observada nenhuma alteração no padrão de localização plastidial em ambas as espécies (Figura 7). É oportuno ressaltar que o estudo do perfil transcricional dos alelos, realizado pelo nosso grupo (de Godoy *et al.*, comunicação pessoal), não apresentou diferenças significativas para nenhum dos tecidos avaliados.

A biossíntese da VTE ocorre no cloroplasto e as enzimas da rota central encontram-se localizadas em diferentes compartimentos suborganelares. A VTE2, VTE3 e VTE4 encontram-se associadas à membrana interna do envelope (Ferro *et al.*, 2003; Froehlich *et al.*, 2003; Brink *et al.*, 1995; Zbierzak *et al.*, 2010). Por sua vez, a VTE1 encontra-se localizada nos plastoglóbulos (Kessler *et al.*, 1999, Austin *et al.*, 2006), partículas fundamentais na biossíntese e acúmulo de tocoferóis. A localização plastidial da proteína SEC14 somado ao fato da biossíntese de VTE ocorrer nesta mesma organela reforça a hipótese do envolvimento desta proteína na alteração dos conteúdos de α -tocoferol identificado na IL 9-2 que levaram a identificação desse QTL no *bin* 9E.

Com o intuito de demonstrar o envolvimento da proteína SEC14 no metabolismo de tocoferol foi adotada a estratégia de silenciamento estável por RNAi. Foram obtidas plantas transgênicas de tomate expressando uma molécula dupla fita de RNA correspondente a um fragmento de região codificante do gene. Foram

selecionadas cinco linhagens que apresentaram uma redução nos níveis de RNAm de 50-80% em folha e 40-80% em frutos maduros.

As linhagens transgênicas revelaram uma queda no conteúdo de tocoferol total e do isômero α tanto em folha fonte quanto em fruto maduro; o isômero γ também apresentou queda em folha fonte (Figura 17 e 19). Por outro lado, foi observada uma drástica alteração da maquinaria fotossintética.

A VTE está distribuída entre as membranas do tilacóide (89%), envelope (8%), e plastoglôbulos (3%) (Lichtenthaler, 1968, 2007; Matringe *et al.*, 2008; Vidi *et al.*, 2006), protegendo, sinergicamente com xantofilas (Havaux *et al.*, 2005) e outros sistemas antioxidantes (Kanwischer *et al.*, 2005), a fase lipídica da membrana de danos fotooxidativos (Matringe *et al.*, 2008). Por outro lado, oxigênios singletes induzem perdas na atividade do fotossistema II (PSII), diminuindo os níveis das proteínas D1 e levando a uma degradação dos pigmentos durante a fotoinibição do PSII (Krieger-Liszkay e Trebst, 2006). Desta maneira, diversos estudos têm mostrado a VTE como protetora do PSII, atuando na eliminação (*quenching*) dos oxigênios singletes, já que uma molécula de α -tocoferol é capaz de desativar centenas de oxigênios singletes por meio de processos físicos e químicos (Falk e Munné-Bosch, 2010). Assim, a diminuição no transporte de elétrons, evidenciado pela baixa eficiência do fotossistema II e no acúmulo de plastoquinonas reduzidas (Figura 11 e 12), pode ser explicado pela queda nos conteúdos de tocoferol e consequente redução da eficiência do sistema antioxidante. O aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), produzidas pelo sistema de transporte de elétrons e fotossistemas (Foyer e Nocter, 2003, 2005), levaria ao acúmulo de plastoquinonas reduzidas e, finalmente, à saturação do fluxo de transporte de elétrons. Para verificar essa hipótese, é desejável realizar uma quantificação de ROS nas plantas transgênicas a fim de verificar a existência do estresse oxidativo proposto.

Quando as folhas passam do escuro à luz, os centros de reação do PSII são fechados progressivamente. Isso desencadeia em um aumento na fluorescência da clorofila explicado principalmente por dois processos: *i*) o *quenching* fotoquímico que é o aumento na taxa de transporte de elétrons a partir do PSII e *ii*) o *quenching* não-fotoquímico, que é o aumento na conversão da energia luminosa em calor (Maxwell e Johnson, 2000). Quando a cadeia de transporte de elétrons se encontra saturada é observado um aumento do *quenching* não-fotoquímico e uma diminuição do *quenching* fotoquímico, o qual foi verificado nas linhagens transgênicas (Figura 12). Ainda mais, a

redução observada no teor de açúcares solúveis e amido, nas folhas fonte, confirma a queda na eficiência fotossintética de forma geral (Figura 14).

A análise da expressão dos genes que codificam para as enzimas da rota central de VTE não apresentou alterações nas plantas silenciadas (Figura 20), sendo assim, como explicar o baixo conteúdo de tocoferol observado? O potencial antioxidativo do tocoferol não depende apenas das suas propriedades químicas, mas também da mobilidade e acessibilidade dentro da membrana (Serbinova *et al.*, 1991). Nesse sentido, os tocoferóis estão associados à eliminação de radicais peroxil dos lipídeos, que são responsáveis pela propagação da peroxidação lipídica nas membranas (Liebler, 1993). Assim, é proposto que a proteína SEC14 atue no transporte e distribuição de tocoferóis nos diferentes compartimentos dos plastídios. Desta maneira, a instabilidade das membranas levaria à posterior desorganização da estrutura do cloroplasto, incluindo eventualmente os plastoglóbulos, comprometendo o posicionamento da maquinaria biossintética de tococromanóis resultando assim, na queda nos conteúdos de VTE (Figura 21). Por outro lado, não pode ser descartada uma possível função da proteína SEC14 na reciclagem de tocoferóis oxidados, um sistema que foi recentemente caracterizado em plantas (Kobayashi e DellaPenna, 2008). Neste sentido, para demonstrar o efeito da queda dos conteúdos da VTE na desestabilização das membranas, seria interessante quantificar lipídeos e tocoferóis oxidados e realizar análises ultra-estruturais dos cloroplastos nas linhagens transgênicas.

Da mesma maneira que em folhas, os resultados obtidos da caracterização fenotípica dos frutos demonstram que o silenciamento do gene *sec14* levou também a uma queda no conteúdo de tocoferol (Figura 19). No entanto, pelo heterotrofismo do fruto maduro, não foi possível evidenciar um impacto drástico no conteúdo de açúcares, sugerindo que o possível estresse oxidativo, eventualmente produzido pelo metabolismo respiratório, possa ser neutralizado por sistemas antioxidantes alternativos (Falk e Munné-Bosch, 2010).

Concluindo, o aumento expressivo no conteúdo de VTE observado na IL 9-2, poderia ser ocasionado pela maior eficiência do alelo selvagem no sistema de reciclagem de tocoferóis oxidados, embora pouco se conheça acerca da taxa de restituição de tocoferóis em plantas. Considerando a hipótese da SEC14 atuar na distribuição do tocoferol e, por tanto, contribuir para a estabilidade das membranas; é pouco provável que sejam as diferenças alélicas pontuais as determinantes do alto conteúdo de VTE na IL. Nesse caso, a própria rota biossintética poderia atuar como

fator limitante, seja pelo suprimento de intermediários ou pela atividade de suas enzimas. Como mencionado na introdução, no mesmo fragmento do cromossomo 9, foram identificados os genes que codificam para as enzimas VTE3(1) e VTE5. Assim, a atividade dos três alelos selvagens, de forma integrada, poderia explicar o incremento de VTE observado na IL. Nesse sentido, o nosso grupo encontra-se desenvolvendo paralelamente estudos funcionais para esses outros dois genes candidatos. Adicionalmente, pretende-se aprofundar a caracterização funcional da proteína SEC14 por meio de caracterização de mutantes, expressão da proteína em sistemas heterólogos (*E. coli*) e experimentos de interação da proteína com α -tocoferol.

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para a compreensão dos mecanismos de biossíntese e acúmulo de um composto antioxidante de alto interesse na nutrição humana. Além disso, soma evidências para o melhor entendimento de processos vitais da fisiologia vegetal. Desta forma, o conhecimento gerado abre perspectivas para futuras aplicações biotecnológicas, que permitam cobrir a crescente demanda por alimentos nutracêuticos.

Figura 21. Modelo proposto da função da proteína SEC14.

As etapas envolvidas na biossíntese de VTE estão representadas por elipses azuis. As etapas da biossíntese de tocoferol estão indicadas com setas azuis. O transporte de moléculas de tocoferol (como exemplo α-tocoferol) está marcado com setas pretas. A proteína SEC14 é representada por uma elipse laranja associada a moléculas de α-tocoferol, transportando-as aos diferentes compartimentos suborganelares. Em destaque, no canto superior direito está detalhado o processo de peroxidação lipídica, induzido pelas ROS. Mostra-se também a reciclagem de tocoferóis oxidados mediado pelo ciclo de ascorbato-glutationa onde, provavelmente, também atua a proteína SEC14.

6. CONCLUSÕES

Com a caracterização funcional do gene *sec14* que abrange a análise da estrutura gênica e protéica, determinação da localização subcelular e, análise fenotípica de plantas silenciadas é possível estabelecer as seguintes conclusões:

- 1) A proteína SEC14 participa do sistema antioxidante mediado por tocoferol;
- 2) A deficiência em SEC14 leva a estresse oxidativo alterando a eficiência fotossintética;
- 3) O impacto do silenciamento da proteína SEC14 sobre o conteúdo de VTE estaria determinado pela desorganização espacial das enzimas da rota biossintética e/ou pela sua participação no reciclado desses compostos;
- 4) A deficiência de proteína SEC14 não perturba o metabolismo de açúcares em fruto pela sua condição heterotrófica;
- 5) As evidências coletadas reforçam o postulado que a função da VTE como antioxidante não está só determinada pelas suas propriedades químicas, mas também pela mobilidade e acessibilidade dentro da membrana, e;
- 6) Os resultados obtidos permitem propôr à SEC14 como uma proteína com estrutura e função inéditas em plantas.

7. REFERÊNCIAS

- Abbasi AR, Saur A, Hennig P, Tschiersch H, Hajirezaei M, Hofius D, Sonnewald U, Voll LM. 2008. Tocopherol deficiency in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants leads to accelerated senescence. *Plant Cell and Environment* 32, 144-57.
- Abbasi AR, Hajirezaei M, Hofius D, Sonnewald U, Voll LM. 2009. Specific roles of alpha- and gamma-tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco. *Plant Physiology* 143, 1720-38.
- Abushita AA, Hebshi EA, Daood HG, Biacs, PA. 1997. Determination of antioxidant vitamins in tomatoes. *Food Chemistry* 60, 207-212.
- Almeida J, Quadrana L, Asís R, Setta N, de Godoy F, Bermúdez L, Otaiza SN, Corrêa da Silva JV, Fernie AR, Carrari F, Rossi M. 2011. Genetic dissection of vitamin E biosynthesis in tomato. *Journal of Experimental Botany* (no prelo).
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410.
- Austin JR 2nd, Frost E, Vidi PA, Kessler F, Staehelin LA. 2006. Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *The Plant Cell* 18, 1693-1703.
- Bankaitis VA, Malehorn DE, Emr SD, Greene R. 1989. The *Sacharomyces cerevisiae* SEC14 gene encodes a cytosolic factor that is required for transport of secretory proteins from the yeast Golgi complex. *The Journal of cell biology* 108, 1271-128.
- Bankaitis VA, Aitken JR, Cleves AE, Dowhan W. 1990. An essential role for a phospholipid transfer protein in yeast Golgi function. *Nature* 347, 561-562.
- Bankaitis VA, Mousley CJ, Schaaf G. 2009. The Sec14 superfamily and mechanisms for crosstalk between lipid metabolism and lipid signaling. *Trends in Biochemical Sciences* 35, 150-60.
- Bankaitis VA, Mousley CJ, Schaaf G. 2010. The Sec14 superfamily and mechanisms for crosstalk between lipid metabolism and lipid signaling. *Trends Biochemical Sciences* 35, 150-60.
- Bell SJ, Grochoski GT. 2008. How safe is vitamin E supplementation? *Critical reviews in food science and nutrition* 48, 760-74.
- Bréhélin C, Kessler F, Van Wijk KJ. 2007. Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids. *TRENDS in Plant Science* 12, 260-265.
- Brink S, Fischer K, Klösgen RB, Flügge UI. 1995. Sorting of nuclear-encoded chloroplastmembrane proteins to the envelope and the thylakoid membrane. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 20808-20815.
- Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* 16, 10881-10890.
- Corrêa da Silva JV, Fernie AR, Carrari F, Rossi M. 2011. Genetic dissection of vitamin E biosynthesis in tomato. *Journal of experimental botany* (no prelo).
- Das S, Gautam N, Dey SK, Maiti T, Roy S. 2009. Oxidative stress in the brain of nicotine-induced toxicity: protective role of *Andrographis paniculata* Nees and vitamin E. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 34, 124-135.
- DellaPenna D. 2005a. A decade of progress in understanding vitamin E synthesis in plants. *Journal of plant physiology* 162, 729-37.
- DellaPenna D. 2005b. Progress in the dissection and manipulation of vitamin E synthesis. *Trends in plant science* 10, 574-9.
- DellaPenna D, Last R.L. 2006a. Progress in the dissection and manipulation of plant vitamin E biosynthesis. *Physiologia Plantarum* 126, 356-368.

- DellaPenna D, Pogson BJ. 2006b. Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annual review of plant biology* 57, 711-38.
- Di Rienzo JA. 2009. Statistical software for the analysis of experiments of functional genomics. RDNDA. Argentina. 756587.<http://sites.google.com/site/fgStatistics/>
- Falk J, Munné-Bosch S. 2010. Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. *Journal of Experimental Botany* 61, 1549-1566.
- Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe G, Kruger NJ. 2001. Fructose 2,6-biphosphate actiates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Plantta* 212, 250-263.
- Ferro M, Salvi D, Brugière S, Miras S, Kowalski S, Louwagie M, Garin J, Joyard J, Rolland N. 2003. Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and Cellular Proteomics* 2, 325-345.
- Foyer CH, Noctor G. 2003. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologica Plantarum* 119, 355-364.
- Foyer CH, Noctor G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic interface between stress perception and physiological resonses. *The Plant Cell* 17, 1866-1875.
- Fraser PD, Pinto ME, Holloway DE, Bramley PM. 2000. Application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolite profiling of plant isoprenoids. *The Plant Journal* 24, 551-558.
- Froehlich JE, Wilkerson CG, Ray WK, McAndrew RS, Osteryoung KW, Gage DA, Phinney BS. 2003. Proteomic study of the *Arabidopsis thaliana* chloroplastic envelope membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis. *Journal of Proteome Research* 2, 413-425.
- Frusciante L, Carli P, Ercolano MR, Pernice R, Di Matteo A, Fogliano V, Pellegrini N. 2007. Antioxidant nutritional quality of tomato. *Molecular nutrition & food research* 51, 609-17.
- Havaux M, Eymery F, Porfirova S, Rey P, Dörman P. 2005. Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 17, 3451-3469.
- Heredia A, Peinado I, Barrera C, Grau AA. 2009. Influence of process variables on colour changes, carotenoids retention and cellular tissue alteration of cherry tomato during osmotic dehydration. *Journal of Food Composition and Analysis* 22, 285-294.
- Hoeckema A, Hirsch PR, Hooykas PJ, Schilperoot RA. 1983. A binay plant vector strategy based on separation of vir and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303, 179-180.
- Jouannic N, Lepetit M, Vergnolle C, Cantrel C, Gardies AM, Kader JC, Arondel V. 1998. Isolation of a cDNA from *Arabidopsis thaliana* that complements the sec14 mutant of yeast. *European journal of biochemistry* 258, 402-410.
- Kamal-Eldin A, Appelqvist LA. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31, 671-701.
- Kanwischer M, Porfirova S, Bergmüller E, Dörmann P. 2005. Alterations in tocopherol cyclase activity in transgenic and mutant plants of *Arabidopsis* affect tocopherol content, tocopherol composition, and oxidative stress. *Plant Physiology* 137, 713-723.
- Kapranov P, Routt SM, Bankaitis VA, de Bruijn FJ, Szczygłowski K. 2001. Nodule-specific regulation of phosphatidylinositol transfer protein expression in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* 13, 1369-1382.

- Karimi M, Inzé D, Depicker A. 2002. GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* 7, 193-195.
- Kearns MA, Monks DE, Fang M, Rivas MP, Courtney PD, Chen J, Prestwich GD, Theibert AB, Dewey RE, Bankaitis VA. 1998. Novel developmentally regulated phosphoinositide binding proteins from soybean whose expression bypasses the requirement for an essential phosphatidylinositol transfer protein in yeast. *The EMBO Journal* 17, 4004-4017.
- Kessler F, Schnell D, Blobel G. 1999. Identification of proteins associated with plastoglobules isolated from pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts. *Planta* 208, 107-113.
- Kobayashi N, DellaPenna D. 2008. Tocopherol metabolism, oxidation and recycling under high light stress in Arabidopsis. *Plant Journal* 55, 607-618.
- Krieger-Liszkay A, Trebst A. 2006. Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre. *Journal of Experimental Botany* 57, 1677-1684.
- Kruk J, Holländer-Czytko H, Oettmeier W, Trebst A. 2005. Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. *Journal of plant physiology* 162, 749-57.
- Li X, Routt SM, Xie Z, Cui X, Fang M, Kearns MA, Bard M, Kirsch DR, Bankaitis VA. 2002. Identification of a novel family of nonclassic yeast phosphatidylinositol transfer proteins whose function modulates phospholipase D activity and Sec14p-independent cell growth. *Molecular biology of the cell* 11, 1989-2005.
- Li Y, Wang Z, Sun X, Tang K. 2008. The current opinions on the functions of tocopherol based on the genetic manipulation of tocopherol biosynthesis in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 50, 1057-1069.
- Lichtenthaler HK. 1968. Plastoglobuli and the fine structure of plastids. *Endeavor* 27, 144-149.
- Lichtenthaler HK. 2007. Biosynthesis, accumulation and emission of carotenoids, alpha-tocopherol, plastoquinone, and isoprene in leaves under high photosynthetic irradiance. *Photosynthesis Research* 92, 163-179.
- Liebler DC. 1993. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Critical Reviews in Toxicology* 23, 147-169.
- Matringe M, Ksas B, Rey P, Havaux M. 2008. Tocotrienols, the unsaturated forms of vitamin E, can function as antioxidants and lipid protectors in tobacco leaves. *Plant Physiology* 147, 764-778.
- Mène-Saffrané L, DellaPenna D. 2009. Biosynthesis, regulation and functions of tocopherols in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 301-309.
- Mueller LA, Solow TH, Taylor N, Skwarecki B, Buels R, Bins J, Lin C, Wright MH, Ahrens R, Wang Y, Herbst EV, Keyder ER, Menda N, Zamir D, Tanksley SD. 2005. The SOL Genomics Network. A Comparative Resource for Solanaceae Biology and Beyond. *Plant Physiology* 138, 1310-1317.
- Mueller L, Mills A, Skwarecki B, Buels R, Menda N, Tanksley S. 2008. The SGN comparative map viewer. *Bioinformatics* 24, 422-423.
- Mueller, L. et al. 2009. A snapshot of the emerging tomato genome sequence. *The Plant Genome* 2, 78-92.
- Munné-Bosch S, Alegre L. 2002. The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21, 31-57.
- Munné-Bosch S, Shikanai T, Asada K. 2005. Enhanced ferredoxin-dependent cyclic electron flow around photosystem I and alpha-tocopherol quinone accumulation in water-stressed ndhB-inactivated tobacco mutants. *Planta* 222, 502-11.
- Ogbonna JC. 2009. Microbiological production of tocopherols: current state and prospects. *Applied microbiology and biotechnology* 84, 217-25.

- Peterman TK, Ohol YM, McReynolds LJ, Luna EJ. 2004. Patellin1, a novel Sec14-like protein, localizes to the cell plate and binds phosphoinositides. *Plant Physiology* 136, 3080–3094.
- Peterman TK, Sequeira A, Samia S, Lunde EE. 2006. Molecular cloning and characterization of patellin1, a novel sec14-related protein, from zucchini (*Cucurbita pepo*). *Journal of Plant Physiology* 163, 1150–1158.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30, 9–16.
- Pryor WA. 2000. Oxidative stress status-the fifth set. *Free radical biology & medicine* 1, 1063.
- Ricciarelli R, Zingg JM, Azzi A. 2002. The 80th Anniversary of Vitamin E: Beyond Its Antioxidant Properties. *Biological Chemistry* 383, 457–465.
- Ros E. 2009. Nuts and novel biomarkers of cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition* 89, 1649–1656.
- Ruijter JM, Ramackers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, Moorman AF. 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research* 37, 45.
- Saito K, Tautz L, Mustelin T. 2007. The lipid-binding SEC14 domain. *Biochimica et Biophysica Acta* 1771, 719–726.
- Saitou N & Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406–425.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning, a laboratory manual. Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schauer N, Semel Y, Roessner U, Gur A, Balbo I, Carrari F, Pleban T, Perez- Melis A, Bruedigam C, Kopka J, Willmitzer L, Zamir D, Fernie AR. 2006. Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nature Biotechnology* 24, 447–454.
- Semchuk NM, Lushchak OV, Falk J, Krupinska K, Lushchak VI. 2009. Inactivation of genes, encoding tocopherol biosynthetic pathway enzymes, results in oxidative stress in outdoor grown *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* 47, 384–390.
- Serbinova E, Kagan V, Han D, Packer L. 1991. Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Free Radicals in Biology and Medicine* 10, 263–275.
- Sienkiewicz-Porzućka A, Sulpice R, Osorio S, Krahnert I, Leisse A, Urbanczyk-Wochniak E, Hodges M, Fernie AR, Nunes-Nesi A. 2010. Mild reductions in mitochondrial NAD-dependent isocitrate dehydrogenase activity result in altered nitrate assimilation and pigmentation but do not impact growth. *Molecular Plant* 3, 156–173.
- Sokal RR, Rohlf FJ. 1981. Biometry. Freeman Second Edition, New York.
- Soll J, Schultz G. 1979. Comparison of geranylgeranyl and phytol substituted methylquinols in the tocopherol synthesis of spinach chloroplasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 91, 715–720.
- Stocker A, Zimmer S, Spycher SE, Azzi A. 1999. Identification of a Novel Cytosolic Tocopherol-Binding Protein: Structure, Specificity, and Tissue Distribution. *IUBMB Life* 48, 49–55.
- Stocker A e Baumann U. 2003. Supernatant protein factor in complex with RRR-alpha-tocopherylquinone: a link between oxidized Vitamin E and cholesterol biosynthesis. *Journal of molecular biology* 332, 759–765.
- Sun Q, Zybaylov B, Majeran W, Friso G, Olinares, PDB, van Wijk KJ. 2009. PPDB, the Plant Proteomics Database at Cornell. *Nucleic Acids Research* 37, 969–974.

- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596–1599.
- Thompson J, Higgins D, Gibson T. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673–4680.
- Vidi PA, Kanwischer M, Baginsky S, Austin JR, Csucs G, Dörmann P, Kessler F, Bréhélin C. 2006. Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 11225–11234.
- Vincent M, Chua F, Nogue A, Fairbrother H, Mekeel Y. 2005. A Sec14p-nodulin domain phosphatidylinositol transfer protein polarizes membrane growth of *Arabidopsis thaliana* root hairs. *The Journal of cell biology* 168, 801–812.
- Wang X, Quinn PJ. 2000. The location and function of vitamin E in membranes (review). *Molecular membrane biology* 17, 143–56.
- Wen-Jun S e Forde B. 1989. Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by high electroporation. *Nucleic Acids Research* 17, 8385.
- Zbierzak AM, Kanwischer M, Wille C, Vidi PA, Giavalisco P, Lohmann A, Briesen I, Porfirova S, Bréhélin C, Kessler F, Dörmann P. 2009. Intersection of the tocopherol and plastoquinol metabolic pathways at the plastoglobule. *The Biochemical journal* 425, 389–99.
- Zhang CX, Ho SC, Chen YM, Fu JH, Cheng SZ, Lin FY. 2009. Greater vegetable and fruit intake is associated with a lower risk of breast cancer among Chinese women. *International Journal of Cancer* 125, 181–188.
- Zscheille F e Porter J. 1947. Analytical methods for carotenes of *Lycopersicon* species and strains. *Analytical Chemistry* 19, 47–51.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

O ponto de partida desta tese foi uma análise metabólica e genética, entre *S. lycopersicum* e *S. pennellii*, que permitiu descrever diversos QTL que afetam o metabolismo central dos frutos de tomate. Assim, foram propostas diferentes abordagens, utilizando ferramentas de genômica e genética reversa, com o intuito de identificar e caracterizar molecular e fisiologicamente alguns dos mecanismos, que explicam as variações bioquímicas observadas.

Em primeiro lugar (Capítulo I), foi realizada uma busca no genoma por possíveis genes candidatos que pudessem explicar as diferenças metabólicas mencionadas (Bermudez *et al.*, 2008). A identificação de diversos genes candidatos que apresentaram polimorfismos entre os genótipos analisados e correlação da expressão com o conteúdo de metabólitos foi um primeiro indício da eficiência da estratégia para o estudo de caracteres complexos.

Posteriormente (Capítulo II), para avaliar de forma geral a diversidade presente nas regiões genômicas associadas aos caracteres metabólicos, foi realizada uma análise de microssintenia, como complementação à construção de um mapa físico. Neste trabalho, foram utilizadas ferramentas de genômica comparativa e análises evolutivas. Desta forma, foi demonstrado alto grau de conservação na estrutura gênica, mas com polimorfismo nas regiões regulatórias e no padrão de inserção de elementos de transposição. Adicionalmente, este estudo permitiu uma estimativa com alto nível de precisão do tempo de divergência entre essas duas espécies (Kamenetzky *et al.*, 2010), o qual constituiu uma das bases para a elaboração do projeto genoma de *S. pennellii* que se encontra atualmente em andamento pelo nosso grupo na Argentina.

Por fim (Capítulo III e IV), as hipóteses geradas a partir dos dois primeiros capítulos levaram à análise funcional do gene *chaperona DnaJ* e do *sec14*. Esta última parte representou um grande desafio tanto conceitual como metodológico já que, além do risco de apostar nas candidaturas, foi necessário estandardizar protocolos para o estudo funcional de promotores, localização subcelular de proteínas *in vivo*, obtenção de plantas de tomate estavelmente transformadas, quantificação de transcritos por qPCR, quantificação de diversos metabólitos e tocoferóis. Os resultados obtidos permitiram um melhor entendimento dos mecanismos que regulam o metaboloma nos frutos de tomate; em particular, aqueles envolvidos no conteúdo de açúcares solúveis, de fundamental importância para a qualidade industrial, e de tocoferol que representa um metabólito de alto interesse nutricional.

ANEXO 1

Genomic Analysis of Wild Tomato Introgressions Determining Metabolism- and Yield-Associated Traits^{1[C][W]}

Laura Kamenetzky², Ramón Asís^{2,3}, Sebastián Bassi, Fabiana de Godoy, Luisa Bermúdez, Alisdair R. Fernie, Marie-Anne Van Sluys, Julia Vrebalov, James J. Giovannoni, Magdalena Rossi, and Fernando Carrari*

Instituto de Biotecnología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, B1712WAA Castelar, Argentina (L.K., R.A., S.B., F.C.); Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-900, Brazil (F.d.G., L.B., M.-A.V.S., M.R.); Max Planck Institute for Molecular Plant Physiology, D-14 476 Potsdam-Golm, Germany (A.R.F.); and Boyce Thompson Institute for Plant Research and United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service, Cornell University, Ithaca, New York 14853 (J.V., J.J.G.)

With the aim of determining the genetic basis of metabolic regulation in tomato fruit, we constructed a detailed physical map of genomic regions spanning previously described metabolic quantitative trait loci of a *Solanum pennellii* introgression line population. Two genomic libraries from *S. pennellii* were screened with 104 colocated markers from five selected genomic regions, and a total of 614 bacterial artificial chromosome (BAC)/cosmids were identified as seed clones. Integration of sequence data with the genetic and physical maps of *Solanum lycopersicum* facilitated the anchoring of 374 of these BAC/cosmid clones. The analysis of this information resulted in a genome-wide map of a nondomesticated plant species and covers 10% of the physical distance of the selected regions corresponding to approximately 1% of the wild tomato genome. Comparative analyses revealed that *S. pennellii* and domesticated tomato genomes can be considered as largely colinear. A total of 1,238,705 bp from both BAC/cosmid ends and nine large insert clones were sequenced, annotated, and functionally categorized. The sequence data allowed the evaluation of the level of polymorphism between the wild and cultivated tomato species. An exhaustive microsynteny analysis allowed us to estimate the divergence date of *S. pennellii* and *S. lycopersicum* at 2.7 million years ago. The combined results serve as a reference for comparative studies both at the macrosyntenic and microsyntenic levels. They also provide a valuable tool for fine-mapping of quantitative trait loci in tomato. Furthermore, they will contribute to a deeper understanding of the regulatory factors underpinning metabolism and hence defining crop chemical composition.

Tomato (*Solanum* species) fruits constitute one of the most important sources of minerals, vitamins, fibers, and antioxidants in the human diet. Genomic approaches focused on determining the genetic basis of pathway regulation underlying quantitative variation in the production of these nutrients will likely provide information to facilitate the identification of cardinal

genes. The cumulative body of data concerning developmental and metabolic shifts coupled with those recently acquired using postgenomic tools has prompted the adoption of this species as a model system for plants bearing fleshy fruits (Mueller et al., 2005). Such a model is required, because although many of these processes might be shared by many different plant species, this should not be straightly assumed, since remarkable metabolic differences have been observed even between closely related species (Fernie and Willmitzer, 2001).

The facts that the domesticated species *Solanum lycopersicum* can be crossed with a number of its wild relatives and that these species have shown tremendous variation in metabolite content both in leaves and fruits (Schauer et al., 2006) render wild germplasm as an important source for metabolic gene discovery (Zamir, 2001). For this reason, extensive germplasm collections, including numerous natural and induced mutants and interspecific populations, have been made publicly available by the Tomato Genetics Resource Center (<http://tgrc.ucdavis.edu/>). An example of this is the collection of 76 introgression lines (ILs; Eshed and Zamir, 1995) comprising single overlapping introgressions of the *Solanum pennellii* (accession no. LA716) genome within the *S. lycopersicum* genome (cv M82). These lines are an excellent source of the stable genetic variation used worldwide by different re-

¹ This work was supported by the Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria and the Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Argentina), the Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Brazil), the Max Planck Society (Germany), the European Solanaceae Integrated Project FOOD-CT-2006-016214, and the National Science Foundation Plant Genome Program (grant no. 05-01778).

² These authors contributed equally to the article.

³ Present address: Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, CC 5000 Córdoba, Argentina.

* Corresponding author; e-mail fcarrari@cnia.inta.gov.ar.

The authors responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) are: Fernando Carrari (fcarrari@cnia.inta.gov.ar) and Magdalena Rossi (mmrossi@usp.br).

[C] Some figures in this article are displayed in color online but in black and white in the print edition.

[W] The online version of this article contains Web-only data.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.109.150532

searchers to map 2,795 quantitative trait loci (QTLs) to date, including those affecting plant biomass, yield, drought tolerance, morphology, gene expression, and metabolism (Lippman et al., 2007). The success of the *S. pennellii* ILs in establishing new principles for plant breeding and for resolving the molecular basis of complex traits has been demonstrated by the cloning of the first QTLs in this species: *FW2.2* (a fruit size gene; Frary et al., 2000) and *Brix9-2-5* (a sugar yield gene; Fridman et al., 2000, 2004). The broad phenotypic diversity inherent in this population alongside its simple mapping framework has also led to the identification of heterotic QTLs for biomass production, a major step toward isolating heterosis genes (Lippman et al., 2007). A clone-based physical map of *S. pennellii*, however, is necessary to fully exploit this population and to produce a unique resource for Solanaceae genomics. Such a map would also provide previous information for comparative analyses, map-based cloning, and validation of the sequence assemblies of the tomato whole genome (Solanaceae Genome Network [SGN]; www.sgn.cornell.edu).

The aim of our current research was to perform a large-scale comparative genome analysis of the *S. pennellii* wild tomato and *S. lycopersicum*. Five genomic regions (BINs) comprising more than 100 recently identified QTLs associated with fruit carbon primary metabolism (Schauer et al., 2006, 2008) were chosen. These QTLs include fruit color (Liu et al., 2003), volatile content (Tieman et al., 2006), and yield traits linked to metabolite variations found in the fruits (Eshed and Zamir, 1995; Schauer et al., 2006; Semel et al., 2006). The physical map, built by anchoring 374 clones from bacterial artificial chromosome (BAC) and cosmid *S. pennellii* genomic libraries to the tomato genetic map, revealed a consistent pattern of coaligning regions, thus suggesting that the two genomes can largely be considered as colinear. Targeted sequencing of 1,238,705 bp allowed the annotation of 407 genes and uncovered a high degree of microsynteny between the two species. To a lesser extent, microsynteny was also observed with the *Arabidopsis* genome. However, this colinearity was somewhat perturbed by differential transposable element (TE) insertion patterns, different intergenic region lengths, and extensive single nucleotide polymorphism (SNP) and insertion-deletion (InDel) polymorphism. The time of divergence between species was estimated to be 2.7 million years ago (MYA). Furthermore, the large data set presented here would constitute a useful tool for QTL fine-mapping and relatively easy screening of target clones in map-based cloning approaches.

RESULTS

Integration of Genetic and Physical Maps of *S. pennellii* and *S. lycopersicum* Genomic Regions Spanning QTLs

The *S. pennellii* IL population has allowed the association of more than 2,700 QTLs (for review, see

Lippman et al., 2007), including many related to fruit compositional quality (Schauer et al., 2006, 2008). Based on this data set repository and with the intention of resolving the genetic determinants responsible for the observed phenotypic variations, five genomic regions were selected: BINs 1C, 2B, 4I, 7H, and 11C. These regions are associated with a total of 104 QTLs comprising traits related to fruit primary metabolite content, yield, and fruit volatile content (Eshed and Zamir, 1995; Schauer et al., 2006; Tieman et al., 2006; Table I). In order to reach the goal proposed above, an integration of the genetic and physical maps of *S. pennellii* and *S. lycopersicum* was performed. By screening two *S. pennellii* genomic libraries, 614 seed clones were identified using pooled overgo probes for the five selected BINs. Over 70% of the overgo probes hit at least one BAC or cosmid clone, and no major differences were observed between libraries (Supplemental Table S1). Two-dimensional pooling hybridization allowed the anchoring of 374 clones to their corresponding map positions (Table I). In addition, the map positions of 24% of these clones were confirmed by independent hybridizations to closely linked or cosegregating markers (Supplemental Table S2A).

The average insert size of anchored clones, as estimated by pulsed-field gel electrophoresis, was 108.3 kb (125.8 and 90.8 kb for BAC and cosmid, respectively). Since the *S. pennellii* genome has been estimated to be approximately 1.2 Gb (Arumuganathan and Earle, 1991) and considering the total number of clones of each library (see "Materials and Methods"), we estimate that genome coverage is 5.5 and 3.8 for the BAC and cosmid libraries, respectively, with an average of 4.7 $\times$. Thus, the anchored 374 BAC/cosmid clones represent around 1% of the wild tomato genome and approximately 10% of the physical distance of the selected regions. However, these values should be taken with caution, since they rely on a genetic map constructed with less than 100 individuals (Tomato-EXPEN 2000, *S. lycopersicum* LA925 $\times$ *S. pennellii* LA716; <http://www.sgn.cornell.edu/>).

To support the integration of the wild species clones with both the *S. lycopersicum* genomic sequence and the available genetic map, the 374 anchored BAC and cosmid clones were end sequenced. Both end sequences were obtained for 233 clones, only one end sequence reached a suitable quality criteria in 53 of the clones, and no high-quality sequence was produced for 88 clones. Thus, after quality and vector trimming, a total of 519 end sequences, representing 76% of all anchored clones, were obtained and subjected to further analyses. After masking repetitive elements, the sequences from clones anchored with the same marker were assembled into 54 contigs (Table I; Supplemental Table S2B). These analyses rendered a total of 436 nonredundant end sequences (312,095 bp).

To support the above analysis, *S. pennellii* clones were selected for full-length sequencing using the following criteria: (1) PCR confirmation for the presence of candidate genes previously identified by our

Table 1. *S. pennellii* BAC and cosmid clones anchored onto five genomic regions spanning fruit quantitative metabolic loci (QML) and yield-associated loci (YAL)

Metabolite QTLs and YALs listed here were previously reported by Eshed and Zamir (1995), Liu et al. (2003), Schauer et al. (2006), Semel et al. (2006), and Tieman et al. (2006).

Genomic Region (BIN)	No. of Markers	Seed Clones	Clones Anchored by Individual Hybridization	Average Clone No. per Marker	Average Clone No. per cM	No. of End Sequences	No. of Contigs	Total Length of Nonredundant End Sequences	Clones with Confirmed Position by End Sequencing	Clones with Single Map Positions	Associated QML/YAL
1C (19.4 cM)	19	323 (for 1C and 2B)	49	2.6	2.5	78	7	51,372	19	8	13 ^a
2B (13.0 cM)	25		132	5.3	10.1	173	21	91,196	51	23	10 ^b /5 ^c
4I (11.7 cM)	19	81	55	2.8	4.7	71	6	43,361	31	21	37 ^d /10 ^e
7H (36.0 cM)	18	100	68	3.8	1.8	105	13	65,200	41	31	7 ^f /2 ^g
11C (19.0 cM)	23	110	70	3.0	3.7	92	7	60,966	19	17	12 ^h /8 ⁱ
Total	104	614	374			519	54	312,095	161	100	104
Average				3.5	4.6						

^aAla, Asp, Cys, Met, oxoproline-5, S-methyl-Cys, isomaltose, phosphate, Glc-6-P, sorbitol, quinate, succinate, threonate. ^bGlu, S-methyl-Cys, Fru, Gal, Glc, Man, glycerol-3-phosphate, dehydroascorbate, gluconate, isocitrate. ^cFlowers per plant, pericarp, seed number per fruit, seed number per plant, leaf morphology. ^dAsn, Asp, β-Ala, γ-aminobutyric acid, Glu, Gln, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Fru, Fuc, Glc, Suc, phosphate, Fru-6-P, Glc-6-P, glycerol-3-phosphate, inositol-1-phosphate, stearate, palmitate, citrate, dehydroascorbate, gluconate, glycerate, isocitrate, 3-methylbutanal, 3-methylbutanol, 2-methylbutanal, 2-methylbutanol, isovaleronitrile, isobutyl acetate, pentanal, trans-2-pentenal, 1-penten-3-one, cis-2-penten-1-ol. ^ePlant weight, Brix, fruit color, fruit length per width, fruit width, harvest index, pericarp, seed width, style length, green fruit at harvest time. ^fγ-Aminobutyric acid, homoserine, Ile, Leu, Met, Ser, Glc-6-P. ^gFruit length, fruit weight. ^hAsp, γ-aminobutyric acid, Leu, Glc, dehydroascorbate, fumarate, pentanal, 3-methylbutanal, 3-methylbutanol, 2-methylbutanal, isovaleronitrile. ⁱAnther length, Brix yield, flowers per plant, fruit number, inflorescence number, pericarp per width, seed number per plant, seed weight per plant.

group (Bermúdez et al., 2008); (2) confirmation of physical map position by end sequence anchoring; and (3) availability of information from orthologous *S. lycopersicum* genomic regions. On the basis of these criteria, nine clones were sequenced: one clone anchored to BIN 1C, two to BIN 2B, one to BIN 4I, four to BIN 7H, and one to BIN 11C. Insert lengths ranged from 50,564 to 148,978 bp. Map positions and clone identifiers are available in Supplemental Table S2A.

The full-length sequencing of these clones resulted in a total of 926,691 bp of sequence, which, together with the end sequences described above, encompasses a total of 1,238,786 bp. This sequence volume represents 1.5% of the five genomic regions under study and about 0.1% of the entire *S. pennellii* genome. The complete data set, including hybridization anchored clones, masked nonredundant end sequences, and large insert clone sequences, was used to build a physical map. Figure 1 shows a graphical representation of the relationships found between the *S. lycopersicum* genetic map and the anchored clones of the wild species. The identity of *S. pennellii* sequences to mapped markers (blue lines) and to *S. lycopersicum* genomic sequence (red lines) allowed the determination of orthologous regions between the two species for 43% of the anchored clones.

At first glance, the topology of the maps of these five genomic regions showed that the *S. pennellii* genome can be considered colinear with that of the domesticated tomato. This can clearly be observed in Figure 1 by the density of the lines linking *S. pennellii* with *S. lycopersicum* clones and their positions on the map. However, it is possible to identify a few regions where

red lines connect distant *S. pennellii* clones to a single *S. lycopersicum* one and vice versa (i.e. the interval 93–108 centimorgan [cM] in BIN 7H; Fig. 1D). These features suggest the occurrence of rearrangements such as chromosomal inversions and/or InDels. Another interesting feature of the map topology is apparent in the junction of the red lines linking several distant *S. pennellii* clones to narrower intervals within the *S. lycopersicum* genome. The *S. pennellii* clones anchored to a 10.7-cM interval (T1606-TG498 markers) on BIN 4I matched *S. lycopersicum* BACs (A–H) that were anchored with markers covering 5.5 cM (C2_At2g45730-cLPT-2-K6) according to the Tomato-EXPEN 2000 map (Fig. 1C). Similarly, on BIN 11C, several *S. pennellii* BAC clones anchored within an interval of 3.0 cM (SSR76-C2_At1g44790) matched a single *S. lycopersicum* BAC (A) anchored with the T1161 marker at 38.0 cM (Fig. 1E). Although this result is suggestive of a genome expansion event in *S. pennellii*, as reflected by the relative genome sizes of these species, it is not possible to formally exclude that this colinearity break reflects the low resolution of the map and/or the current relative paucity of information concerning the *S. lycopersicum* genomic clones in the regions studied here.

The number of anchored clones per marker (3.5; Table 1) is in general agreement with the libraries' redundancy (4.7×). However, the cLER-14H18 marker anchored 76 *S. pennellii* clones (BIN 2B; Fig. 1B), while only eight *S. lycopersicum* clones were identified (Supplemental Table S1). End sequence analyses and contig assemblies of *S. pennellii* clones revealed that most of them span the anchoring marker or a cosegregating one, thus confirming their map positions. Furthermore,

Figure 1. Integrated genetic and physical maps of selected genomic regions of *S. pennellii* and *S. lycopersicum*. Genetic markers and their corresponding map positions (according to the Tomato-EXPEN 2000 map) are shown on the left and right sides of the *S. pennellii* and *S. lycopersicum* chromosome fragment representations, respectively. *S. pennellii* anchored BAC/cosmid clones are represented by gray bars. Clones belonging to the same contig are grouped into green boxes. Full-length sequenced clones are represented by black bars. *S. lycopersicum* clones are represented as black squares ordered alphabetically. Gray lines link *S. pennellii* BAC/cosmid clones with their corresponding hybridizing genetic markers. Blue lines indicate the *S. pennellii* BAC/cosmid end sequences containing the corresponding marker sequences. Red lines link *S. pennellii* BAC/cosmid end sequences matching *S. lycopersicum* BAC clone sequences. Black lines link *S. lycopersicum* BAC clones to their corresponding markers. The entire data set is available at the SGN Web site in the Tomato Physical Map interface (<http://www.sgn.cornell.edu/cview/>). A, BIN 1C. B, BIN 2B. C, BIN 4I. D, BIN 7H. E, BIN 11C. [See online article for color version of this figure.]

these clones hit only two contiguous *S. lycopersicum* BACs and harbor ribosomal genes and TEs. Taken together, these results suggest that a local amplification may well have occurred in the *S. pennellii* genome.

Annotation and Functional Categorization of *S. pennellii* Coding Sequences

The significant number of sequences generated, together with the fact that they are linked to physio-

Figure 1. (Continued.)

logically relevant QTLs, renders this information an untapped resource for exposing known and novel genes that could be involved in controlling these traits. For this reason, an exhaustive annotation was attempted

for the 436 nonredundant end sequences and the nine BAC/cosmid clones. From the nonredundant end sequences, a total of 298 putative genes were identified and assigned to functional categories (Supplemental

Table S3). From the fully sequenced BAC/cosmid clones, 109 complete open reading frames were identified by two approaches: (1) utilizing the FGENESH (Salamov and Solovyev, 2000) and Augustus (Stanke et al., 2004) prediction softwares, and (2) manual confirmation by the cross-match interface of the phrap program and BLAST comparison (Supplemental Table S4). A detailed analysis of the large-insert sequence annotation revealed comparable gene density values of 0.1 genes kb^{-1} in BINs 1C, 2B, 7H, and 11C. However, BIN 4I displayed 0.2 genes kb^{-1} and the lowest density of TEs (Supplemental Tables S4 and S5). The annotated sequences are representative of uni-genes derived from cDNA libraries from a broad spectrum of tomato tissues and physiological conditions. Moreover, 103 of the 109 predicted open reading frames through the five genomic regions matched *Arabidopsis* genes, revealing a high degree of conservation in the gene repertoires of the two species. Furthermore, with the exception of the BAC analyzed from chromosome 1, in all other clones, 13 micro-syntentic segments were identified between the wild tomato species and *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), which are highlighted in color in Supplemental Table S4. These regions encompass 54 genes that span 218,060 nucleotides representing about 25% of the annotated large-insert clone sequences.

The 407 annotated genes were further subjected to functional categorization using the MapMan ontology adapted for solanaceous species by Urbanczyk-Wochniak et al. (2006). These genes fell into 23 of the 35 gene categories, and their distribution along the five genomic regions is shown in Figure 2. Total sequence percentage per BIN that fell into any functional category varied between 51% and 84% for BINs 11C and 4I,

respectively. The number of gene classes per BIN ranged from nine in BIN 11C to 19 in BIN 7H, revealing differences in gene diversity among BINs (Fig. 2). With the exception of region B on chromosome 2, “unknown function” (category 35) was the most represented category for all BINs. The second two most abundant categories, “DNA modifiers” (category 28) and “protein modification” (category 29), are those comprising ribosomal proteins and TEs, respectively. In all the BINs analyzed, a significant percentage of predicted coding regions fell into the “RNA regulation” category (category 27), which includes regulatory proteins such as *MYB*, *WRKY*, and *zinc finger* transcription factors. Several MapMan functional classes were found exclusively in certain genomic regions. For example, genes falling into the “major carbohydrates” category (category 2) were found only in regions of chromosomes 2 and 4. “TCA [tricarboxylic acid] cycle/organic acid transformations” and “cofactor and vitamin synthesis” categories (categories 8 and 18) were found only in BIN 1C, while “redox regulation” (category 21) was found exclusively in BINs 4I and 7H. Genes related to “transport” (category 34) were found only in BINs 4I, 7H, and 11C. The same was found for genes related to “lipid metabolism” (category 11) and “tetrapyrrole synthesis” (category 19), which were present only in BIN 7H and 11C, respectively.

SNP and InDel Discovery

Due to the importance of SNP and InDel discovery in genetic mapping, the number and density of these differences were evaluated within the 436 nonredundant end sequences and their corresponding *S. lycopersicum* orthologous regions (Supplemental Table

Figure 2. Functional categorization of *S. pennellii* genomic sequences. BAC/cosmid end (singletons and contigs) and full-length sequences were categorized according to MapMan software (<http://mapman.mpimp-golm.mpg.de>). Categories are as follows: 1, photosynthesis; 2, major carbohydrates; 3, minor carbohydrates; 7, oxidative pentose phosphate pathway; 8, tricarboxylic acid cycle/organic acid transformations; 10, cell wall; 11, lipid metabolism; 13, amino acid metabolism; 16, secondary metabolism; 17, hormones; 18, cofactor and vitamin synthesis; 19, tetrapyrrole synthesis; 20, stress; 21, redox regulation; 26, miscellaneous enzyme families; 27, RNA regulation; 28, DNA modifiers; 29, protein modifications; 30, signaling; 31, cell; 33, development; 34, transport; 35, unknown function. [See online article for color version of this figure.]

Figure 3. Comparative analysis between *S. lycopersicum* and *S. pennellii* orthologous genomic regions. Genes are indicated as blue arrows and coded according to Table II. Green blocks depict transposable elements. Green blocks squared in black correspond to retrotransposons, and their LTRs are indicated as black bars at the ends of the elements. The percentage identity and InDels (in parentheses) between genotypes along genic (including untranslated regions) and intergenic regions are indicated. Compared orthologous genomic regions of BIN 4I (A), 7H (B), and 11C (C) are presented. [See online article for color version of this figure.]

S2C). Polymorphisms along each identified alignment were analyzed following stringent criteria: (1) nucleotide variations were regarded as reliable SNPs only if the quality of the base call achieved a quality value ($Q_v \geq 20$); and (2) end sequences with only one *S. lycopersicum* matching region were used. This allowed the comparison of 59,510 bp between both species. SNPs varied among genomic regions, ranging from 2.1 per 100 bp in BIN I of chromosome 4 to 9.7 per 100 bp in BIN B of chromosome 2, with an average of 4.3 (Supplemental Table S2C), according to the values expected for these plant species (L. Mueller, personal communication). In the same regions, the distribution of InDels also varied between 0.37 per 100 bp in BIN 4I and 0.5 per 100 bp in BIN 1C. A graphical overview of SNP and InDel mapping revealed that there were no particular patterns of polymorphism within the analyzed chromosomal regions (Supplemental Fig. S1). A high proportion of the SNPs and InDels identified were detected within predicted coding regions (Supplemental Table S3). In the case of the analyzed region of chromosome 2 (which showed the highest percent-

age of polymorphisms), all the SNPs and InDels detected fell within three gene categories: 29 (protein modification), 35 (unknown function), and 28 (DNA modifiers).

Microsynteny and Evolutionary Analyses of *S. pennellii* and *S. lycopersicum* Orthologous Regions

Large-insert clones from *S. pennellii* were compared with the corresponding conserved syntenic segments of *S. lycopersicum* in order to explore both the differences in genome structure and the sequence divergence between these closely related species. Although this work embraces the study of five genomic regions, the following analyses were focused solely on BINs 4I, 7H, and 11C because they are the only ones that do not span repetitive sequences and for which unambiguous orthologous sequences from *S. lycopersicum* were available.

We observed that the syntenic regions contain 38 distinct genes showing conserved genomic ordering, orientation, and gene structure (exon/intron) between

Table II. Comparative analysis between *S. lycopersicum* and *S. pennellii* orthologous genomic regions

Sl, *S. lycopersicum*; *Sp*, *S. pennellii*; *At*, Arabidopsis; CB, total of compared bases; ND, not determined; UD, undetermined because $dn = 0$.

BIN	ID ^a	Name ^b	Identity (lnDels) ^c CB: XXX		Exons ^d	Length ^e (Amino Acids)	Amino Acid Polymorphisms ^f	ds/dn^g		
			Exons	Introns				<i>Sl-Sp</i>	<i>Sl-At</i>	<i>Sp-At</i>
41	Sp04gBP4C04.1	Diphthine synthase	99 (0) CB: 100		1 ^h	33 ⁱ	0			
	Sp04gBP4C04.2	Putative chaperone protein DNAJ-related	99 (0) CB: 480	95.3 (2.7) CB: 2,224	5	159	2	5.3	7.2 ^j	7.5 ^j
	Sp04gBP4C04.3	Expressed gene 1	98.6 (0) CB: 633	94.9 (1.1) CB: 2,077	7	179	4			
	Sp04gBP4C04.4	Abscisic acid-responsive HVA22 family protein	98.4 (0.0) CB: 966	96.0 (1.5) CB: 1,202	6	321	9	1.83	2.23 ^j	2.15 ^j
	Sp04gBP4C04.5	E2F transcription factor	98.8 (0) CB: 996	94.3 (3.3) CB: 5,294	10	331	8			
	Sp04gBP4C04.6	Putative eukaryotic initiation factor 3 γ -subunit family protein	98.7 (0) CB: 1,341	95.3 (3.1) CB: 4,320	13	446	7	3.0	3.12 ^j	3.11 ^j
	Sp04gBP4C04.7	Putative zinc finger (C2H2 type) family protein	97.6 (0.4) CB: 1,359	91.4 (5.0) CB: 1,865	4	451	13	3.8 ^j	3.9 ^j	3.9 ^j
	Sp04gBP4C04.8	Plastidic hexokinase	99.2 (0) CB: 1,500	88.8 (8.1) CB: 2,111	9	499	2	11 ^j	4.6 ^j	4.6 ^j
	Sp04gBP4C04.9	Putative clathrin assembly protein AP17-like protein	100 (0) CB: 429	73.1(25.2) CB: 3,113	6	142	0	UD	17.8 ^j	17.8 ^j
	Sp04gBP4C04.10	Expressed gene 2	96.5 (0.6) CB: 909		1	ND	ND			
	Sp04gBP4C04.11	Expressed gene 3	98.3 (0.3) CB: 1,851	96.7 (1.6) CB: 1,684	10	608	9			
	Sp04gBP4C04.12	Putative transcription coactivator-like protein	99.4 (0) CB: 507	96.2 (2.2) CB: 1,604	5	168	0	UD	8.7 ^j	8.7 ^j
	Sp04gBP4C04.13	β -Fructofuranosidase	99.2 (0) CB: 1,713	91.2 (6.1) CB: 2,008	4	570	1	26 ^j	8.0 ^j	7.7 ^j
	Sp04gBP4C04.14	Putative cytomatrix protein	99 (0) CB: 1,062	94 (3.8) CB: 1,796	4	353	8	1.1	1.3	1.3
7H	Sp07gCP5C04.1	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase family protein	98.8 (0.0) CB: 162	95.9 (1.9) CB: 1,025	2 ^h	54 ⁱ	2			
	Sp07gCP5C04.2	Protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein family protein	97.8 (0.0) CB: 315		1	104	5	1.04	1.99 ^j	1.95 ^j
	Sp07gCP5C04.3	Polygalacturonase-inhibiting protein 1 (PGIP1)	97.7 (0.0) CB: 984		1	327	6	5.8 ^j	4.1 ^j	3.6 ^j
	Sp07gCP5C04.4	Similar to fimbrin-like protein	98.8 (0.0) CB: 2,571	97.0 (1.5)	12	856	0	UD	7.3 ^j	7.4 ^j
	Sp07gCP5C04.5	Expressed gene 1	96.9 (1.3) CB: 669		1	ND	ND			
	Sp07gCP5C04.6	Wax synthase isoform 3	86.8 (11.1) CB: 1,053		1	350	53	2	2.07 ^j	2.06 ^j
	Sp07gCP5C04.7	Wax synthase isoform 3	98.4 (0.0) CB: 1,035		1	344	10	1.9	2.1 ^j	2.0 ^j
	Sp07gCP5C04.8	Cell division protein FtsZ	99.0 (0.0) CB: 1,254	95.1 (2.2) CB: 3,438	6	417	1	15.5 ^j	6.0 ^j	6.3 ^j
	Sp07gCP5C04.9	TATA-binding protein-associated factor	99.3 (0.0) CB: 1,734	96.5 (1.8) CB: 2,580	12	577	9	0.87	2.9 ^j	2.9 ^j
	Sp07gCP5C04.10	Similar to syntaxin 52 (SYP52)	94.8 (4.8) CB: 735	94.9(2.8) CB: 2,427	5	243	11			
	Sp07gCP5C04.11	Ser/Thr protein phosphatase	99.5(0.0) CB: 918	96.1 (1.1) CB: 5,494	8	305	1	8.0	29.8 ^j	32.6 ^j

(Table continues on following page.)

Table II. (Continued from previous page.)

BIN	ID ^a	Name ^b	Identity (InDels) ^c CB: XXX		Exons ^d	Length ^e (Amino Acids)	Amino Acid Polymorphisms ^f	ds/dn^g		
			Exons	Introns				<i>Sl-Sp</i>	<i>Sl-At</i>	<i>Sp-At</i>
	Sp07gCP5C04.12	Lipid-binding serum glycoprotein family protein	98.8 (0.0) CB: 1,302	95.1 (2.3) CB: 2,731	5	433	8	1.9	2.1 ^j	2.2 ^j
	Sp07gCP5C04.13	PHD finger family protein	98.1 (0.1) CB: 2,184	98.2 (0.3) CB: 1,150	3	727	24			
	Sp07gCP5C04.14	S-Adenosyl-L-Met:carboxyl methyltransferase family protein	99.1 (0.0) CB: 1,155	80.1 (11.7) CB: 1,222	4	384	3	5.5	7.0 ^j	6.6 ^j
	Sp07gCP5C04.15	Hyp-rich glycoprotein family protein	96.5 (1.2) CB: 964	91.8 (3.1) CB: 1,397	3 ^h	295 ⁱ	23			
11C	Sp11gBP4E08.1	Tetratricopeptide repeat-containing protein	98.7 (0.0) CB: 476	97.0 (1.6) CB: 507	3 ^h	158 ⁱ	3			
	Sp11gBP4E08.2	Expressed gene 2	99.4 (0.0) CB: 360	93.8 (4.3) CB: 5,444	2	119	1	2.7	2.9 ^j	3.0 ^j
	Sp11gBP4E08.3	Glc-6-P/phosphate translocator-related	98.2 (0.0) CB: 1,014	93.8 (1.2) CB: 1,376	5	337	9	2.6	7.03 ^j	7.04 ^j
	Sp11gBP4E08.4	Peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein	98.9 (0.0) CB: 1,237	94.7 (2.2) CB: 1,692	5	413	11	1.2	4.1 ^j	4.2 ^j
	Sp11gBP4E08.5	Coiled-coil protein	98.8 (0.0) CB: 2,013	96.0 (2.8) CB: 2,106	4	670	11	3.8 ^j	1.5 ^j	1.5 ^j
	Sp11gBP4E08.6	CH1 (chlorophyll <i>b</i> biosynthesis); chlorophyllide <i>a</i> oxygenase	98.9 (0.0) CB: 1,612	95.4 (1.5) CB: 2,203	9	536	2	16.5 ^j	6.6 ^j	6.8 ^j
	Sp11gBP4E08.7	BTB/POZ domain-containing protein	99.8 (0.0) CB: 987	95.1 (2.7) CB: 1,812	4	329	1	4.0	6.5 ^j	6.3 ^j
	Sp11gBP4E08.8	F-box family protein	99.3 (0.0) CB: 990	96.5 (1.1) CB: 7,288	11	330	3	3.9	6.1 ^j	6.1 ^j
	Sp11gBP4E08.9	Putative replication factor C 37-kD subunit	98.4 (0.0) CB: 1,020	78.6 (16.8) CB: 10,653	12	340	1	54.0 ^j	8.0 ^j	7.6 ^j

^aGene identification. ^bGene functional identity. ^cPercentage of identity and InDels between the *S. lycopersicum* and *S. pennellii* regions analyzed. ^dNumber of exons compared between both genotypes. ^eNumber of amino acids compared between both genotypes. ^fPolymorphic amino acids on the predicted protein sequence. ^gSynonymous distance/nonsynonymous distance. ^hExons not included in the comparative evolutionary analysis of *S. pennellii* and *S. lycopersicum* orthologous regions. ⁱOnly partial sequences were compared because genes were located at the end of the clones for any of the genotypes. ^jStatistically significant purifying selection ($P < 0.05$).

both species and that this nearly perfect colinearity is slightly altered by intergenic regions of variable size and a differential pattern of TE insertions (Fig. 3; Supplemental Table S5). An analysis of the distribution of polymorphisms revealed, as expected, a higher percentage of InDels in intergenic regions than in genic ones (Fig. 3) and in introns as opposed to exons (Table II). The degree of conservation for each gene was evaluated by estimating the rate of synonymous and nonsynonymous substitution distances (ds/dn). This analysis was carried out for all genes that fulfilled the following criteria: (1) they displayed full-length coding sequences (thus, uncompleted genes located on the BAC/cosmid ends were excluded); (2) they exhibited no frameshifts or stop codons (gene Sp07gCP5C04.8 was excluded); (3) they had Arabidopsis orthologs; and (4) they showed homogeneous relative substitution rates between *S. pennellii* and *S. lycopersicum*, considering Arabidopsis as an outgroup. For all 27 analyzed genes, the ratio ds/dn was greater than 1, thus indicating the

absence of positive selection (Table II). A test of selection was performed in order to assess whether genes were undergoing neutral ($ds = dn$) or purifying ($ds > dn$) selection, revealing that both cases were present. Interestingly, all the genes that displayed nonstatistically significant purifying selection between *S. pennellii* and *S. lycopersicum* also displayed amino acid polymorphisms. It is important to note that the ds/dn ratio may be subject to misinterpretation if the codon usage is restricted; however, for the data set used in this work, no codon bias was observed for any gene in all three species analyzed.

Since in this work, 27 loci belonging to three different chromosomes of *S. pennellii* were sequenced and the corresponding orthologs from *S. lycopersicum* were identified, these data represent a unique source to investigate the divergence time between these closely related tomato species. Using the fossil record estimation of 120 MYA for the divergence between Arabidopsis and Solanaceae

(Bell et al., 2005; Magallon and Sanderson, 2005) and the *ds* of the concatenated coding sequences, the genomic region-specific substitution rates and the species divergence time were estimated. Analysis of the substitution rate revealed no significant differences between BINs, suggesting that the three regions analyzed may code for important conserved proteins (Table III). When all three regions are considered together, the species divergence time was estimated at 2.7 MYA (Fig. 4).

Two Copia-like long terminal repeat (LTR) retrotransposons with perfect tandem duplication sites were found among the genomic regions analyzed in this work. A SHACOP_I_MT in BIN 4I was present only in *S. pennellii* (Supplemental Table S5), and a TOPSCOTCH_LP_I in BIN 11C was found only in *S. lycopersicum*. Based on the molecular clock, their insertion times were estimated and, as expected, both elements appeared after the species split (Fig. 4), in agreement with the species divergence time estimated above.

DISCUSSION

In the study described herein, we performed a large-scale analysis of the *S. pennellii* genome and compared it with that of its cultivated tomato counterpart *S. lycopersicum*. To achieve this goal, different approaches were taken: (1) a macrosynteny analysis via the construction of a physical map; (2) sequencing, annotation, and functional categorization of a portion of the wild tomato genome; (3) polymorphism evaluation between these species; and (4) a microsynteny analysis aimed at exposing the variation that has driven the evolutionary change between these two species. Data compilation was focused on five genomic regions: BINs 1C, 2B, 4I, 7H, and 11C, spanning 104 QTLs associated with fruit carbon primary metabolism (Schauer et al., 2006, 2008), fruit color (Liu et al., 2003), volatile content (Tieman et al., 2006), and yield traits linked to metabolite variations found in the fruits (Eshed and Zamir, 1995; Schauer et al., 2006; Semel et al., 2006). Although the high number of QTLs in the studied regions may merely reflect the effect of a few QTLs on several related traits, rather than the existence of multiple independent QTLs, the analyses of the generated data set will serve as a bridge for linking the genome to phenotypes for basic and applied studies.

Comparative Physical Map between *S. pennellii* and *S. lycopersicum*

Due to its versatility and low cost, physical mapping has become a natural component of large genome-sequencing endeavors (Gregory et al., 2002; Wallis et al., 2004). In fact, this strategy was originally adopted for the tomato genome-sequencing project (Mueller et al., 2009). Here, a comparative physical map was built anchoring 374 *S. pennellii* BAC/cosmid clones, which resulted in approximately 10% of the physical distance coverage of the five selected regions and 1% of the total wild tomato genome. Across the five regions studied, 58 *S. lycopersicum* BAC clones were fully sequenced and available on the SGN Web site. The physical map presented here anchored 31 of these clones to *S. pennellii* sequences, representing reliable coverage of 53% of the sequence information available for the reference genome.

Overall, the topology of the physical map built here reveals a high level of colinearity between *S. pennellii* and the cultivated tomato genomes. However, this colinearity is based on the quality of the *S. lycopersicum* physical map and on the genetic distances between the markers of the *S. lycopersicum* × *S. pennellii* reference map, which are far from perfect, especially considering that the latter was constructed with fewer than 100 individuals. However, two independent results support the accuracy of the *S. pennellii* physical map. First, 24% of the initially anchored clones were further localized at the same position by hybridization with another closely linked or cosegregating marker. Second, the positions of 43% of the anchored clones were confirmed by sequence identity to both mapped markers and to *S. lycopersicum* genomic sequences.

The hypothesis of Solanaceae genome colinearity has been proposed several times based on comparative genetic mapping experiments, which yielded evidence for the conservation of gene repertoire and colinear chromosome segments for related species (Wang et al., 2008). Particular features of the physical map presented here suggest the presence of local breaks in the colinearity of the regions analyzed. For example, the instances wherein *S. pennellii* and *S. lycopersicum* clones are distant from each other are suggestive of chromosomal inversion and/or InDels. Moreover, some *S. pennellii* genomic intervals seem to

Table III. Estimation of divergence time between *S. lycopersicum* and *S. pennellii*

BIN	<i>S. lycopersicum</i> BAC ^a	<i>S. pennellii</i> BAC/Cosmid ^b	Substitution Rate ^c	Divergence Time ^d
4I ^e	C04HBa0331L22	C04SpBP093E005.P4C04	4.26×10^{-9}	2,936,857 (±690,736)
7H ^f	C07HBa0061J13	C07SpCP066B007.P5C04	4.44×10^{-9}	2,700,421 (±661,591)
11C ^g	C11HBa0062I24	C11SpBP029K005.P4E08	4.40×10^{-9}	2,838,221 (±667,537)
4I/7H/11C	All <i>S. lycopersicum</i> genes	All <i>S. pennellii</i> genes	4.37×10^{-9}	2,744,163 (±448,205)

^a*S. lycopersicum* concatenated coding regions. ^b*S. pennellii* concatenated coding regions. ^cRegion-specific substitution rate (substitutions per site per year) calculated according to the fossil record estimation of 120 MYA for the divergence between Arabidopsis and Solanaceae (Bell et al., 2005; Magallon and Sanderson, 2005). ^dSpecies divergence time in MYA (±confidence interval). ^eConcatenated coding regions of genes 2, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 13, and 14. ^fConcatenated coding regions of genes 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, and 14. ^gConcatenated coding regions of genes 2 to 9.

Figure 4. Species divergence time in MYA according to Bell et al. (2005; black), Magallon and Sanderson (2005; black), and Wang et al. (2008; blue). *S. pennellii* and *S. lycopersicum* divergence (green) was estimated using a molecular clock. SHACOP_I_MT (red) and TOP-SCOTCH_LP_I (gray) retrotransposon insertions are indicated by arrows. [See online article for color version of this figure.]

be compressed in *S. lycopersicum*, hinting at the expansion of specific *S. pennellii* regions, which is in agreement with the larger genome size estimation for this species (Arumuganathan and Earle, 1991). The results of microsynteny analysis, which revealed larger intergenic regions in *S. pennellii* than in *S. lycopersicum*, reinforce this statement. These rearranged regions, together with the screening for SNPs and InDels, will likely facilitate the identification of polymorphic markers.

As reported by Zhao et al. (2002), the sequence of 114 BAC clones from the taxonomically related rice subspecies *Oryza sativa indica* 'Guangluai 4' was particularly useful for gap closing of sequence gaps of rice chromosome 4. Although a significant number of InDels were detected between the two tomato species, the *S. pennellii* BAC/cosmid clones anchored in this work allowed the detection of 64 extension clones (those matching the *S. lycopersicum* genome at only one end) and another 21 clones filling in gaps between two *S. lycopersicum* clones (those matching two nonoverlapping *S. lycopersicum* clones of the same region). Together with the information obtained from the anchoring results described above, all these sequences provide useful tools for comparative genome analyses, map-based cloning, validation of genome sequence assemblies, and an easier access to the regulatory sequences surrounding important genes.

Annotation of *S. pennellii* Coding Sequences

After annotation of the 436 nonredundant end sequences and the nine BAC/cosmid clones, 407 genes were identified. In agreement with all large-scale plant genome analyses, our results for large-insert sequences display an inverse distribution between genes and TE-containing regions (Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Paterson et al., 2009). In particular, the

gene density along BIN 4I (0.2 genes kb^{-1}) doubles that of the rest of the genomic regions analyzed (0.1 genes kb^{-1}), while it displays the lowest density of TEs. Gene identification by end sequence data analysis also revealed BINs 4I and 7H as the most gene-enriched regions. These gene density values are higher than those previously estimated for *S. lycopersicum* heterochromatin (Van der Hoeven et al., 2002; Wang et al., 2008; Mueller et al., 2009), although it should be noted that they may reflect a bias considering the high abundance of QTLs in these genomic regions.

Focusing on a region of tomato chromosome 7 of about 57 kb, Rossberg et al. (2001) found the same arrangement of five predicted genes as that found in a region of Arabidopsis chromosome 1. This kind of colinearity with Arabidopsis has also been reported for a region of tomato chromosome 2 harboring the major fruit-shape locus *ovate* with Arabidopsis chromosome 4 (Ku et al., 2001) and between a tomato centromeric BAC of chromosome 6 harboring the *FER* locus and three distinct regions on Arabidopsis chromosomes 2, 3, and 5 (Guyot et al., 2005). With the exception of the case of BIN 1C, our results from BAC/cosmid full-length sequencing revealed several examples of microsynteny between the *S. pennellii* and Arabidopsis genomes. These results, together with those recently published from genome-wide approaches in Arabidopsis detecting a few genetic "hot spots" exhibiting major effects on hundreds of QTLs (Lisec et al., 2008; Fu et al., 2009), open new routes to explore further relations between common pathways regulating metabolism in these two species.

Concerning gene categorization, the number of gene classes per BIN ranges between nine for BIN 11C and 19 for BIN 7H, suggesting a functional compartmentalization of the genome, at least for the analyzed regions. Among all the identified genes, several plausible candidates that could directly underlie previously reported metabolic QTLs can be identified. However, the analyzed sequences represent only 10% of these regions, and the participation of these genes defining the metabolic QTLs remain to be functionally proven. A combination of the generation of recombinant lines harboring smaller introgressions of the *S. pennellii* genome and reverse genetic approaches is under way at present to assess the candidature of these genes.

Microsynteny and Evolutionary Analysis of Orthologous Regions

Domestication of crops is arguably the most dramatic recent event in plant evolution. Evidence indicates that most of the anatomical changes selected during domestication are determined by the modification of gene expression patterns of a few regulatory loci (Doebley et al., 1997). This is the case, for example, of the *fw2.2* locus, responsible for the fruit weight variation between wild and cultivated tomato (Frery et al., 2000). Moreover, the large- and small-fruit alleles

do not differ in protein sequence but in transcription levels due to promoter polymorphisms (Nesbitt and Tanksley, 2002). With the putative fruit-related loci analyzed in this work, a slightly different panorama is observed when comparing *S. pennellii* and *S. lycopersicum*. A total of 277,534 bases were compared between both species. A total of 32 out of the 38 completed genes identified displayed amino acid polymorphisms, and 16 out of the 27 genes with estimated *ds/dn* displayed neutral selection. Even the eight genes with significant purifying selection showed amino acid polymorphisms. These results indicate that coding regions have accumulated polymorphisms since both species diverged. With the exception of a cytomatrix-encoding protein (Sp04gBP4C04.14), all the coding regions displayed significant purifying selection between tomato and Arabidopsis, thus indicating that the analyzed genes have a conserved function.

Using an estimated substitution rate of 6.03×10^{-9} and four loci, Nesbitt and Tanksley (2002) reported that *S. pennellii* and *S. lycopersicum* diverged 7.0 MYA. More recently, Wang et al. (2008) reported the analysis of sequences for an unduplicated conserved syntenic segment in the genomes of five Solanaceae species (petunia [*Petunia hybrida*], pepper [*Capsicum annuum*], eggplant [*Solanum melongena*], potato [*Solanum tuberosum*], and tomato). The results indicated that the last common ancestor of these species lived approximately 31.2 MYA and that the divergence of tomato and potato had occurred approximately 6.2 MYA. In this study, a more precise calculation using specific substitution rates and genetic distances of 27 different loci along three different chromosomes allows us to estimate the divergence between *S. pennellii* and *S. lycopersicum* at 2.7 MYA. Since *S. pennellii* is one of *S. lycopersicum*'s most distantly related wild species, our results indicate that the *lycopersicum* species of the genus *Solanum* began its radiation more recently than previously estimated. Two different Copia-like LTR retrotransposons were found through the analyzed regions. Their corresponding insertion dates were estimated, and they were shown to have occurred after both tomato species diverged. Recently, several reports have demonstrated the impact of TEs on important agronomical traits. As illustrative examples, we can mention the effects of the insertion of retrotransposons in β -carotene accumulation in cauliflower (*Brassica oleracea*) plastids (Lu et al., 2006) and in gene duplication causing morphological variations of tomato fruit (Xiao et al., 2008). In this direction, work is in progress to further investigate whether the recently inserted retrotransposons identified here could be involved in differential gene expression patterns between *S. pennellii* and *S. lycopersicum*.

CONCLUSION

In this work, we integrated physical and genetic maps of selected regions of two tomato species, *S.*

lycopersicum and *S. pennellii*. Together with BAC/cosmid end sequencing, we detected a number of putative SNPs and InDels that could be particularly useful as a screening tool in fine-mapping approaches and that, following experimental validation, could be of considerable practical relevance in breeding programs. Moreover, they will aid in filling marker-poor segments of the genome and in understanding the relationship between levels of crossing over per physical distance and levels of polymorphism in Solanaceae species. Targeted sequencing of BAC/cosmid clones, gene annotation, and comparative analyses suggest that changes in both coding and noncoding sequences could be implicated in the phenotypic diversity within the genus. In addition, a precise estimation of *S. pennellii* and *S. lycopersicum* divergence time indicates that tomato radiation occurred 2.7 MYA.

The framework of the physical map, sequence assembly, and novel candidate genes presented here provides a considerable collection of resources for tomato research, especially considering the 104 QTLs that have previously been mapped to the genomic regions analyzed. Together with previous genomic sequences of *S. pennellii* candidate genes (Bermúdez et al., 2008), these resources constitute a valuable data set repository of genomic information for this Solanaceae species. Work is in progress to further characterize the functions of several of the novel candidate genes described here.

Note

While this paper was under revision, a draft of the tomato genome sequence was released (December 1, 2009, International Tomato Genome Sequencing Consortium; <http://solgenomics.net/tomato/>). Thus, the analyses performed in this work were rerun and 82 further *S. pennellii* BAC/cosmid clones were putatively anchored to *S. lycopersicum* scaffolds. However, it is important to point out that these scaffolds are not yet physically ordered and, consequently, the expected map positions of these *S. pennellii* sequences are not confirmed. Although the *S. pennellii* sequences reported here were compared with a considerable number of BAC sequences and with a draft version of the cultivated tomato genome, 35% of the *S. pennellii* BAC/cosmid clones remained unanchored. This could be indicative of either a discontinued synteny between the species and/or a lack of corresponding *S. lycopersicum* genomic sequence information and thus requires further analyses.

MATERIALS AND METHODS

Screening and Anchoring of *Solanum pennellii* Genomic Clones

The five genomic regions selected for analysis were BINs 1C, 2B, 4I, 7H, and 11C, which were determined by the overlapping of *Solanum pennellii* IL introgressed fragments according to the Tomato-EXPEN 1992 map (*Solanum*

lycopersicum LA925 × *S. pennellii* LA716; <http://www.sgn.cornell.edu/>; Eshed and Zamir, 1995). In order to select markers spanning the regions of interest, Southern-blot hybridizations were performed using the BIN flanking markers as probes (Sambrook et al., 1989). This analysis allowed us to delimit the five selected BINs between markers TG24 and TG80, TG31 and CT106, CT173 and TG464, TG199 and TG499, and TG523 and TG384 for the 1C, 2B, 4I, 7H, and 11C chromosomal segments, respectively (data not shown). The selected regions carry a total of 277 molecular markers mapped on the publicly available Tomato-EXPEN 2000 and Tomato-EXPEN 1992 maps spanning 99.1 cM (BIN 1C, 19.4 cM; BIN 2B, 13.0 cM; BIN 4I, 11.7 cM; BIN 7H, 36.0 cM; BIN 11C, 19.0 cM). A total of 104 markers that map to single loci in *S. lycopersicum* were used for library screening (Table I). Ninety overgo-derived markers were selected from the collection available at the SGN site. The other 14 were in-house designed with the OligoSpawn software (Zheng et al., 2006). The complete list of the 104 overgoes used in this study is given in Supplemental Table S1.

The *S. pennellii* (accession LA716, the donor parent of the IL population) genomic libraries were built in pBeloBACII (52,992 clones) and pCLD04541 (50,304 clones) vectors for BAC and cosmid, respectively (Chen et al., 2007). Both libraries were the result of genomic DNA partially digested with *Hind*III endonuclease. High-density membranes were screened with 15 to 20 pooled overgo probes (first hybridization). A two-dimensional pooling strategy was performed in order to anchor each clone to its corresponding hybridizing marker (second hybridization). Hybridizations were performed according to Sambrook et al. (1989) with minor modifications. BAC/cosmid filters were prehybridized in a solution containing 2× SSC, 0.1% SDS, and 10 mg mL⁻¹ salmon sperm DNA for 3 h at 65°C. Probes were denatured with 0.4 N NaOH added to each hybridization recipient and hybridized at 65°C overnight. Filters were washed in 2× SSC and 0.1% SDS at 65°C for 5 min and then in 1.0× SSC and 0.1% SDS at 65°C for 30 min.

BAC/Cosmid Clone Insert Size Estimation and Sequencing

DNA was purified using the R.E.A.L Prep 96 Plasmid Kit (Qiagen). Clone insert sizes were estimated by pulsed-field gel electrophoresis by digesting 0.5 to 2 μg of purified DNA with *Not*I endonuclease in order to release the insert. Insert size was calculated with ImageQuant TL 7.0 software (G&E).

For BAC/cosmid end sequencing, 0.2 to 0.5 μg of purified DNA was used, and sequencing reactions were performed with ABI Big Dye Terminator version 3.1. Samples were read in an ABI 3730 sequencer. Vector and low-quality sequences (Qv < 20) were trimmed out, and only reads above 300 nucleotides were considered.

BAC/cosmid full-length sequencing was performed either by shotgun (Macrogen) or pyrosequencing (454 Life Sciences, through a partnership with Roche). Reads were assembled using the Phred+Phrap+Consed software package (Ewing and Green, 1998; Gordon et al., 1998).

Map Building

All the generated sequences were masked using the Repeat Masker program (<http://www.repeatmasker.org>) before analysis in order to avoid further associations with nonorthologous regions. End reads from BAC/cosmid clones, anchored to the same marker, were subjected to contig assembly with the DNA Baser version 2.60.90 software with default parameters. A Python script (Chapman and Chang, 2000) was used to analyze the nonrepetitive sequences, either from contigs or singletons by BLASTN (Altschul et al., 1990). The databases used were (1) all currently available *S. lycopersicum* genomic clone sequences and (2) the marker sequence database. Both databases are accessible at the ftp site of <http://www.sgn.cornell.edu/>. For comparison against *S. lycopersicum* BAC sequences (version 441, October 5, 2009, containing 1,188 sequences and encompassing 127,592,092 bp), a hit criterion of above 80% identity was considered. For comparison against marker sequences (database containing 9,625 sequences and encompassing 3,947,844 bp), only hits with at least 96% identity across more than 150 bp were considered. Furthermore, the associations between *S. lycopersicum* genomic clone sequences and marker sequences were identified using the Marker search feature from the SGN Web site with the parameters mentioned above. The complete set of established relationships is presented in Supplemental Table S2A. Anchored clones and end sequences are available at the SGN Web site in the Tomato Physical Map interface (<http://www.sgn.cornell.edu/cvview/>).

Annotation of BAC/Cosmid End Sequences and Polymorphism Analyses

Nonrepetitive singletons and contigs were annotated by comparison against the following databases: nonredundant proteins at the National Center for Biotechnology Information (November 2008 version, 9,487,554 sequences and 3,243,454,420 bp), the unigenes database at SGN (February 2009 version, 123,550 sequences and 92,327,235 bp), and the Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) protein database (The Arabidopsis Information Resource 8, 38,963 sequences and 85,192,362 bp) using BLASTN and BLASTX with e-values ≤ 10⁻⁶, above 80% identity along ≥300 bp. Repetitive sequences were annotated by comparison against The Institute for Genomic Research (TIGR) plant repeat databases (ftp://ftp.tigr.org/pub/data/TIGR_Plant_Repeats/) using BLASTN with e-values ≤ 10⁻⁵ (Altschul et al., 1990). All annotated sequences (including large-insert sequences; see below) were organized in functional classes according to the MapMan ontology software (<http://mapman.mpimp-golm.mpg.de>).

SNP and InDel analyses were performed with the SeqScape version 2.5 software using a base call value of 20 or greater as true nucleotides, removing bases from the ends until fewer than four bases out of 20 had Qv < 20 and filtering settings by default. Graphical output was performed by a bespoke Python script, which parses the formatted SeqScape output and reads both the position and the kind of polymorphism (SNP or InDel). An arbitrary value of 1 was used for SNPs, while InDels could take a value of 2 or 3 depending of the InDel size. Positive values were used for SNPs and insertions and negative values were used for deletions.

Large-Insert Sequence Annotation

S. pennellii BAC/cosmid full-length sequences as well as three *S. lycopersicum* BAC clones, C04HBa0331L22, C07HBa0061J13, and C11HBa0062I24, were annotated using two different gene prediction programs: FGENESH (www.softberry.com; Salamov and Solovyev, 2000) and Augustus (<http://augustus.gobics.de>; Stanke et al., 2004). Each BAC/cosmid was screened independently against the SGN unigene database (<http://www.sgn.cornell.edu/>; September 2009 version, 123,550 sequences and 92,327,235 bp) using the sequence comparison programs cross-match (www.phrap.org). Predicted genes were hand curated by comparison with the corresponding identified unigene by BLAST (Altschul et al., 1990). When no unigene hit was found at the SGN database, TIGR Plant Transcript Assemblies database was used (<http://plantta.tigr.org/>). Only genes predicted both by gene prediction programs and matching an mRNA sequence were annotated. The criteria for gene annotation were (1) at least 95% identity and above 90% coverage of the unigene length or (2) at least 70% identity over 85% of sequence length when only Arabidopsis mRNAs were found.

Repetitive sequences were identified using RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org>) software, and only elements covering at least 70% of the matching repeat sequence were considered. LTR retrotransposons were also identified using LTR finder (http://litr.fudan.edu.cn/ltr_finder/). Element class and family name, as well as the matching repeat sequence available at Repbase (www.girinst.org), are indicated in Supplemental Table S5.

A new nomenclature to name *S. pennellii* genes is proposed: SpXXgB(or C)XXXXX.#, where Sp stands for *S. pennellii*, the two digits indicate the chromosome number, g represents the genomic sequence, B stands for BAC or C for cosmid vectors, the five digits address library coordinates, and # stands for consecutive numbers indicating gene order within the clone.

For comparative analysis between *S. lycopersicum* and *S. pennellii* orthologous genomic regions, the *S. lycopersicum* BAC clone sequence that better spanned the *S. pennellii* sequence was selected. Sequence comparisons between genotypes for InDel and SNP identification were calculated using the Needleman-Wunsch global alignment algorithm available at <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/>.

Evolutionary Analyses

Alignments of coding regions were performed with ClustalW multiple alignment software (version 1.5; Thompson et al., 1994) and hand curated with reference to amino acid alignment. Synonymous (*ds*) and nonsynonymous (*dn*) distances and their se values were estimated with MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004) using the corrected Nei-Gojobori method (Jukes-Cantor). Codon bias was determined by the effective number of codons value computed using DNAsp version 4.10.9 (Rozas et al., 2003). Test of

selection was also performed with MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004) using the corrected Nei-Gojobori method. To reject the null hypothesis of neutral selection ($ds = dn$), $P < 0.05$ was considered in the Z test. Relative rate tests were performed utilizing HYPHY (http://www.hyphy.org) using the codon model proposed by Muse and Gaut (1994). To reject the homogeneity null hypothesis, $P < 0.05$ was considered in the χ^2 test. Genomic region-specific substitution rates (K) and species divergence time were estimated using $K = ds/2T$, where ds is the estimated number of synonymous substitutions per site between homologous sequences (synonymous distance) and T is the divergence time. K was estimated using the fossil-supported *Arabidopsis*/*Solanaceae* divergence time (120 MYA; Bell et al., 2005; Magallon and Sanderson, 2005), and ds was estimated based on concatenated coding regions per chromosome.

For retrotransposon dating, both LTRs of copies with target site duplications were aligned using the ClustalW multiple alignment software (version 1.5; Thompson et al., 1994). The distance (D) between LTRs and its SE were estimated with MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004) using Kimura 2-parameter, which corrects for homoplasy and differences in the rates of transition and transversion. The retrotransposon insertion date was estimated using $T = D/2K$, where K represents the 1.3×10^{-8} substitutions per site per year as proposed by Ma and Bennetzen (2004). Confidence intervals were calculated using the SE of the mean distance (D) as estimated with MEGA 3.1.

Sequence data from this article have been deposited within the GenBank data libraries under accession numbers FJ277973 to FJ278499, FJ809740 to FJ809747, and FJ812349.

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure S1. SNP and InDel mapping.

Supplemental Table S1. Markers used for *S. pennellii* BAC/cosmid genomic library screening.

Supplemental Table S2. *S. pennellii* physical map data, *S. pennellii* contig sequences, and SNPs and InDels between *S. pennellii* end sequences and *S. lycopersicum* BAC clones.

Supplemental Table S3. BAC/cosmid end sequence annotation.

Supplemental Table S4. Annotation of *S. pennellii* fully sequenced BAC/cosmid clones from BINs 1C, 2B, 4I, 7H, and 11C.

Supplemental Table S5. *S. pennellii* transposable elements identified in full-length sequenced clones.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mariana Conte for technical assistance and Agustín Montenegro and Ignacio Tevez for taking care of the tomato plants. L.K., R.A., and F.C. are members of Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

Received November 6, 2009; accepted January 26, 2010; published January 29, 2010.

LITERATURE CITED

- Altschul SE, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403–410
- Arabidopsis* Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796–815
- Arumuganathan K, Earle E (1991) Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Mol Biol Rep* **9**: 208–218
- Bell CD, Soltis DE, Soltis PE (2005) The age of the angiosperms: a molecular timescale without a clock. *Evolution* **59**: 1245–1258
- Bermúdez L, Urias U, Milstein D, Kamenetzky L, Asis R, Fernie AR, Van Sluys MA, Carrari F, Rossi M (2008) A candidate gene survey of quantitative trait loci affecting chemical composition in tomato fruit. *J Exp Bot* **59**: 2875–2890
- Chapman BA, Chang JT (2000) Biopython: Python tools for computational biology. *ACM SIGBIO Newsletter* **20**: 15–19
- Chen KY, Cong B, Wing R, Vrebalov J, Tanksley SD (2007) Changes in regulation of a transcription factor lead to autogamy in cultivated tomatoes. *Science* **318**: 643–645
- Doebley J, Stec A, Hubbard L (1997) The evolution of apical dominance in maize. *Nature* **386**: 485–488
- Eshed Y, Zamir D (1995) An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics* **141**: 1147–1162
- Ewing B, Green P (1998) Basecalling of automated sequencer traces using phred II: error probabilities. *Genome Res* **8**: 186–194
- Fernie AR, Willmitzer L (2001) Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. *Plant Physiol* **127**: 1459–1465
- Frary A, Nesbitt TC, Grandillo S, Knaap E, Cong B, Liu J, Meller J, Elber R, Alpert KB, Tanksley SD (2000) *fw2.2*: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* **289**: 85–88
- Fridman E, Carrari F, Liu YS, Fernie A, Zamir D (2004) Zooming in on a quantitative trait for tomato yield using interspecific introgressions. *Science* **305**: 1786–1789
- Fridman E, Pleban T, Zamir D (2000) A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 4718–4723
- Fu J, Keurentjes JJB, Bouwmeester H, America R, Verstappen FWA, Ward JL, Beale MH, de Vos RCH, Dijkstra M, Scheltema RA, et al (2009) System-wide molecular evidence for phenotypic buffering in *Arabidopsis*. *Nat Genet* **41**: 166–167
- Gordon D, Abajian C, Green P (1998) Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res* **8**: 195–202
- Gregory SG, Sekhon M, Schein J, Zhao S, Osoegawa K, Scott CE, Evans RS, Burrige PW, Cox TV, Fox CA, et al (2002) A physical map of the mouse genome. *Nature* **418**: 743–750
- Guyot R, Cheng X, Su Y, Cheng Z, Schlagenhauf E, Keller B, Ling HQ (2005) Complex organization and evolution of the tomato pericentromeric region at the *FER* gene locus. *Plant Physiol* **138**: 1205–1215
- Ku HM, Liu J, Doganlar S, Tanksley SD (2001) Exploitation of *Arabidopsis*-tomato synteny to construct a high-resolution map of the *ovate*-containing region in tomato chromosome 2. *Genome* **44**: 470–475
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* **5**: 150–163
- Lippman ZB, Semel Y, Zamir D (2007) An integrated view of quantitative trait variation using tomato interspecific introgression lines. *Curr Opin Genet Dev* **17**: 545–552
- Lisec J, Meyer RC, Steinfath M, Redestig H, Becher M, Witucka-Wall H, Fiehn O, Törjék O, Selbig J, Altmann T, et al (2008) Identification of metabolic and biomass QTL in *Arabidopsis thaliana* in a parallel analysis of RIL and IL populations. *Plant J* **53**: 960–972
- Liu YS, Gur A, Ronen G, Causse M, Damidaux R, Buret M, Hirschberg J, Zamir D (2003) There is more to tomato fruit colour than candidate carotenoid genes. *Plant Biotechnol J* **1**: 195–207
- Lu S, Van Eck J, Zhou X, Lopez AB, O'Halloran DM, Cosman KM, Conlin BJ, Paolillo DJ, Garvin DF, Vrebalov J, et al (2006) The cauliflower Or gene encodes a DnaJ cysteine-rich domain-containing protein that mediates high levels of β -carotene accumulation. *Plant Cell* **18**: 3594–3605
- Ma J, Bennetzen JL (2004) Rapid recent growth and divergence of rice nuclear genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 12404–12410
- Magallon SA, Sanderson MJ (2005) Angiosperm divergence times: the effect of genes, codon positions, and time constraints. *Evolution* **59**: 1653–1670
- Mueller L, Tanksley S, Giovannoni JJ, Vaneck J, Stack S, Buels R (2009) A snapshot of the emerging tomato genome sequence. *Plant Genome* **2**: 78–92
- Mueller LA, Solow TH, Taylor N, Skwarecki B, Buels R, Binns J, Lin C, Wright MH, Ahrens R, Wang Y, et al (2005) The SOL Genomics Network: a comparative resource for Solanaceae biology and beyond. *Plant Physiol* **138**: 1310–1317
- Muse SV, Gaut BS (1994) A likelihood approach for comparing synonymous and nonsynonymous nucleotide substitution rates, with application to the chloroplast genome. *Mol Biol Evol* **11**: 715–724
- Nesbitt TC, Tanksley SD (2002) Comparative sequencing in the genus *Lycopersicon*: implications for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated tomatoes. *Genetics* **162**: 365–379
- Paterson AH, Bowers JE, Bruggmann R, Dubchak I, Grimwood J,

- Gundlach H, Haberer G, Hellsten U, Mitros T, Poliakov A, et al (2009) The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. *Nature* **457**: 551–556
- Rossberg M, Theres K, Acarkan A, Herrero R, Schmitt T, Schumacher K, Schmitz G, Schmidt R (2001) Comparative sequence analysis reveals extensive microcolinearity in the lateral suppressor regions of the tomato, *Arabidopsis*, and *Capsella* genomes. *Plant Cell* **13**: 979–988
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**: 2496–2497
- Salamov AA, Solovyev VV (2000) Ab initio gene finding in Drosophila genomic DNA. *Genome Res* **10**: 516–522
- Sambrook J, Fritsch T, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Schauer N, Semel Y, Balbo I, Steinfath M, Reipsilber D, Selbig J, Pleban T, Zamir D, Fernie AR (2008) Mode of inheritance of primary metabolic traits in tomato. *Plant Cell* **20**: 509–523
- Schauer N, Semel Y, Roessner U, Gur A, Balbo I, Carrari F, Pleban T, Perez-Melis A, Bruedigam C, Kopka J, et al (2006) Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nat Biotechnol* **24**: 447–454
- Semel Y, Nissenbaum J, Menda N, Zinder M, Krieger U, Issman N, Pleban T, Lippman Z, Gur A, Zamir D (2006) Overdominant quantitative trait loci for yield and fitness in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 12981–12986
- Stanke M, Steinkamp R, Waack S, Morgenstern B (2004) AUGUSTUS: a Web server for gene finding in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **32**: 309–312
- Thompson J, Higgins D, Gibson T (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673–4680
- Tieman DM, Zeigler M, Schmelz EA, Taylor MG, Bliss P, Kirst M, Klee HJ (2006) Identification of loci affecting flavour volatile emissions in tomato fruits. *J Exp Bot* **57**: 887–896
- Urbanczyk-Wochniak E, Usadel B, Thimm O, Nunes-Nesi A, Carrari F, Davy M, Bläsing O, Kowalczyk M, Weicht D, Polinceusz A, et al (2006) Conversion of MapMan to allow the analysis of transcript data from solanaceous species: effects of genetic and environmental alterations in energy metabolism in the leaf. *Plant Mol Biol* **60**: 773–792
- Van der Hoeven R, Ronning C, Giovannoni J, Martin G, Tanksley S (2002) Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *Plant Cell* **14**: 1441–1456
- Wallis JW, Aerts J, Groenen MA, Crooijmans RP, Layman D, Graves TA, Scheer DE, Kremitzki C, Fedele MJ, Mudd NK, et al (2004) A physical map of the chicken genome. *Nature* **432**: 761–764
- Wang Y, Diehl A, Wu F, Vrebalov J, Giovannoni J, Siepel A, Tanksley SD (2008) Sequencing and comparative analysis of a conserved syntenic segment in the Solanaceae. *Genetics* **180**: 391–408
- Xiao H, Jiang N, Schaffner E, Stockinger EJ, Van der Knaap E (2008) A retrotransposon-mediated gene duplication underlies morphological variation of tomato fruit. *Science* **319**: 1527–1530
- Zamir D (2001) Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nat Rev Genet* **2**: 983–990
- Zhao Q, Zhang Y, Cheng Z, Chen M, Wang S, Feng Q, Huang Y, Li Y, Tang Y, Zhou B, et al (2002) A fine physical map of the rice chromosome 4. *Genome Res* **12**: 817–823
- Zheng J, Svensson JT, Madishetty K, Close TJ, Jiang T, Lonardi S (2006) *OligoSpawn*: a software tool for the design of overgo probes from large unigene datasets. *BMC Bioinformatics* **7**: 7

ANEXO 2

RESEARCH PAPER

Genetic dissection of vitamin E biosynthesis in tomato

Juliana Almeida¹, Leandro Quadrana², Ramón Asís³, Nathalia Setta¹, Fabiana de Godoy¹, Luisa Bermúdez¹, Santiago N. Otaiza³, Junia V. Corrêa da Silva¹, Alisdair R. Fernie⁴, Fernando Carrari^{2,5} and Magdalena Rossi^{1,5,*}

¹ Departamento de Botânica-IB-USP, 277, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil

² Instituto de Biotecnología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (IB-INTA), and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), PO Box 25, B1712WAA Castelar, Argentina (partner group of the Max Planck Institute for Molecular Plant Physiology, Potsdam-Golm, Germany)

³ CIBICI, Facultad de Ciencias Químicas Universidad Nacional de Córdoba, CC 5000, Córdoba, Argentina

⁴ Max Planck Institute for Molecular Plant Physiology, Wissenschaftspark Golm, Am Mühlenberg 1, Potsdam-Golm, D-14476, Germany

⁵ These authors contributed equally to this work

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: fcarrari@cni.inta.gov.ar; E-mail: mmrossi@usp.br

Received 25 October 2010; Revised 7 February 2011; Accepted 8 February 2011

Abstract

Vegetables are critical for human health as they are a source of multiple vitamins including vitamin E (VTE). In plants, the synthesis of VTE compounds, tocopherol and tocotrienol, derives from precursors of the shikimate and methylerythritol phosphate pathways. Quantitative trait loci (QTL) for α -tocopherol content in ripe fruit have previously been determined in an *Solanum pennellii* tomato introgression line population. In this work, variations of tocopherol isoforms (α , β , γ , and δ) in ripe fruits of these lines were studied. In parallel all tomato genes structurally associated with VTE biosynthesis were identified and mapped. Previously identified VTE QTL on chromosomes 6 and 9 were confirmed whilst novel ones were identified on chromosomes 7 and 8. Integrated analysis at the metabolic, genetic and genomic levels allowed us to propose 16 candidate loci putatively affecting tocopherol content in tomato. A comparative analysis revealed polymorphisms at nucleotide and amino acid levels between *Solanum lycopersicum* and *S. pennellii* candidate alleles. Moreover, evolutionary analyses showed the presence of codons evolving under both neutral and positive selection, which may explain the phenotypic differences between species. These data represent an important step in understanding the genetic determinants of VTE natural variation in tomato fruit and as such in the ability to improve the content of this important nutraceutical.

Key words: Fruit metabolism, *Solanum pennellii*, tocopherol, tomato, vitamin E.

Introduction

Vegetables are critical for human health as they are a source of multiple vitamins and other essential compounds. In particular, tomato fruits are an important dietary source of antioxidants for humans due both to the fact that have a high intrinsic content of these compounds and the elevated consumption of this crop by the western population. The main non-enzymatic antioxidants found in tomato fruits are ascorbic acid (VTC), lycopene and carotenoids, phenolics, and vitamin E (VTE) (Abushita

et al., 1997; Frusciante *et al.*, 2007). Recent studies have reinforced the hypothesis of beneficial effects of VTE on human health, mainly in the prevention of coronary heart disease, breast cancer, and protection against nicotine-induced oxidative stress in the brain (Das *et al.*, 2009; Ros 2009; Zhang *et al.*, 2009). Although its function in plants remains somewhat undefined, several reports link VTE to the protection of pigments, proteins, and polyunsaturated fatty acids of the photosynthetic apparatus against reactive

Abbreviations: IL, introgression line; LRT, likelihood ratio test; MEP, methylerythritol phosphate; QTL, quantitative trait loci; ROS, reactive oxygen species; SK, shikimate; VTC, vitamin C; VTE, vitamin E.

© 2011 The Author(s).

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

oxygen species (ROS) generated during photosynthesis (Semchuk *et al.*, 2009). It has additionally been proposed that VTE interacts with other antioxidant mechanisms in order to maintain cellular redox homeostasis (Foyer and Noctor, 2005).

The synthesis of VTE occurs in photosynthetic organisms and its major constituents are a group of amphipathic molecules containing a polar chromanol head group derived from homogentisate and a polyprenyl lipophilic side chain, products of the shikimate (SK) and methylerythritol phosphate (MEP) pathways, respectively. VTE compounds, collectively termed tocochromanols, can be classified into two groups on the basis of the degree of saturation of their hydrophilic tails. Tocopherols, which are the most abundant in plants, have saturated tails derived from phytyl 2P, whereas tocotrienols have an unsaturated tail derived from geranylgeranyl 2P. The VTE biosynthesis pathway proceeding from the reduction of hydroxyphenylpyruvate to homogentisate is considered the 'VTE core pathway' and comprises seven enzymes: 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD, EC 1.13.11.27), homogentisic acid geranylgeranyl transferase (HGGT/HST, EC 2.5.1.-), homogentisate phytyl transferase (VTE2, EC 2.5.1.-), dimethyl-phytylquinol methyl transferase (VTE3, EC 2.1.1.-), tocopherol cyclase (VTE1, EC 5.3.-.-), γ -tocopherol C-methyl transferase (VTE4, EC 2.1.1.95), and phytol kinase (VTE5, EC 2.7.-.-). There are four naturally occurring forms of tocopherols and tocotrienols (α , β , γ , and δ), which differ in the position and number of methyl groups on the chromanol ring (Munné-Bosch and Alegre, 2002). Although all VTE isoforms are potent antioxidants *in vitro*, α -tocopherol is the most active in terms of vitamin activity, partly because it is retained in the human body in preference to other tocopherols and tocotrienols (Traber and Sies, 1996). In plants, tocochromanol has been found exclusively in plastids. Since it has not been proved thus far that any isoform can be transported within the plant, and the enzymes of the core pathway have been found in plastids (Sun *et al.*, 2009), it is assumed that the biosynthesis also occurs in this compartment.

Although the VTE biosynthetic pathway was elucidated in 1979 (Soll and Schultz, 1979), the identification of the genes involved is much more recent. In the last decade, via the use of genetic and genomics-based methods, the genes encoding the enzymes for most of the steps of the VTE core biosynthesis pathway have been identified and cloned. However, as yet, this is confined to the model organisms *Arabidopsis thaliana* and *Synechocystis* sp. PCC6803 (Li *et al.*, 2008). Indeed, the characterization of VTE mutants and transgenic lines has provided considerable insight into the regulatory network of tocochromanol biosynthesis (for review see Mène-Saffrané and DellaPenna, 2009; Falk and Munné-Bosch, 2010). These combined studies have additionally suggested roles for VTE compounds beyond their antioxidant function including their participation in diverse physiological processes including germination, photoassimilate partitioning, growth, leaf senescence, and plant responses to abiotic stress (Falk and Munné-Bosch, 2010).

Moreover, several studies have demonstrated a close interaction between VTE and other metabolic pathways. Tomato fruits overexpressing phytoene synthase (PSY), a key enzyme in carotenoid biosynthesis, displayed increased levels of tocopherol (Fraser *et al.*, 2007). Moreover, tocochromanol content is additionally affected when the post-chorismate pathway is manipulated. *Arabidopsis* transgenic plants overexpressing the bacterial bi-functional chorismate mutase (CM)/prephenate dehydratase (PDT), displayed significantly higher levels of phenylalanine, as well as γ -tocopherol and γ -tocotrienol, besides other secondary metabolites (Tzin *et al.*, 2009). Plant tocochromanol biosynthesis is furthermore subjected to control by both environmental and endogenous signals. In agreement with this statement, the silencing of the light response factor DETIOLATED1 resulted in tomato fruits with enhanced levels of antioxidants, including carotenoids, flavonoids, and tocopherol (Davuluri *et al.*, 2005; Enfissi *et al.*, 2010).

Cultivated tomato (*Solanum lycopersicum*) is the most consumed vegetable globally. The fact that its wild relatives display tremendous variation in metabolite content in both leaves and fruits (Schauer *et al.*, 2005), renders wild germplasm an important source for metabolic gene discovery focused on aiding efforts to improve the nutritional and industrial quality of crop species (Zamir, 2001; Fernie *et al.*, 2006; Tohge and Fernie, 2010). Utilizing this approach, Schauer *et al.* (2006) reported a detailed metabolite profile of 76 tomato introgression lines (ILs) containing chromosome segments of the wild species *Solanum pennellii* in the genetic background of the cultivated *S. lycopersicum* (cv M82; Eshed and Zamir, 1995). Following the quantification of 74 metabolites of known chemical structure, they were able to identify 889 quantitative fruit metabolic loci for variations in the content of amino and organic acids, sugars, alcohols, fatty acids, VTC, and VTE. Two of these quantitative trait loci (QTL), explaining variation in the α -tocopherol fruit content, were located on chromosomes 6 and 9. Independent experiments available at the Tomato Functional Genomics Database (Fei *et al.*, 2006; <http://ted.bti.cornell.edu/>) have also revealed differences in tocopherol content associated with the exact same genomic regions. However, the mechanisms explaining these variations are currently not understood, partially due to a lack of knowledge of the complete VTE biosynthetic pathway in tomato.

The aim of the current report is to provide a framework for associating gene sequence with fruit tocopherol content phenotypes by (i) characterizing and mapping all genes involved in the VTE biosynthesis pathway in tomato, (ii) identifying QTL for the content of the vitamers of VTE and their candidate genes, (iii) cloning and sequencing these genes from *S. pennellii*, and (iv) examining evolutionary patterns of candidate genes by comparing orthologues from *S. pennellii*, *S. lycopersicum*, and *A. thaliana*. The combined results of this study will be discussed in the context of the fundamental understanding of the accumulation of VTE opening further stages for functional analyses.

Materials and methods

Plant material

Tomato seeds from *S. lycopersicum* L. (cv M82) and *S. pennellii* introgressed lines were obtained from Tomato Genetic Resource Center (<http://tgrc.ucdavis.edu>). Tomato plants were grown in 20-l pots under greenhouse conditions: 16/8 h photoperiod, 24 ± 3 °C, 60% humidity, and 140 ± 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ incident photo-irradiance. Cloning was carried out from fully expanded source leaves and mature fruits (60 d after flowering). For tocopherol quantification six ripe fruits were taken from six individual plants of ILs 6-1, 6-2, 7-4, 7-4-1, 7-5, 8-2, 8-2-1, 9-1, 9-2-6. Tissue was collected, immediately frozen into liquid nitrogen, and stored at -80 °C until use.

Survey of tocopherol biosynthesis enzymes, genome mapping, and expression analyses

The VTE pathway presented in Fig. 1 was outlined by combining data reported for enzymatic steps involved in SK, MEP, and VTE biosynthesis available on KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>) and related scientific literature. *Arabidopsis* loci were obtained from the KEGG database and these sequences were used to perform TBLASTN (Altschul *et al.*, 1990) searches against tomato expressed sequences from the Lycopersicon Combined Build # 3 unigene database housed by the Solanaceae Genomics Network (<http://solgenomic.net>). The criteria used to determine orthology were $\geq 40\%$ identity at the amino acid level and $\geq 65\%$ coverage of the *Arabidopsis* protein. For uncompleted unigenes, the coverage cut-off was set at $\geq 30\%$. Based on BLASTN results, all unigene sequences were used as queries to identify the corresponding genomic sequences from the *S. lycopersicum* genome assembly—version 2.31 (3,230 sequences; 781,381,961 total letters)—The International Tomato Genome Sequencing Project at the Solanaceae Genomics Network (<http://solgenomic.net>). *In silico* prediction of the subcellular localization of tomato unigenes was performed using TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>) and ChloroP program (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP>) based on their deduced amino acid sequences.

The identified tomato genes were mapped onto the Tomato-EXPEN 2000 genetic map available at the Solanaceae Genomics Network. The genetic positions were obtained by BLASTN (Altschul *et al.*, 1990) searches of the identified unigenes and/or their corresponding genomic sequences against the entire Tomato-EXPEN 2000 map marker sequences database (<http://solgenomics.net/index.pl>). Map Chart software 2.2 (Voorrips, 2000) was used to construct the graphical representation of the genetic map.

Expression data for the set of genes analysed here were extracted from a TOM1 microarray experiment previously published (Carrari *et al.*, 2006). This experiment comprises transcript analyses from tomato fruits harvested along development and ripening stages (10, 15, 20, 21, 35, 49, 56, and 70 d after anthesis).

Tocopherol quantification by HPLC and QTL mapping

Tocopherol extraction was performed as described by Fraser *et al.* (2000) with the following modifications: tomato fruit were ground to a fine powder in liquid nitrogen and 500 mg of material was extracted with 1.5 ml of methanol and, after vortex-mixing, 1 ml of chloroform was added. Following 5 min of sonication, 1 ml of Tris buffer (50 mM Tris pH 7.5/1 M NaCl) was added. The chloroform phase was recovered and the methanol phase (remaining pellet) was re-extracted with chloroform (2 ml). Chloroform extracts were pooled and adjusted to a final volume of 4 ml. Two millilitres were dried under nitrogen gas and re-suspended in 0.2 ml of 99.5:0.5 hexane/isopropanol. The tocopherol content was determined using a Hewlett-Packard

series 1100 HPLC system coupled with a fluorescence detector (Agilent Technologies series 1200). Separation was carried out on a normal-phase column Metasil Si (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm , Varian; Metachem, Torrance, CA, USA) maintained at room temperature using an isocratic solvent system (mobile phase) consisting of 99.5:0.5 hexane/isopropanol with a flow rate of 1 ml min $^{-1}$. Eluting compounds were detected and quantified by fluorescence with excitation at 296 nm and emission at 340 nm. Identification and quantification of tocopherol compounds was achieved by comparison with the retention times and peak areas of standards purchased from Merck (tocopherol set; Calbiochem #613424). A daily calibration curve was carried out using a tocopherol solution with a concentration range between 0.31 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for each isoform. Data of tocopherol isoforms or total tocopherol content were statistically analysed according to Sokal and Rohlf (1981). When the data pull presented homoscedasticity, with or without data transformation using ln or square root, an ANOVA followed by a Dunnett test ($P < 0.05$) was used to compare tocopherol content between ILs and M82 control. Due to lack of homoscedasticity, a non-parametric comparison was also performed by Kruskal–Wallis test ($P < 0.05$ and $P < 0.1$). Statistical tests were performed with Bioestat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007) and InfoStat v. 2009 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

The position of tocopherol QTL on the Tomato-EXPEN 2000 map was determined according to the flanking markers of the *S. pennellii* introgression fragments in the analysed ILs (Eshed and Zamir, 1995) and mapping of unigenes performed as described in Kamenetzky *et al.* (2010).

Identification of VTE-related pathway candidate genes

Candidate genes were surveyed along the genomic regions spanned by the identified VTE QTL as described in Bermúdez *et al.* (2008). All molecular markers mapped onto the selected genomic regions were identified in the comparison merging the Tomato-EXPEN 2000, the Tomato-EXPEN 1992, and the Tomato IL maps by using the comparative map web interface of the Solanaceae Genomics Network (Mueller *et al.*, 2008). All marker sequences were used as query to identify the corresponding unigenes in the Solanaceae Genomics Network database. Gene product functions were determined according to homology to a previously characterized protein, whose function had been experimentally demonstrated in other related plant species, by using the BLASTX algorithm (Altschul *et al.*, 1990) against the NCBI non-redundant (nr) protein database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The cut-off criteria were: $\geq 40\%$ identity at amino acid level and $\geq 65\%$ coverage of the orthologous *Arabidopsis* protein. For uncompleted unigenes the coverage cut-off was set at $\geq 30\%$.

Amplification, cloning, and sequencing

Total RNA from 100 mg of source leaf or fruit tissue was isolated using Trizol reagent (Invitrogen, #15596-026) and 1 μg from each sample was treated with amplification grade DNase I (Invitrogen, #18068-015) to remove potential contamination of genomic DNA. The treated RNA was reverse-transcribed to first-strand cDNA and primed with oligo(dT) using Superscript First-Strand (Invitrogen, #18080-044) following the manufacturer's protocol.

Primers were designed using the software Oligo Analyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com>) on the basis of unigene sequences including the sequence surrounding the putative ATG start and stop codons. The primer sequences are available in Table S1 in Supplementary data available at JXB online.

Full-length cDNA fragments were generated by PCR using *Taq* Platinum *pfx* DNA polymerase (Invitrogen, #11708-013). The PCR reactions were conducted in a total volume of 50 μl containing 0.3 mM each dNTPs, 0.4 μM each primer, $1.5 \times$ reaction buffer, 1 mM MgSO_4 , ~ 150 ng of cDNA, and 2.5 IU of enzyme. The amplification conditions were: 94 °C for 3 min; 35

Table 1. Identification of tomato genes involved in VTE biosynthesis and QTL- associated candidate genes. *A. thaliana* loci used for evolutionary analyses are underlined.

Enzyme ^a	<i>A. thaliana</i> locus (no. amino acids)	Curated localization ^b	Tomato unigene ^c	Signal peptide ^d	Genomic id ^e	Linked marker ^f	Chromosome position ^g (cM)
1-Deoxy-D-xylulose-5-P synthase (DXS, EC 2.2.1.7)	At4g15560 (717)	Chloroplast	U567647 (1) U316204 (2)	Chloroplast nd	SL2.31sc05941 SL2.31sc03748	T1704 TG523	1 (39 cM) 11 (29 cM)
2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase (DXR, EC 1.1.1.267)	At5g62790 (477)	Chloroplast	U585813	Chloroplast	SL2.31sc03701	C2_At5g23060	3 (102.5 cM)
2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase (CMS, EC 2.7.7.60)	At2g02500 (302)	Chloroplast	U566797	Chloroplast	SL2.31sc04323	TG528	1 (127.5 cM)
4-(Cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase (SPE, EC 2.7.1.148)	At2g26930 (383)	Chloroplast	U583224	Chloroplast	SL2.31sc04133	cTOC-4-C7	1 (19 cM)
2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (ISPF, EC 4.6.1.12)	At1g63970 (231)	Chloroplast	U568497	Chloroplast	SL2.31sc03923	C2_At3g27530	8 (78 cM)
4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl- diphosphate synthase (HDS, EC 1.17.7.1)	At5g60600 (717)	Chloroplast	U567167	Chloroplast	SL2.31sc03876	C2_At5g60600	11 (79 cM)
4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl- diphosphate reductase (HDR, EC 1.17.1.2)	At4g34350 (466)	Chloroplast	U580658	Chloroplast	SL2.31sc04323	C2_At4g34350	1 (154 cM)
Isopentenyl diphosphate δ-isomerase (IPI, EC 5.3.3.2)	At3g02780 (284) At5g16440 (291)	Mitochondria Chloroplast (Phillips et al., 2008)	U577516 (1) U569721 (2)	Chloroplast Chloroplast	SL2.31sc06101 SL2.31sc03902	U49812 C2_At5g04270	4 (64 cM) 5 (112.7 cM)
Geranyl pyrophosphate synthase (GPPS, EC 2.5.1.1)	At2g34630 (422)	Chloroplast (Bouvier et al., 2000)	U573523	Mitochondria	SL2.31sc03835	C2_At1g30360	8 (21.3 cM)
Geranylgeranyl pyrophosphate synthase (GGPS, EC 2.5.1.29)	<u>At4g36810</u> (371) <u>At4g38460</u> (326)	Chloroplast Chloroplast	U574849 (1) U571085 (2) U573348 (3) U575882 (4)	Chloroplast Chloroplast nd Chloroplast	SL2.31sc03748 SL2.31sc04135 SL2.31sc03665 SL2.31sc03771	C2_At5g16710 C2_At1g19340 CT232 T0532	11 (31.4 cM) 4 (112 cM) 2 (90.1 cM) 9 (30 cM)
Geranylgeranyl reductase (GGDR, EC 1.3.1.-)	At1g74470 (467)	Chloroplast	U564571	Chloroplast	SL2.31sc03701	C2_At1G74470	3 (122 cM)
3-Deoxy- D-arabino-heptulosonate-7-P synthase (DAHPS, EC 2.5.1.54)	At1g22410 (527) At4g33510 (432) At4g39980 (525)	Chloroplast Chloroplast Chloroplast (Entus et al., 2002)	U581552 (1) U566921 (2)	Chloroplast nd	SL2.31sc03748 SL2.31sc04135	T0408 T1560	11 (26 cM) 4 (83.5 cM)
3-Dehydroquinate synthase (DHQS, EC 4.2.3.4)	At5g66120 (442)	Chloroplast	U568781	Chloroplast	SL2.31sc03665	C2_At3g01160	2 (83.4 cM)
Shikimate dehydrogenase (SDH, EC 1.1.1.25) / 3-Dehydroquinate dehydratase (DHQ, EC 4.2.1.10)	At3g06350 (603)	Chloroplast	U570855(1) U570070(2)	nd nd	SL2.31sc05941 SL2.31sc03622	T1704 TG221	1 (39 cM) 6 (101 cM)
Shikimate kinase (SK, EC 2.7.1.71)	At2g21940 (276) At4g39540 (300)	nd Chloroplast	U582040	Chloroplast	SL2.31sc06101	C2_At3g62940	4 (56 cM)

Table 1. Continued

Enzyme ^a	<i>A. thaliana</i> locus (no. amino acids)	Curated localization ^b	Tomato unigene ^c	Signal peptide ^d	Genomic id ^e	Linked marker ^f	Chromosome position ^g (cM)
5-Enolpyruvylshikimate-3-P synthase (EPSPS, EC 2.5.1.19)	At1g48860 (521)	Chloroplast	U577580	Chloroplast	SL2.31sc04323	C2_At2g45240	1 (57 cM)
	At2g45300 (520)	Chloroplast					
Chorismate synthase (CS, EC 4.2.3.5)	At1g48850 (380)	Chloroplast	U563165(1) U563163(2)	Chloroplast Chloroplast	SL2.31sc06101 SL2.31sc03604	C2_At3g07950 TG370	4 (56.7 cM) 4 (21.5 cM)
Chorismate mutase (CM, EC 5.4.99.5)	At1g69370 (316)	Chloroplast (Mobley <i>et al.</i> , 1999)	U575627(1)	nd	SL2.31sc03665	T1480	2 (106 cM)
	At5g10870 (340)	Chloroplast (Eberhard <i>et al.</i> , 1996)					
	At3g29200 (265)	Cytosol (Eberhard <i>et al.</i> , 1996)	U585231(2)	nd	SL2.31sc03748	TG147	11 (45 cM)
Prephenate aminotransferase (PAT, EC 2.6.1.57)	At2g22250 (475)	Chloroplast	U567172	Chloroplast	SL2.31sc06101	C2_At4g39830	4 (61 cM)
Arogenate dehydrogenase (TyrA, EC 1.3.1.78)	At1g15710 (358)	Chloroplast	U567861 (1)	Chloroplast	SL2.31sc03731	C2_At5g34850	7 (0.4 cM)
	At5g34930 (640)	Chloroplast (Rippert <i>et al.</i> , 2009)	U570951 (2)	Chloroplast	SL2.31sc03771	T1212	9 (48 cM)
Tyrosine aminotransferase (TAT, EC 2.6.1.5)	At5g53970(414)	nd	U577103(1) U563404 (2)	nd nd	SL2.31sc05925 SL2.31sc03685	C2_At1g53000 C2_At1g03820	10 (7.5 cM) 7 (43 cM)
4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD, EC 1.13.11.27)	At1g06570(473)	Cytosol (Garcia <i>et al.</i> , 1999)	U580457(1) U578997(2)	nd Chloroplast	SL2.31sc03685 SL2.31sc03902	TG584 OLET-6-14	7 (36.5 cM) 5 (70 cM)
Homogentisate geranylgeranyl transferase/ homogentisate solanesyl transferase (HGGT/HST, EC 2.5.1.-)	At3g11945.2 (393)	Chloroplast	U585005	Chloroplast	SL2.31sc06725	C2_At3g58490	3 (72.6cM)
Homogentisate phenyl transferase [HPT (VTE2), EC 2.5.1.-]	At2g18950(393)	Chloroplast	U327540(5') U576207(3')	Chloroplast	SL2.31sc03731	cTOA-13-K15	7 (17 cM)
Dimethyl-phytylquinol methyl transferase [MPBQMT (VTE3), EC 2.1.1.-]	At3g63410(338)	Chloroplast	U578249(1) U581492(2)	Chloroplast Chloroplast	SL2.31sc04777 SL2.31sc04439	T0565 TG324	9 (52 cM) 3 (4.6 cM)
Tocopherol cyclase [TC (VTE1), EC 5.3.-.-]	At4g32770(488)	Chloroplast	U570602	Chloroplast	SL2.31sc04948	C2_At4g32770	8 (34 cM)
γ-Tocopherol C-methyl transferase [γ-TMT (VTE4), EC 2.1.1.95]	At1g64970 (348)	Chloroplast (Ferro <i>et al.</i> , 2010)	U584511	Chloroplast	SL2.31sc03923	TG282	8 (41.8 cM)
Phytol kinase [PK (VTE5), EC 2.7.-.-]	At5g04490(304)	Chloroplast	U583081	Chloroplast	SL2.31sc03771	C2_At5g58240	9 (50.5 cM)
Anthrnilate phosphoribosyltransferase (APT, EC 2.4.2.18)	At5g17990(444)	Chloroplast	U566340	Chloroplast	SL2.31sc05054	C2_At5g17990	6 (59 cM)
Phosphoribosylanthranilate isomerase (PRAI, EC 5.3.1.24)	At1g07780 (275) At1g29410 (244) At5g05590 (275)	Chloroplast Chloroplast (Zhao and Last, 1995) Chloroplast	U564371	Chloroplast	SL2.31sc05732	cLET-1-I13	6 (24 cM)

Table 1. Continued

Enzyme ^a	<i>A. thaliana</i> locus (no. amino acids)	Curated localization ^b	Tomato unigene ^c	Signal peptide ^d	Genomic id ^e	Linked marker ^f	Chromosome position ^g (cM)
Folypolyglutamate synthase (FPGS, EC 6.3.2.17)	At5g41480(530)	Mitochondria (Ravanel et al., 2001)	U581922 ^h	Mitochondria	SL2.31sc05732	At5g41480	6 (26 cM)
Phospholipid transporter SEC14	At3g51670(409)	Membrane (Peterman et al., 2004)	U583419	Chloroplast	SL2.31sc03771	T1095	9 (50.5 cM)
Chlorophyllase (CHL, EC 3.1.1.14)	At5g43860 (318) At1g19670 (324)	Cytosol (Schenk et al., 2007)	U574853	nd	SL2.31sc05732	T0834	6 (32 cM)
Lycopeno β-cyclase LYCB	At3g10230(369)	Chloroplast(Ferro et al., 2010)	U570109	Chloroplast	SL2.31sc05054	cLET-19-J2	6 (74 cM)

^a Enzyme name, number according to KEGG (www.genome.jp/kegg/) and abbreviation.
^b *A. thaliana* enzyme localization according to The Plant Proteome Database (pdb.tc.cornell.edu, Sun et al., 2009) or specific reference.
^c Tomato unigene number according to SGN (solgenomics.net).
^d Sub-cellular localization prediction according to TargetP 1.1 software (www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/) (Emanuelsson et al., 2007) and ChloroP (www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/).
^e *S. lycopersicum* scaffold spanning the corresponding gene (version 2.31).
^f Closest markers within scaffold.
^g Chromosome and genetic position in Tomato-EXPEN 2000 v52.
^h 5' incomplete unigene
Nd, not determined

cycles of 94 °C for 15 s; primer-specific annealing temperature for 30 s; and then 68 °C for 2 min. Amplification products were purified with GFX purification Kit (Amersham Biosciences, #289034-70) and cloned into a pCR-Blunt II TOPO vector using a TOPO-Zero Blunt cloning kit (Invitrogen, #45-0245). Plasmid DNA was isolated using a Qiagen Miniprep Kit (#27106) and inserts were sequenced with BigDye Terminator (Applied Biosystems, #4336919) on an ABI3700 automated sequencer (Applied Biosystems). Sequence data from this article have been deposited in the GenBank Data Libraries under accession number HQ014366–HQ014383 and HQ219713–HQ219716. Polymorphisms were detected at nucleotide and amino acid levels by aligning *S. pennellii* and *S. lycopersicum* sequenced alleles (excluding primer regions) using the MULTALIN program (<http://www-archbac.u-psud.fr/genomics/multalin.html>; Corpet, 1988).

Evolutionary analyses

The coding region alignments of *A. thaliana*, *S. lycopersicum*, and *S. pennellii* were performed with BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) using the ClustalW package (v1.81 Thompson et al., 1994) and were manually curated according to amino acid alignment. Non-synonymous (d_N) and synonymous (d_S) distances and their SE values were estimated with MEGA 4.1 software (Tamura et al., 2007) using the Nei–Gojobori method (p-distance). In order to preserve the reading frames, the alignment gaps were deleted prior to estimation of d_S and d_N . Codon bias was determined by the effective number of codons (N_c) value computed in the CodonW program (mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=codonw). N_c varies between 21 for maximum codon bias, when only one codon is used per amino acid, and 61 for minimum codon bias, when synonymous codons for each amino acid are used at similar frequencies. One-way ANOVA with Tukey’s *post-hoc* test in the InfoStat software was performed to evaluate significant differences in codon usage.

In order to compare codon evolution models to determine selective constraint, three models were fitted using the CODEML program of the PAML suite (Yang, 2007). The first model, M0, assumes that all codons across the sequences have the same level of d_N and d_S and estimates these values and the d_N/d_S ratio (ω). ω is a signal of the selection at protein level thus, $0 < \omega < 1$ indicates purifying selection, $\omega = 1$ neutral selection, and $\omega > 1$ points to the presence of positive selection. The model M1a proposes the existence of two classes of codon, a proportion with $0 < \omega < 1$ and the remainder of codons with $\omega = 1$. Finally, model M2a divides codons into three classes: those with $0 < \omega < 1$, $\omega = 1$, and $\omega \geq 1$. The fit of model M0 versus M1a or M1a versus M2a is evaluated by a likelihood ratio test comparing twice the difference in log likelihoods with a χ^2 distribution (Yang, 2007).

Results

Identification, mapping, and expression analyses of tomato genes involved in VTE biosynthesis

VTE compounds, tocopherols, and tocotrienols, are products of the convergence of the plastidial MEP and SK pathways. With the aim of identifying every metabolic step in tocochromanol biosynthesis in tomato, the two routes from their primary metabolism precursors were linked to the VTE core pathway (Fig. 1) based on data available in the KEGG database. After an in-depth search of the unigene database deposited in the Solanaceae Genomics Network (<http://solgenomics.net>), using *Arabidopsis* loci as reference sequences, all the putative tomato enzyme encoding genes were identified (Table 1). Twenty-nine biochemical reactions constitute the

Fig. 1. VTE biosynthesis pathway. The MEP, SK, and tocopherol core pathways are highlighted in red, green, and blue, respectively. Candidate genes of the VTE-related pathways (carotenoid, chlorophyll, tryptophan and folate metabolism, and the SEC14 protein) are not highlighted. Enzymes are named according to their abbreviations in Table 1. Genes for which wild alleles were cloned, sequenced, and analysed are underlined.

VTE biosynthesis pathway and these are catalyzed by 28 enzymes, for which a total of 41 different tomato encoding loci were described. For eleven of the enzymes, the number of surveyed tomato genes differs from those described for *Arabidopsis*, according to the criteria adopted here. Only one point in the pathway shown in Fig. 1 remains obscure in plant metabolism, which is the phosphorylation of phytol P to provide phytol 2P from phytol via VTE5, as an alternative to the MEP pathway (Valentin *et al.*, 2006).

The subcellular localization of the protein products of previously identified *S. lycopersicum* loci were predicted by the TargetP and ChloroP softwares. Enzymes that did not contain a predicted targeting peptide were considered cytosolic. This *in silico* prediction was in general agreement with the experimental evidence reported for the *Arabidopsis* orthologues (Table 1). For two proteins, however, predictions revealed unexpected results. The tomato geranyl pyrophosphate synthase (GPPS) enzyme was predicted to be targeted to the mitochondria, while for the bi-functional

shikimate dehydrogenase/3-dehydroquinate dehydratase (SDH/DHQ) no signal peptides were detected for any of the identified loci. Moreover, none of the tomato CMs presented a predicted plastid signal peptide. The fact that the last enzyme of the post-chorismate portion of the SK pathway, tyrosine aminotransferase (TAT), and HPPD appeared to be localized in the cytosol in *Arabidopsis* cells provides intrigue regarding the transport of homogentisate across the chloroplast envelope (Joyard *et al.*, 2009). These predictions, with regard to the tomato proteins, also failed to propose a subcellular localization for TAT, even though one of the HPPD unigenes exhibited a chloroplast signal peptide prediction.

As a second step in the characterization of the genetic basis of tocopherol biosynthesis, the 41 tomato loci involved in MEP, SK, and VTE core pathways were localized onto the tomato genetic map (Tomato-EXPEN 2000) (Figs 1, 2, Table 1). Mapping was based on physical linkage between mapped markers and the unigenes and/or

Fig. 2. Genomic localization of tocopherol biosynthesis and candidate genes. All genes were localized in the Tomato-EXPEN 2000 genetic map available at the Solanaceae Genomics Network (<http://solgenomics.net/index.pl>). Markers and genes are indicated on the left side of the chromosomes. Tocopherol QTL are indicated on the right side of the chromosomes. Gene colour code is in accordance with Fig. 1.

their corresponding genomic sequences. With the exception of chromosome 12, all other tomato chromosomes harbour at least one of the identified loci. Interestingly, most of the tocopherol core pathway enzyme-encoding loci were localized on chromosomes 7, 8, and 9, except for *hst* and *vte3(2)*, mapping to chromosome 3, and *hpd(2)*, mapping to chromosome 5. Remarkably, the four genes mapped on chromosome 9, *vte3(1)*, *vte5*, arogenate dehydrogenase [*tyra(2)*], and geranylgeranyl pyrophosphate synthase [*ggps(4)*] all co-localize with a previously reported QTL for α -tocopherol content described by Schauer et al. (2006).

Of the 41 identified genes, the expression patterns of 27 of them could be evaluated across fruit development and ripening, by retrieving data from a previously published microarray experiment (Carrari et al., 2006). This analysis revealed that all 27 genes were expressed in tomato fruits in at least one time point. The *omeSOM model of neural clustering recently developed (Milone et al., 2010) revealed six groups. Whilst these clusters grouped genes from all three evaluated pathways, no specific pathway patterns were identified (data not shown).

QTL for fruit tocopherol content and identification of candidate genes

As mentioned above, these mapping results revealed that the majority of the VTE core pathway enzyme-encoding genes are grouped within chromosomes 7, 8, and 9. Previously,

using GC-MS analysis, Schauer et al. (2006) reported two QTL for fruit α -tocopherol content localized to chromosomes 6 and 9. In order to investigate further the presence of other QTL associated with the genomic regions that harbour the tocopherol core biosynthesis genes, and as such to obtain a precise and detailed quantification, an HPLC protocol for measuring all four tocopherol isoforms was applied.

The content of α -, β -, γ -, δ -, and total tocopherol was determined from ripe tomato fruits from the ILs 6-1, 6-2, 7-4, 7-4-1, 7-5, 8-2, 8-2-1, 9-1, 9-2-6 as well as fruits from the corresponding *S. lycopersicum* control (cv M82). The amount of each isoform and their ratios are presented in Fig. 3, whereas the identified QTL are positioned on the genetic map presented in Fig. 2. On chromosome 9, two QTL were identified for α - and total tocopherol (ILs 9-1 and 9-2-6), one for β -tocopherol (IL 9-1), and one for γ -tocopherol (IL 9-1). Both QTL for total tocopherol are in agreement with the results reported in Schauer et al. (2006). The QTL on IL 9-2-6 co-localize with two VTE core pathway encoding genes: *vte3(1)* and *vte5* (Fig. 2), whilst the QTL on IL 9-1 spans the genomic region containing *tyra(2)* and *ggps(4)*. Measurements performed in fruits from ILs with *S. pennellii* introgressions on chromosome 6 showed significant differences from M82 fruits in the levels of β -tocopherol (IL 6-2), δ -, and total tocopherol (IL 6-1). Moreover, QTL were also identified on chromosome 7 (ILs 7-4 and 7-4-1 for α - and β -tocopherol, respectively) and 8 (IL 8-2-1 for total tocopherol) also co-localizing with the genes encoding the VTE core pathway enzymes: *vte2* and

hppd(1) on chromosome 7 and *vte1* and *vte4* on chromosome 8 (Fig. 2). Besides the mentioned genes, the presence of *tyra(1)* at 0.4 cM and *tat(2)* at 43 cM on chromosome 7 could also be responsible for the α - and β -tocopherol QTL mapped onto these regions.

By surveying the genomic regions spanning the identified QTL, six novel candidate genes belonging to VTE-related pathways were found. On chromosome 6, at 32 cM, a chlorophyllase encoding gene (CHL, EC 3.1.1.14) was identified. It has been proposed that the first step in the degradation of chlorophyll during senescence and fruit ripening is catalysed by this enzyme (Hörtensteiner, 2006) through the synthesis of phytol, providing phytyl 2P to the VTE pathway via VTE5. Moreover, three enzyme-encoding genes for the two branching pathways from chorismate to tryptophan and folate were also identified: a phosphoribosylanthranilate isomerase (PRAI, EC 5.3.1.24), a folylpolyglutamate synthase (FPGS, EC 6.3.2.17), and an anthranilate phosphoribosyltransferase (APT, EC 2.4.2.18) mapping at 24, 26, and 59 cM, respectively. Finally, the lycopene β -cyclase (LYCB) encoding gene was found at 74 cM of chromosome 6. This enzyme, which catalyses the last step in β -carotene biosynthesis, has been deeply characterized after a positional cloning strategy by Ronen *et al.* (2000) and constitutes a strong candidate for tocopherol content due to the common precursor geranylgeranyl 2P. Another putative candidate, the SEC14 protein-encoding gene, was found on chromosome 9. Several studies have demonstrated the involvement of this protein in tocopherol transport in mammalian cells and lipid traffic in plants (Saito *et al.*, 2007; Bankaitis *et al.*, 2009). With the exception of the *chl* these novel candidates are expressed in tomato fruits at least one time point of the developmental analysis performed by Carrari *et al.* (2006).

Taken together the results obtained from tomato gene identification, mapping, tocopherol quantification, and QTL localization, 16 candidate loci putatively affecting tocopherol content in tomato can be proposed: *prai*, *fpgs*, *chl*, *apt*, and *lycb* on chromosome 6; *tyra(1)*, *vte2*, *hppd(1)*, and *tat(2)* located on chromosome 7; *vte1* and *vte4* on chromosome 8; and *ggps(4)*, *tyra(2)*, *vte5*, *sec14*, and *vte3(1)* on chromosome 9 (Figs 1–3).

Allele characterization of QTL-associated candidates

The identification of 16 QTL-associated candidate genes prompted us to unearth the allelic differences between *S. lycopersicum* and *S. pennellii* (underlined genes in Fig. 1). The coding regions of wild alleles were thus subsequently cloned from the corresponding ILs using primers annealing to the initial and stop codons. Although only minor size differences were observed between the two alleles for most of the genes, TyrA(2)-, VTE4-, PRAI-, and CHL-encoding genes exhibited different amplicon length. These results indicated that neither vast allelic polymorphisms, nor large genomic rearrangements, span the chromosomal region encompassing the analysed genes. This comparison revealed

Fig. 3. Tocopherol content. Tocopherol content was determined by HPLC. Grey bars indicate means of six biological replicates. Significant differences compared with the M82 control cultivar (black bars) according to Dunnett test ($P < 0.05$) and/or Kruskal–Wallis test ($P < 0.05$ ** and $P < 0.1$ *) are indicated.

that all analysed candidate genes present at least one non-synonymous polymorphism (Table 2). The most divergent alleles are those encoding the PRAI enzyme for which the *S. pennellii* allele encodes a protein 26 amino acids shorter in comparison with the *S. lycopersicum* allele.

VTE biosynthesis genes: evolutionary analyses of cultivated and wild tomato alleles

The fate of cellular metabolic networks generally depends on the products of many loci. The inter-relationships between loci at the phenotypic level raise the question of whether they evolved independently. In this work QTL for tocopherol content using *S. pennellii* ILs were mapped, and 16 candidate loci linked to those QTL were identified and the wild species alleles cloned. Furthermore, in order to study how the structure of the VTE metabolic pathway could have influenced protein evolution rates, the evolutionary pattern among the candidate genes and their

Table 2. Comparison of *S. lycopersicum* and *S. pennellii* alleles of cDNA encoding VTE candidate genes. LYC, *S. lycopersicum*; PEN, *S. pennellii*.

Gene	Unigene	Coding sequence (nt)		Predicted protein (no. amino acids)		No. of polymorphic nucleotides ^a	No. of polymorphic amino acids ^a
		LYC	PEN	LYC	PEN		
<i>ggps</i> (4)	U575882	1005	1005	334	334	11	3
<i>tat</i> (2)	U563404	1269	1269	422	422	10	6
<i>tyra</i> (1)	U567861	1134	1134	377	377	7	1
<i>tyra</i> (2)	U570951	1173	1182	390	393	24+9insertions	9+3insertions
<i>vte4</i>	U584511	1089	1086	362	361	9+3deletions	2+1 deletion
<i>vte1</i>	U570602	1497	1497	498	498	12	5
<i>vte3</i> (1)	U578249	1020	1020	339	339	7	1
<i>vte2</i>	U327540 (covers 5' end)	1209	1209	402	402	8	3
	U576207 (covers 3' end)						
<i>vte5</i>	U583081	882	882	293	293	10	4
<i>hppd</i> (1)	U580457	1263	1263 ^b	420	420 ^b	16	7
<i>apt</i>	U566340 ^c	1097 ^c	1097 ^c	365	365	8	4
<i>prai</i>	U564371	906	828	301	275	12+78deletions	3+26deletions
<i>fpgs</i>	U581922 ^c	1457 ^c	1457 ^c	485	485	13	4
<i>chl</i>	U574853	939	948	312	315	22+9insertions	9+3insertions
<i>sec14</i>	U583419	1275	1275	424	424	11	4
<i>lycb</i>	U570109	1497	1497	498	498	19	9

^a Nucleotide or amino acid insertions or deletions in *S. pennellii* sequences.^b *S. pennellii* does not present a stop codon along the analysed region.^c Probably lacking 3' end.

paralogues was also investigated, estimating the pairwise synonymous (d_S), non-synonymous (d_N), and d_N/d_S divergence between *S. lycopersicum* and *S. pennellii* (Fig. 4). The d_S and d_N values varied greatly between genes, ranging from 4.8 to 16 times for d_S and d_N , respectively. Four genes, *ggps*(2), *tyra*(2), *chl*, and *lycb*, displayed particularly high values of d_N , above the mean. The d_N/d_S also varied remarkably among the 22 loci analysed with the highest value being 17.4 times the lowest. The genes of MEP, post-chorismate SK, and tocopherol biosynthesis core pathways displayed values similar to or lower than the average with the exception of those presenting more than one locus. Among candidate genes of related pathways *apt*, *chl*, and *lycb* displayed higher d_N/d_S values than the mean. Interestingly, the five genes for which more than one locus was identified displayed variations of d_N/d_S values between paralogues. The d_N/d_S values for the different *ggps*, *tat*, *tyra*, *vte3* and *hppd* varied by 3.5, 2.1, 7.6, 3.4, and 1.9 times, respectively. Differences in d_N/d_S values between the paralogues might be due to high d_N caused by a weak selection at non-synonymous sites, or related to the intensity of natural selection on synonymous codon usage. To investigate the existence of codon usage bias, the effective number of codons (N_c) was calculated for each gene and species (*S. pennellii* and *S. lycopersicum*). No statistically significant differences (ANOVA, $P>0.01$) in N_c were observed between *ggps*, *tat*, *tyra*, and *vte3* paralogues, suggesting that the d_N/d_S differences are most

probably due to a constraint relaxation for one of the gene copies rather than codon bias. In contrast, for the *hppd* pair a significant N_c bias was observed (ANOVA, $P<0.01$). This can be also visualized in Fig. 4 comparing d_N and d_S values, suggesting that the d_N/d_S rate differences between *hppd* paralogues might not be explained by constraint relaxation.

Although d_N/d_S is a useful indicator of selective pressure, there is some oversimplification in its application since it may be that only certain codons in a gene can change in a way that enhances fitness whereas all others cannot accept substitutions without cost to fitness. Thus, to better explore patterns of sequence variation, the orthologous sequences from *A. thaliana*, *S. lycopersicum*, and *S. pennellii* for all 22 genes under study were aligned and a Likelihood Ratio Test (LRT) with three models of molecular evolution was applied. The first, M0, assumes that all positions across the sequences have the same level of d_N and d_S . The second, M1a, proposes that a proportion of codons is under purifying selection while the remainder have neutral evolution. Finally, M2a divides codons into three classes, those with purifying selection, those with neutral evolution pattern, and the remainder with positive selection. In order to avoid data misinterpretation, the N_c was estimated and the comparison between species did not show statistically significant differences ($P>0.01$), indicating that there is no codon bias usage. Comparison of the three models showed that for 19 genes M1a displayed the best fit, indicating that,

Fig. 4. Evolutionary rates at synonymous (dS) and non-synonymous (dN) sites of candidate genes linked to tocopherol QTL. Genes belonging to MEP, SK, and tocopherol core pathways are highlighted in red, green, and blue, respectively. VTE-related pathway candidates are not highlighted. Lines indicated estimated means.

even when a proportion of the codons for every gene are evolving neutrally, there is no support for positive selection. Nevertheless, for *ggps(2)*, *ggps(4)*, and *vte1*, M2a presented a better fit than M1a, with different levels of significance, showing that these genes exhibited signs of positive selection. Interestingly, while *ggps(2)* and *vte1* showed a higher proportion of codons evolving under positive selection (~25%) than *ggps(4)* (0.8%), they displayed lower significance levels. This can be explained by the high ω value of *ggps(4)* indicating that there is no variation in the synonymous sites along the codons under positive natural selection (Table 3).

Discussion

The two pathways feeding the main precursors of VTE biosynthesis, MEP and SK, as well as the tocopherol core route, were surveyed across the tomato genome with the aim of identifying regulatory steps of the VTE fruit biosynthesis. The metabolic reconstruction of VTE metabolism resulted in the identification of 29 reactions catalysed by the protein products of 28 genes, for which 41 different *S. lycopersicum* loci were identified (Fig. 1, Table 1). In the course of reconstructing these routes, certain assumptions concerning the presence or absence of reactions involved in VTE metabolism had to be made. First, in the MEP pathway, GPPS is the enzyme leading to monoterpene biosynthesis, while GGPS is responsible for the production of geranylgeranyl 2P by the sequential coupling of three isopentenyl 2P (IPP) molecules to dimethylallyl 2P

(DMAPP). Geranylgeranyl 2P serves as a precursor for carotenoid, tocochromanol, gibberelin, and chlorophyll biosynthesis (Aharoni *et al.*, 2005; Joyard *et al.*, 2009). Hence, the classical trend is to assume that GPPS would not be involved in tocochromanol production. Tomato plants silenced for GPPS even displayed a dwarfed phenotype and reduced gibberellin levels, and did not alter carotenoid and chlorophyll content (Van Schie *et al.*, 2007). These results thus indicated that pigments are originated from a geranyl 2P-independent geranylgeranyl 2P pool and suggested that GPPS might not influence VTE biosynthesis. However, further functional experiments that validate this hypothesis are clearly needed. Secondly, HGGT, which condenses homogentisate with geranylgeranyl 2P during tocotrienol synthesis, was identified in grass species in which tocotrienols are the most abundant tocochromanol forms (Cahoon *et al.*, 2003). Neither in *Arabidopsis* nor in tomato was HGGT identified. However, tocotrienol traces have been detected in both tomato and tobacco (Chun *et al.*, 2006). This might be explained by the promiscuous activity in substrate acceptance of other prenyl transferases such as homogentisate solanesyl transferase (HST) and/or the homogentisate phytyl transferase (VTE2). Flux changes through the SK, MEP, and/or tocopherol pathway could conceivably shift the substrate preference of both these enzymes (Herbers, 2003; Falk and Munné-Bosch, 2010). This hypothesis is supported by the fact that under certain conditions tobacco plants, which do not have a canonical HGGT, and co-express the *Arabidopsis* HPPD and the yeast prephenate dehydrogenase, exhibit higher levels of tocotrienols (Rippert *et al.*, 2004). Therefore, the

Table 3. Parameter estimates and tests of selection.

Gene	M0 lnL ^a	ω^b	M1a lnL ^a	ω^c	ρ_0^d, e	M2a lnL ^a	ω^f	ρ_0^g	ω^h	ρ_2^i, j
<i>ggps(1)</i>	-2640.1	0.041	-2598.9	0.015	0.734**	-2598.9	0.012	0.743	–	0.000
<i>ggps(2)</i>	-2594.4	0.096	-2551.5	0.028	0.730**	-2549.9	0.032	0.746	2.474	0.254*
<i>ggps(3)</i>	-2444.5	0.014	-2411.5	0.018	0.812**	-2411.5	0.018	0.813	1.134	0.187
<i>ggps(4)</i>	-2233.7	0.061	-2200.8	0.019	0.811**	-2196.7	0.020	0.811	999.000	0.008**
<i>tat(1)</i>	-2718.5	0.101	-2690.3	0.045	0.792**	-2690.3	0.045	0.792	–	0.000
<i>tat(2)</i>	-2857.8	0.077	-2841.7	0.046	0.817**	-2841.7	0.046	0.817	–	0.000
<i>tyra(1)</i>	-2487.3	0.002	-2460.9	0.024	0.741**	-2460.9	0.024	0.741	–	0.000
<i>tyra(2)</i>	-2657.4	0.108	-2615.1	0.024	0.612**	-2615.1	0.024	0.612	–	0.000
<i>vte4</i>	-2425.8	0.063	-2391.8	0.028	0.765**	-2391.8	0.028	0.765	–	0.000
<i>vte1</i>	-3430.5	0.075	-3373.5	0.029	0.730**	-3371.9	0.039	0.743	2.165	0.257*
<i>vte3(1)</i>	-2138.5	0.051	-2124.3	0.031	0.900**	-2124.3	0.031	0.900	–	0.000
<i>vte3(2)</i>	-2256.5	0.057	-2231.6	0.022	0.842**	-2231.6	0.022	0.842	–	0.000
<i>vte2</i>	-2693.8	0.096	-2653.3	0.030	0.739**	-2653.3	0.030	0.739	–	0.000
<i>vte5</i>	-2302.1	0.079	-2287.6	0.023	0.541**	-2287.6	0.023	0.541	–	0.000
<i>hppd(1)</i>	-2586.5	0.064	-2552.8	0.024	0.818**	-2552.8	0.024	0.820	2.258	0.016
<i>hppd(2)</i>	-2617.9	0.037	-2579.5	0.020	0.805**	-2579.5	0.020	0.805	–	0.000
<i>apt</i>	-2447.7	0.099	-2400.6	0.024	0.771**	-2399.3	0.033	0.799	2.629	0.201
<i>prai</i>	-1556.9	0.144	-1551.3	0.104	0.732**	-1551.9	0.104	0.732	–	0.000
<i>fpgs</i>	-3435.8	0.100	-3410.5	0.055	0.742**	-3410.5	0.055	0.742	–	0.000
<i>chl</i>	-2198.3	0.127	-2186.0	0.078	0.846**	-2185.9	0.080	0.853	1.124	0.146
<i>sec14</i>	-2547.0	0.030	-2527.3	0.025	0.894**	-2527.2	0.025	0.894	–	0.000
<i>lycb</i>	-2628.0	0.084	-2608.2	0.046	0.772**	-2608.2	0.046	0.772	–	0.000

^a Log likelihood of model.^b Parameter estimate assuming a single d_N/d_S ratio per gene.^c Estimated d_N/d_S for proportion of codons (ρ_0) under purifying selection; the rest of codons assumed to be evolving neutrally.^d Estimated proportion of codons under purifying selection.^e Test of M1a versus M0. ** χ^2 test using $P < 0.01$.^f Estimated d_N/d_S for proportion of codons (ρ_0) under purifying selection.^g Estimated proportion of codons under purifying selection.^h Estimated d_N/d_S for proportion of codons (ρ_2) under positive selection.ⁱ Estimated proportion of codons under positive selection.^j Test of M2a versus M1a. * χ^2 test using $P < 0.10$; ** χ^2 test using $P < 0.01$.

–, not available.

enhanced supply of homogentisate may affect the substrate specificity of prenyl transferases leaking through tocotrienol synthesis (Falk and Munné-Bosch, 2010). In addition, *A. thaliana* HST, which is essential for plastoquinone-9 biosynthesis—catalysing the condensation of solanesyl 2P (SDP) and HGA—also accepts farnesyl 2P and geranylgeranyl 2P as prenyl donors (Sadre *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2007), providing further evidence in support of tocotrienol production in the absence of a specific HGGT.

Prephenate aminotransferase (PAT, EC 2.6.1.57), which converts prephenate intermediate into aroenate, has been characterized in bacteria. Although its activity had also been detected in plants, no associated loci were identified with this enzymatic function (Tzin *et al.*, 2009). Recently, two independent reports performed biochemical and functional characterization of this plant enzyme thus, completing the identification of the genes involved in phenylalanine and tyrosine biosynthesis (Graindorge *et al.*, 2010; Maeda *et al.*, 2010).

One missing links still remains within the metabolic network under study, which is the absence of a phytol-P kinase that could provide phytol 2P as an alternative to the MEP pathway (Ischebeck *et al.*, 2006; Valentin *et al.*, 2006).

All the MEP enzyme-encoding genes surveyed here are in accordance with sequences previously reported for tomato (Lois *et al.*, 2000; Rohdich *et al.*, 2000; Rodríguez-Concepción *et al.*, 2001, 2003; Botella-Pavía *et al.*, 2004; Ament *et al.*, 2006; Paetzold *et al.*, 2010; and GenBank database direct submission for IPI -GQ169536 and EU253957-), with the exception of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidylyltransferase (CMS)- and geranylgeranyl reductase (GGDR)-encoding genes, which have not been reported before in this species. Moreover, two additional loci for GGPS were identified here. For the SK pathway, enzyme-encoding genes involved in reactions upstream of the prephenate intermediate have already been reported in tomato (Gasser *et al.*, 1988; Schmid *et al.*, 1992; Görlach *et al.*, 1993, 1995; Eberhard *et al.*, 1996; Bischoff *et al.*, 1996, 2001). Moreover, novel loci for SDH/DHQ and CM were identified, whilst the loci encoding PAT, TyrA, and TAT were first described in tomato.

Protein localization data are highly valuable information in order to elucidate gene function. The MEP and SK pathways are well accepted to operate in the chloroplast (Rippert *et al.*, 2009). Even so, the recent identification of

some cytosolic isoforms points to the existence of an extraplastidial SK pathway (Ding *et al.*, 2007). The results presented here for the *in silico* prediction of the subcellular localization of the tomato deduced protein sequences indicated that the reactions of VTE metabolism occur mostly in chloroplasts. In contrast, for the bi-functional SDH/DHQ no signal peptide was detected, most probably due to the failure to detect true targeting, since reported analysis of subcellular fractions indicated that tomato SDH/DHQ is localized in the chloroplast (Bischoff *et al.*, 2001). However, Ding *et al.* (2007) functionally characterized a cytosolic SDH/DHQ isoform in tobacco and identified the tomato orthologue (BF096277/SGN-U578253). This locus was not included in this study due to its low identity to *Arabidopsis* protein according to the Pipeline criteria adopted and the absence of functional support so far. Unsuccessful subcellular prediction is not an unusual scenario, since *in silico*, signal peptides are occasionally misidentified. However, these predictions indicated mitochondrial targeting for the *A. thaliana* GPPS (data not shown), whilst experimental data revealed that this enzyme is directed to the plastid (Bouvier *et al.*, 2000). It is important to point out the existence of some ambiguous reports on actual GPPS localization where experimental evidence supports its localization either in plastid or in the cytosol depending on the species (Nagegowda, 2010). Moreover, for the TAT and CM enzymes, the plastidial localization could not be confirmed by *in silico* analysis in agreement with the undetermined subcellular occurrence of the post-chorismate portion of the SK pathway.

Following the identification of the tomato genes encoding all enzymes for the tocopherol synthesis pathway, the 41 loci were further mapped. Furthermore, a detailed profile for all tocopherol isoforms was performed in fruits from ILs harbouring introgressed regions spanning the VTE biosynthesis core pathway genes (ILs 7-4, 7-4-1, 8-2, 8-2-1, 9-1, and 9-2-6) along with those in chromosome 6 (ILs 6-1 and 6-2) for which α -tocopherol QTL have been previously reported (Schauer *et al.*, 2006). Although VTE content has been demonstrated to be a highly environmentally affected trait (Schauer *et al.*, 2008), the results reported here indicate that at least those QTL mapped on chromosomes 6 and 9 show a relatively high heritability level as they are in accordance with previous experiments reported by Schauer *et al.* (2006). Moreover it is worth noting that, as opposed to the previous study, which was carried out on field-grown plants, the data reported here were obtained from greenhouse plants.

Integrated analysis at metabolic, genomic, and genetic levels allowed us to propose 16 candidate loci putatively affecting tocopherol content in tomato: *prai*, *fpgs*, *chl*, *apt*, and *lycb* on chromosome 6; *tyra(1)*, *vte2*, *hppd(1)*, and *tat(2)* located on chromosome 7; *vte1* and *vte4* on chromosome 8; and *ggps(4)*, *tyra(2)*, *vte5*, *sec14*, and *vte3(1)* on chromosome 9. In plants, several QTL controlling tocopherol content have been identified in soybean, maize, oilseed rape, and *Arabidopsis*. As revealed in this report, only some of those QTL localized to areas of the genome where tocopherol core pathway genes occur

(Marwede *et al.*, 2005; Gilliland *et al.*, 2006; Chander *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010).

Detailed analysis of the identified QTL together with the co-localizing genes raised interesting features concerning VTE content regulation. None of chromosome 6 QTL co-localize with any of the MEP, SK, or tocopherol core pathway genes, thus suggesting that tocopherol content variation observed in ILs 6-1 and 6-2 might be determined by the effect of genes belonging to VTE-related pathways. IL 6-1 showed elevated δ - and total tocopherol content in comparison with *S. lycopersicum* (M82) control. This line harbours the *S. pennellii* alleles of the *prai*, *fpgs*, and *chl* genes. The first two could be regulating hydroxyphenylpyruvate fluxes into the tocopherol pathway by the deviation of chorismate from tryptophan and folate biosynthetic routes. On the other point of the pathway drawn in Fig. 1, the hypothesis that chlorophyll degradation-derived phytol serves as an important intermediate for tocopherol synthesis has been demonstrated by characterization of the *Arabidopsis vte5* mutant (Valentin *et al.*, 2006). In this sense, the presence of *S. pennellii chl* allele in IL 6-1 might be raising the phytol 2P input into tocopherol synthesis. On the same chromosome, IL 6-2 displayed significantly higher levels of β -tocopherol than the control. This IL carries *S. pennellii* alleles of *chl*, *apt*, and *lycb*. Even when these genes are linked to intermediate metabolites of the tocopherol pathway (chorismate and geranylgeranyl 2P) no evident links can be specifically associated with the β -isoform. The candidature of genes not directly involved in the VTE structural pathway is supported by the regulatory network acting on branching points. The CM acting on the SK pathway is allosterically feedback-inhibited in plants by phenylalanine and tyrosine and induced by tryptophan (Tzin and Galili, 2010). Allelic variation in *prai* and *apt* could be modifying tryptophan synthesis, altering influx through the SK pathway and then, increasing homogentisate precursor, finally resulting in the tocopherol content variation observed in ILs 6-1 and 6-2.

Two QTL have been detected on chromosome 7; while IL 7-4 displayed lower levels of α -tocopherol, IL 7-4-1 showed reduced amounts of the β -isoform. The introgressed wild genome fragments in these ILs harbour *S. pennellii* alleles of *tyra(1)*, *vte2*, and *hppd(1)*. IL 7-4 also spans the wild allele of *tat(2)*. These four candidates can alter total precursor influx to tocopherol biosynthesis. Nevertheless, the way that these genes could differentially modify the amounts of tocopherol isoforms is currently unclear.

On chromosome 8, the IL 8-2 displayed a significantly lower α/γ -tocopherol ratio when compared with control (Fig. 3). Interestingly, this IL bears *S. pennellii* alleles of *vte1* and *vte4* genes whose protein product activities synthesize these two tocopherol isoforms. Therefore, the low α/γ -tocopherol ratio could be caused by lower VTE1 and/or higher VTE4 activity of wild alleles. Intriguingly, IL 8-2-1 also harbours the wild alleles of *vte1* and *vte4*. Even though no significant alteration in α/γ -tocopherol ratio was observed, a significant increase in total tocopherol was detected in the fruits.

IL 9-1 exhibits increased levels of α -, β -, and total tocopherol most probably due to differential activity levels of the enzymes encoded by the *S. pennellii* allele of the *tyra(2)* and *ggps(4)* loci that could lead to higher input of hydroxyphenylpyruvate and phytyl 2P to the tocopherol core pathway. Elevated α/γ and β/γ ratios support this hypothesis (Fig. 3). Interesting to note is the fact that *tyra(2)* shows one of the highest d_N values, indicating protein divergences between *S. pennellii* and *S. lycopersicum* (Fig. 4). In this sense, the results presented here reinforce the hypothesis of Rippert *et al.* (2004) that hydroxyphenylpyruvate is a key step in the accumulation of VTE in plants. IL 9-2-6 exhibits increased levels of α - and total tocopherol and harbours the *S. pennellii* allele of the *vte5* gene, which could improve the input of phytyl 2P via the phytol alternative pathway (Valentin *et al.*, 2006). However, levels of β -tocopherol are not increased in IL 9-2-6, which could be explained by the more efficient activity of the *S. pennellii* *vte3* allele. This is also reflected in the significant differences found in the α/β ratio (Fig. 3).

Although there is a reliable link between the identified candidate genes and fruit tocopherol content, the effect of unidentified loci within the QTL cannot be discarded and, due to the considerable size of the *S. pennellii* fragments in the ILs, the differences observed in tocopherol accumulation could also be caused by undetected genes located within them.

Candidate gene approach has proved to be extremely powerful for studying the genetic architecture of complex traits (Zhu and Zao, 2007). By revealing the pattern of molecular genetic variation, the evolutionary analyses offer complementary data for strengthening gene candidature (Moyle and Muir, 2010). In this sense, the pattern of selection of different genes within a metabolic pathway allows the determination of whether they are subject to equivalent evolutionary forces underlying trait phenotypic variation. Comparing *S. lycopersicum* and *S. pennellii* alleles, out of the 22 genes studied, those encoding MEP, post-chorismate SK, and VTE core pathway enzymes presented d_N/d_S ratios below the mean, excluding those with more than one loci. In contrast, out of the six analysed candidate genes of related pathways, *apt*, *chl*, and *lycb* displayed d_N/d_S ratios values above the mean (Fig. 4). This constraint relaxation cannot be related to a higher region-specific mutation rate on chromosome 6 because two other genes mapped also on chromosome 6, *prai* and *fpgs*, presented low d_N/d_S ratios. Therefore, these results suggest a strong purifying selection for tocopherol central biosynthesis genes while there is a more relaxed constraint for those genes of related pathways. When the selection constraint is evaluated codon by codon applying a likelihood ratio test, new insights about the evolutionary history of the genes are revealed. Nineteen genes exhibit purifying selection associated with neutral evolving codons (Table 3) in agreement with the d_N/d_S analysis and previous reports that concluded that significant heterogeneity of evolutionary rates in metabolic pathway genes is mainly ascribed to differential constraint relaxation rather than to positive

selection (Livingston and Anderson, 2009; Yang *et al.*, 2009). Even so, three loci exhibited patterns consistent with positive selection evolving codons. In tomato, loci showing positive selection have been identified associated with biotic and abiotic stresses (Jiménez-Gómez and Maloof, 2009). It would be unexpected to envisage signs of positive selection in loci of major biosynthetic pathways that feed multiple metabolic routes such as MEP and SK. However, the signs of diversifying selection found for *ggps(2)* and *ggps(4)* could be explained by the existence of two other paralogues evolving under a more conservative evolutionary pattern. In the case of *vte1*, the reduction in protein negative selective pressure might indicate that this is not a committed step in tocopherol production.

Studies of evolutionary rates of genes in the plant anthocyanin (Lu and Rausher, 2003) and carotenoid (Livingstone and Anderson, 2009) pathways have demonstrated that upstream genes in the pathway evolved more slowly than downstream genes. However, this seems not to be a constant trend. Downstream genes in the gibberellin pathway did not exhibit elevated substitution rates and instead, genes encoding either the branch point enzyme or those catalysing multiple steps in the pathway showed the lowest evolutionary rates due to strong purifying selection (Yang *et al.*, 2009). This observation is in close agreement with the theory of pathway fluxes, which indicates that natural selection would target enzymes controlling metabolic fluxes between converging pathways. Consequently, these branch points are usually targets of selection, experiencing higher evolutionary constraints (Flowers *et al.*, 2007). In this sense, the lowest value of d_N/d_S was observed for the *tyra(1)* gene whose protein product shares its substrate with phenylalanine/tyrosine biosynthesis resulting in branching points, whilst the *tyra(2)* paralogue displays a relaxed evolutionary constraint, indicative of a functional divergence.

Genes responsible for adaptive morphological and physiological differences between species carry signatures of positive selection (Aguileta *et al.*, 2010). In this sense, regarding the variation in VTE content observed in the *S. pennellii* introgressed lines in comparison with that of *S. lycopersicum*, the presence of neutral and/or positive evolving codons could result in novel protein features being a source of new functional profiles. Even when coding sequences are relevant to phenotype, they might not be the location at which key evolutionary changes occur. Analyses across coding sequences do not reveal allelic differences in regulatory sequences that could also be determining the observed phenotypic variations. In fact, a co-response analysis of 32 of the genes identified here revealed an intricate network suggesting these pathways to be finely regulated at the level of gene expression (data not shown).

This report describes a comprehensive survey of the genes encoding VTE biosynthesis pathway enzymes in tomato, and the methods adopted allowed the identification of novel tocopherol QTL. By an integrated analysis of the genome sequence data together with a well-characterized biosynthetic pathway, like that for VTE in *Arabidopsis* model

species, this genetic/genomic approach described loci and allelic variations that probably impact antioxidant content in tomato fruit. The identified candidate genes support cross-talk between the MEP, SK, and tocopherol core pathways through the control of VTE accumulation in tomato fruit. In addition, the VTE-related pathway genes might contribute to regulation of the supply of intermediates for plastid tocopherol biosynthesis. The data produced provide a platform for functional studies that will contribute to elucidation of the biosynthesis and catabolism of tocochromanols, and their role in plant physiology.

Supplementary data

Supplementary data are available at *JXB* online.

Supplementary Table S1 lists the gene primers used.

Acknowledgements

The authors thank Gregorio Ceccantini for assistance with statistical analyses. This work was partially supported by grants from FAPESP, CNPq, and USP (Brazil); Max Planck Society (Germany); INTA, CONICET, and ANP-CyT (Argentina); and under the auspices of the EU SOL Integrated Project FOOD-CT-2006-016214. J.A. was a recipient of a CAPES (Brazil). L.B., F.G., and N.S. were recipients of a FAPESP (Brazil) fellowships. L.Q. was a recipient of an ANPCyT (Argentina) fellowship. R.A. and F.C. are members of CONICET (Argentina). This work was carried out in compliance with current laws governing genetic experimentation in Brazil and in Argentina.

References

- Abushita AA, Hebshi EA, Daood HG, Biacs PA.** 1997. Determination of antioxidant vitamins in tomatoes. *Food Chemistry* **60**, 207–212.
- Aguileta G, Lengelle J, Marthey S, et al.** 2010. Finding candidate genes under positive selection in non-model species: examples of genes involved in host specialization in pathogens. *Molecular Ecology* **19**, 292–306.
- Aharoni A, Jongsma MA, Bouwmeester HJ.** 2005. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends in Plant Science* **10**, 594–602.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403–410.
- Ament K, Van Schie CC, Bouwmeester HJ, Haring MA, Schuurink RC.** 2006. Induction of a leaf specific geranylgeranyl pyrophosphate synthase and emission of (E, E)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene in tomato are dependent on both jasmonic acid and salicylic acid signaling pathways. *Planta* **224**, 1197–1208.
- Ayres M, Ayres Júnior M, Ayres DL, Santos AA.** 2007. Bioestat – aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. *Sociedade Civil Mamirauá/MCT CNPq, Belém, PA, Brasil*.
- Bankaitis VA, Mousley CJ, Schaaf G.** 2009. The Sec14 superfamily and mechanisms for crosstalk between lipid metabolism and lipid signaling. *Trends in Biochemical Sciences* **35**, 150–160.
- Bermúdez L, Urias U, Milstein D, Kamenetzky L, Asis R, Fernie AR, Van Sluys MA, Carrari F, Rossi M.** 2008. A candidate gene survey of quantitative trait loci affecting chemical composition in tomato fruit. *Journal of Experimental Botany* **59**, 2875–2890.
- Bischoff M, Rösler J, Raesecke HR, Görlach J, Amrhein N, Schmid J.** 1996. Cloning of a cDNA encoding 3-dehydroquinate synthase from a higher plant, and analysis of the organ-specific and elicitor-induced expression of the corresponding gene. *Plant Molecular Biology* **31**, 69–76.
- Bischoff M, Schaller A, Bieri F, Kessler F, Amrhein N, Schmid J.** 2001. Molecular characterization of tomato 3-dehydroquinate dehydratase-shikimate:NADP oxidoreductase. *Plant Physiology* **125**, 1891–1900.
- Botella-Pavía P, Besumbes O, Phillips MA, Carretero-Paulet L, Boronat A, Rodriguez-Concepcion M.** 2004. Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *The Plant Journal* **40**, 188–199.
- Bouvier F, Suire C, d'Harlingue A, Backhaus RA, Camara B.** 2000. Molecular cloning of geranyl diphosphate synthase and compartmentation of monoterpene synthesis in plant cells. *The Plant Journal* **24**, 241–252.
- Cahoon EB, Hall SE, Ripp KG, Ganzke TS, Hitz WD, Coughlan SJ.** 2003. Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nature Biotechnology* **21**, 1082–1087.
- Carrari F, Baxter C, Usadel B, et al.** 2006. Integrated analysis of metabolite and transcript levels reveals the metabolic shifts that underlie tomato fruit development and highlight regulatory aspects of metabolic network behaviour. *Plant Physiology* **142**, 1380–1396.
- Chander S, Guo YQ, Yang XH, Yan JB, Zhang YR, Song TM, Li JS.** 2008. Genetic dissection of tocopherol content and composition in maize grain using quantitative trait loci analysis and the candidate gene approach. *Molecular Breeding* **22**, 353–365.
- Chun J, Lee J, Ye L, Exler J, Eitenmiller RR.** 2006. Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. *Journal of Food Composition and Analysis* **19**, 196–204.
- Corpet, F.** 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* **16**, 10881–10890.
- Das S, Gautam N, Dey SK, Maiti T, Roy S.** 2009. Oxidative stress in the brain of nicotine-induced toxicity: protective role of *Andrographis paniculata* Nees and vitamin E. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* **34**, 124–135.
- Davuluri GR, van Tuinen A, Fraser PD, et al.** 2005. Fruit-specific RNAi-mediated suppression of DET1 enhances tomato nutritional quality. *Nature Biotechnology* **23**, 890–895.
- Ding L, Hofius D, Hajirezaei MR, Fernie AR, Börnke F, Sonnewald U.** 2007. Functional analysis of the essential bifunctional tobacco enzyme 3-dehydroquinate dehydratase/shikimate

dehydrogenase in transgenic tobacco plants. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2053–2067.

Eberhard J, Bischoff M, Raesecke HR, Amrhein N, Schmid J. 1996. Isolation of a cDNA from tomato coding for an unregulated, cytosolic chorismate mutase. *Plant Molecular Biology* **31**, 917–922.

Emanuelsson O, Brunak S, von Heijine G, Nielsen H. 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nature Protocols* **2**, 953–971.

Enfissi EM, Barneche F, Ahmed I, et al. 2010. Integrative transcript and metabolite analysis of nutritionally enhanced DE-ETIOLATED1 downregulated tomato fruit. *The Plant Cell* **22**, 1190–1215.

Entus R, Poling M, Herrmann KM. 2002. Redox regulation of *Arabidopsis* 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase. *Plant Physiology* **129**, 1866–1871.

Eshed Y, Zamir D. 1995. An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics* **141**, 1147–1162.

Falk J, Munné-Bosch S. 2010. Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. *Journal of Experimental Botany* **61**, 1549–1566.

Fei Z, Tang X, Alba R, Giovannoni J. 2006. Tomato Expression Database (TED): a suite of data presentation and analysis tools. *Nucleic Acids Research* **34**, D766–D770.

Fernie AR, Yaakov T, Zamir D. 2006. Natural genetic variation for improving crop quality. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 196–202.

Ferro M, Brugiare S, Salvi D, et al. 2010. AT_CHLORO: a comprehensive chloroplast proteome database with sub-plastidial localization and information for functional genomics using quantitative label-free analyses. *Molecular and Cellular Proteomics* **9**, 1063–1084.

Flowers JM, Sezgin E, Kumagai S, Duvernell DD, Matzkin LM, Schmidt, PS, Eanes WF. 2007. Adaptive evolution of metabolic pathways in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1347–1354.

Foyer CH, Noctor G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell* **17**, 1866–1875.

Fraser PD, Enfissi EM, Halket JH, Truesdale MR, Yu DM, Gerrish C, Bramley PM. 2007. Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: effects on isoprenoids, plastids and intermediary metabolism. *The Plant Cell* **19**, 3194–3211.

Fraser PD, Pinto ME, Holloway DE, Bramley PM. 2000. Application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolite profiling of plant isoprenoids. *The Plant Journal* **24**, 551–558.

Frusciante L, Carli P, Ercolano MR, Pernice R, Di Matteo A, Fogliano V, Pellegrini N. 2007. Antioxidant nutritional quality of tomato. *Molecular Nutrition and Food Research* **51**, 609–617.

Garcia I, Rodgers M, Pepin R, Hssich T, Matringe M. 1999. Characterization and subcellular compartmentation of recombinant 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Arabidopsis* in transgenic tobacco. *Plant Physiology* **119**, 1507–1516.

Gasser CS, Winter JA, Hironaka CM, Shah DM. 1988. Structure, expression, and evolution of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes of petunia and tomato. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 4280–4287.

Gilliland LU, Magallanes-Lundback M, Hemming C, Supplee A, Koornneef M, Bentsink L, Dellapenna D. 2006. Genetic basis for natural variation in seed vitamin E levels in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **103**, 18834–18841.

Görlach J, Beck A, Henstrand JM, Handa AK, Herrmann KM, Schmid J, Amrhein N. 1993. Differential expression of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) genes encoding shikimate pathway isoenzymes: I. 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase. *Plant Molecular Biology* **23**, 697–706.

Görlach J, Raesecke HR, Abel G, Wehrli R, Amrhein N, Schmid J. 1995. Organ-specific differences in the ratio of alternatively spliced chorismate synthase (LeCS2) transcripts in tomato. *The Plant Journal* **8**, 451–456.

Graindorge M, Giustini C, Jacomin AC, Kraut A, Curien G, Matringe M. 2010. Identification of a plant gene encoding glutamate/aspartate-prephenate aminotransferase: the last homeless enzyme of aromatic amino acids biosynthesis. *FEBS Letters* **584**, 4357–4360.

Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95–98.

Herbers K. 2003. Vitamin production in transgenic plants. *Journal of Plant Physiology* **160**, 821–829.

Hörtensteiner S. 2006. Chlorophyll degradation during senescence. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 55–77.

Ischebeck T, Zbierzak AM, Kanwischer M, Dormann P. 2006. A salvage pathway for phytol metabolism in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 2470–2477.

Joyard J, Ferro M, Masselon C, Seigneurin-Berny D, Salvi D, Garin J, Rolland N. 2009. Chloroplast proteomics and the compartmentation of plastidial isoprenoid biosynthetic pathways. *Molecular Plant* **2**, 1154–1180.

Jiménez-Gómez JM, Maloof JN. 2009. Sequence diversity in three tomato species: SNPs, markers, and molecular evolution. *BMC Plant Biology* **9**, 85.

Kamenetzky L, Asís R, Bassi S, et al. 2010. Genomic analysis of wild tomato introgressions determining metabolic- and yield-associated traits. *Plant Physiology* **152**, 1772–1786.

Li Y, Wang Z, Sun X, Tang K. 2008. The current opinions on the functions of tocopherol based on the genetic manipulation of tocopherol biosynthesis in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**, 1057–1069.

Li H, Liu H, Han Y, Wu X, Teng W, Liu G, Li W. 2010. Identification of QTL underlying vitamin E contents in soybean seed among multiple environments. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **120**, 1405–1413.

Livingstone K, Anderson S. 2009. Patterns of variation in the evolution of carotenoid biosynthetic pathway enzymes of higher plants. *Journal of Heredity* **100**, 754–761.

- Lois LM, Rodríguez-Concepción M, Gallego F, Campos N, Boronat A.** 2000. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *The Plant Journal* **22**, 503–513.
- Lu Y, Rausher MD.** 2003. Evolutionary rate variation in anthocyanin pathway genes. *Molecular Biology and Evolution* **20**, 1844–1853.
- Maeda H, Yoo H, Dudareva N.** 2010. Prephenate aminotransferase directs plant phenylalanine biosynthesis via arogenate. *Nature Chemical Biology* **7**, 19–21.
- Marwede V, Gul MK, Becker HC, Ecke W.** 2005. Mapping of QTL controlling tocopherol content in winter oilseed rape. *Plant Breeding* **124**, 20–26.
- Mène-Safrané L, DellaPenna D.** 2009. Biosynthesis, regulation and functions of tocopherols in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 301–309.
- Milone D, Stegmayer G, Kamenetzky L, Lopez M, Lee J-M, Giovannoni JJ, Carrari F.** 2010. *omeSOM: a software for clustering and visualization of transcriptional and metabolite data mined from interspecific crosses of crop plants. *BMC Bioinformatics* **11**, 438–447.
- Mobley EM, Kunkel BN, Keith B.** 1999. Identification, characterization and comparative analysis of a novel chorismate mutase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **240**, 115–123.
- Moyle L, Muir CD.** 2010. Reciprocal insights into adaptation from agricultural and evolutionary studies in tomato. *Evolutionary Applications* **3**, 409–421.
- Mueller LA, Mills A, Skwarecki B, Buels R, Menda N, Tanksley SD.** 2008. The SGN Comparative Map Viewer. *Bioinformatics* **24**, 422–423.
- Munné-Bosch S, Alegre L.** 2002. The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **21**, 31–57.
- Nagegowda DA.** 2010. Plant volatile terpenoid metabolism: biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. *FEBS Letters* **584**, 2965–2973.
- Paetzold H, Garms S, Bartram S, Wiczorek J, Uros-Gracia EM, Rodríguez-Concepción M, Boland W, Strack D, Hause B, Walter MH.** 2010. The isogene 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase II controls isoprenoid profiles, precursor pathway allocation and density of tomato trichomes. *Molecular Plant* **3**, 904–916.
- Peterman TK, Ohol YM, McReynolds LJ, Luna EJ.** 2004. Patellin1, a novel Sec14-like protein, localizes to the cell plate and binds phosphoinositides. *Plant Physiology* **136**, 3080–3094.
- Phillips MA, D'Auria JC, Gershenzon J, Pichersky E.** 2008. The *Arabidopsis thaliana* type I isopentenyl diphosphate isomerases are targeted to multiple subcellular compartments and have overlapping functions in isoprenoid biosynthesis. *The Plant Cell* **20**, 677–696.
- Ravanel S, Cherest H, Jabrin S, Grunwald D, Surdin-Kerjan Y, Douce R, Rebeille F.** 2001. Tetrahydrofolate biosynthesis in plants: molecular and functional characterization of dihydrofolate synthetase and three isoforms of folylpolyglutamate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **98**, 1523–1535.
- Rippert P, Scimemi C, Dubald M, Matringe M.** 2004. Engineering plant shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. *Plant Physiology* **134**, 92–100.
- Rippert P, Puyaubert J, Grisolle D, Derrier L, Matringe M.** 2009. Tyrosine and phenylalanine are synthesized within the plastids in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **149**, 1251–1260.
- Rodríguez-Concepción M, Ahumada I, Díez-Juez E, Sauret-Güeto S, Lois LM, Gallego F, Carretero-Paulet L, Campos N, Boronat A.** 2001. 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. *The Plant Journal* **27**, 213–222.
- Rodríguez-Concepción M, Querol J, Lois LM, Imperial S, Boronat A.** 2003. Bioinformatic and molecular analysis of hydroxymethylbutenyl diphosphate synthase (GCPE) gene expression during carotenoid accumulation in ripening tomato fruit. *Planta* **217**, 476–482.
- Rohdich F, Wungsintaweekul J, Lüttgen H, Fischer M, Eisenreich W, Schuhr CA, Fellermeier M, Schramek N, Zenk MH, Bacher A.** 2000. Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase from tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **97**, 8251–8256.
- Ronen G, Carmel-Goren L, Zamir D, Hirschberg J.** 2000. An alternative pathway to β -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of *Beta* and *old-gold* color mutations in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **97**, 11102–11107.
- Ros E.** 2009. Nuts and novel biomarkers of cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition* **89**, 1649S–1656S.
- Sadre R, Gruber J, Frentzen M.** 2006. Characterization of homogentisate prenyltransferases involved in plastoquinone-9 and tocopherol biosynthesis. *FEBS Letters* **580**, 5357–5362.
- Saito K, Tautz L, Mustelin T.** 2007. The lipid-binding SEC14 domain. *Biochimica et Biophysica Acta* **1771**, 719–726.
- Schauer N, Semel Y, Balbo I, Steinfath M, Reipsilber D, Selbig J, Pleban T, Zamir D, Fernie AR.** 2008. Mode of inheritance of primary metabolic traits in tomato. *The Plant Cell* **20**, 509–523.
- Schauer N, Semel Y, Roessner U, et al.** 2006. Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nature Biotechnology* **24**, 447–454.
- Schauer N, Zamir D, Fernie AR.** 2005. Metabolic profiling of leaves and fruit of wild species tomato: a survey of the *Solanum lycopersicon* complex. *Journal of Experimental Botany* **56**, 297–307.
- Schmid J, Schaller A, Leibinger U, Boll W, Amrhein N.** 1992. The *in-vitro* synthesized tomato shikimate kinase precursor is enzymatically active and is imported and processed to the mature enzyme by chloroplasts. *The Plant Journal* **2**, 375–383.
- Schenk N, Schelbert S, Kanwischer M, Goldschmidt EE, Dörmann P, Hörtensteiner S.** 2007. The chlorophyllases At CLH1 and AtCLH2 are not essential for senescence-related chlorophyll breakdown in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **581**, 5517–5525.

- Semchuk NM, Lushchak OV, Falk J, Krupinska K, Lushchak VI.** 2009. Inactivation of genes, encoding tocopherol biosynthetic pathway enzymes, results in oxidative stress in outdoor grown *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**, 384–390.
- Sokal RR, Rohlf FJ.** 1981. *Biometry*. Second Edition. Freeman, New York.
- Soll J, Schultz G.** 1979. Comparison of geranylgeranyl and phytol substituted methylquinols in the tocopherol synthesis of spinach chloroplasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **91**, 715–720.
- Sun Q, Zybailov B, Majeran W, Friso G, Olinares PDB, van Wijk KJ.** 2009. PPDB, the Plant Proteomics Database at Cornell. *Nucleic Acids Research* **37**, 969–974.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1596–1599.
- Thompson J, Higgins D, Gibson T.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673–4680.
- Tian L, DellaPenna D, Dixon RA.** 2007. The pds2 mutation is a lesion in the *Arabidopsis* homogentisate solanesyltransferase gene involved in plastoquinone biosynthesis. *Planta* **226**, 1067–1073.
- Tohge T, Fernie AR.** 2010. Combining genetic diversity, informatics and metabolomics to facilitate annotation of plant gene function. *Nature Protocols* **5**, 1210–1227.
- Traber MG, Sies H.** 1996. Vitamin E in humans: demand and delivery. *Annual Review of Nutrition* **16**, 321–347.
- Tzin V, Malitsky S, Aharoni A, Galili G.** 2009. Expression of a bacterial bi-functional chorismate mutase/prephenate dehydratase modulates primary and secondary metabolism associated with aromatic amino acids in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **60**, 156–167.
- Tzin V, Galili G.** 2010. New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Molecular Plant* **3**, 956–972.
- Valentin HE, Lincoln K, Moshiri F, et al.** 2006. The *Arabidopsis* vitamin E pathway *gene5-1* mutant reveals a critical role for phytyl kinase in seed tocopherol biosynthesis. *The Plant Cell* **18**, 212–224.
- Van Schie CCN, Ament K, Schmidt A, Lange T, Haring MA, Schuurink RC.** 2007. Geranyl diphosphate synthase is required for biosynthesis of gibberellins. *The Plant Journal* **52**, 752–762.
- Voorrips RE.** 2002. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity* **93**, 77–78.
- Yang Z.** 2007. PAML 4: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1586–1591.
- Yang Y, Zhang F, Ge S.** 2009. Evolutionary rate patterns of the gibberellin pathway genes. *BMC Evolutionary Biology* **9**, 206–217.
- Zamir D.** 2001. Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nature Reviews Genetics* **2**, 983–989.
- Zhang CX, Ho SC, Chen YM, Fu JH, Cheng SZ, Lin FY.** 2009. Greater vegetable and fruit intake is associated with a lower risk of breast cancer among Chinese women. *International Journal of Cancer* **125**, 181–188.
- Zhao J, Last RL.** 1995. Immunological characterization and chloroplast localization of the tryptophan biosynthetic enzymes of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 6081–6087.
- Zhu M, Zhao S.** 2007. Candidate gene identification approach: progress and challenges. *International Journal of Biological Sciences* **3**, 420–427.