JULIANA ALMEIDA BARROS DA SILVA

Regulação da biossíntese da vitamina E em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.): da diversidade natural à manipulação do metabolismo

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. Maria Magdalena Rossi
Laboratório de Genética Molecular de Plantas

São Paulo
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Almeida, Juliana

Regulação da biossíntese da vitamina E em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.): da diversidade natural à manipulação do metabolismo

247 p

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

1. Tomate 2. *Solanum lycopersicum* 3. Tocoferol 4. Vitamina E 5. Clorofila 6. Fitol 7. Metabolismo.

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

COMISSÃO JULGADORA

_____
Prof (a). Dr (a).

_____
Prof (a). Dr (a).

_____
Prof (a). Dr (a).

_____
Prof (a). Dr (a).

_____
Profa. Dra. Maria Magdalena Rossi
Orientadora

Aos meus pais, Manoel e Cida,
dedico

"[...] quem elegeu a busca não pode recusar a travessia."

Alfredo Bosi

Céu, inferno
(análise de Primeiras Estórias de Guimarães Rosa)

AGRADECIMENTOS

Tomo a oportunidade da gratidão para expressar a satisfação por finalizar esta etapa. Assim registro meus agradecimentos:

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

À FAPESP pelas bolsas concedidas no país e no exterior. Ao Programa EU-SOL pelo auxílio financeiro para estágio internacional.

À Magdalena Rossi por confiar-me tal trabalho; pela possibilidade das escolhas de ir e vir e, fundamentalmente, por suportá-las. Pela contínua intercessão de ideias; pela sua generosa e presente orientação ao longo desses anos. Pela amizade e incentivo. Por todos ensinamentos que contribuíram tanto para minha formação humana quanto científica.

Ao Fernando Carrari pelas valiosas contribuições metodológicas e conceituais que enriqueceram esse trabalho; pelas intervenções perspicazes na elaboração dos artigos; pela oportunidade de colaboração em parcerias tão frutíferas. Ao Leandro Quadrana, pela parceria, inquietude e boas discussões; pela introdução às ferramentas estatísticas e ao VIGS. A Luisa Bermudez pela cooperação e acolhimento.

Ao Rámon Asis pelos ensinamentos sobre química analítica, pela colaboração e prontidão nas análises bioquímicas; pelo recebimento. À Andrea Carranza pelo "otro par de manos" para os ensaios de atividade antioxidante. À Romina pelo auxílio nas análises em HPLC.

Ao Lázaro Peres pelo suporte para obtenção das linhagens transgênicas RNAi; pelas proveitosas contribuições que acrescentaram a esta tese as análises de mutantes de amadurecimento e senescência; pela infraestrutura para seleção e retrocruza dos mutantes TILLING. Por abrir gentilmente às portas de seu grupo de pesquisa. À Mariana Azevedo e ao Ivan Sestari pela parceria mais do que fundamental.

Ao Christophe Rothan pela colaboração para obtenção de mutantes EMS; pelo suporte para a realização do estágio no INRA-Bordeaux; pela cuidadosa revisão do manuscrito vte5. A Cecile Brès e Jean-Philippe Mauxion por introduzir-me à técnica do TILLING.

Ao Stefan Hörtensteiner pelo oportuno auxílio na quantificação de clorofila; pela supervisão de estágio na UZH; pela solicitude. Pelas contribuições valiosas para discussão dos resultados; pela leitura generosa e competente. À Luzia Guyer pelos ensinamentos na preparação e análise das amostras; pela sua inestimável ajuda em Zürich.

Ao Félix Kessler pela colaboração nas análises lipidômicas; pelas boas ideias e seu entusiasmo pelo tema. Ao Gáetan Glauser pela parceria nas análises UHPLC. À Livia Spicher pela ajuda na preparação das amostras e análise dos resultados; pelo envolvimento e todo suporte em Neuchâtel.

Ao Peter Dörmann pela oportunidade de colaboração nas análises de lipídeos. À Katharina vom Dorp pela cuidadosa análise das amostras.

À Eny Floh, ao Luciano Freschi, ao Marcos Buckeridge e à Marie Anne van Sluys pelo provimento de infraestrutura e de equipamentos para realização de experimentos no IBUSP.

Aos colegas do laboratório de Genética de Molecular Plantas: Andy, Bruno Lira, Daniele, Fabiana, Gabriela, Junia, Leandro Salles e Silvia, parceiros em tantos sítios. Obrigada pelos anos de convivência que muito contribuiram para minha formação. À Fabi pelos ensinamentos de qPCR; pelo auxílio com as clonagens e por tudo mais. À Silvia, pela ajuda técnica indispensável.

Aos colegas do laboratório de Biologia Celular: Amanda Macedo, André, Augusto Tomba, Bruno Navarro, Caroline, Fernanda, Igor, Leandro, Paula e Roberta Martins. Pela prestativa ajuda e boas conversas para além de tomate.

A todos do laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal (ESALQ) pela convivência, ajuda e descontração: Ariadne, Cássia, Eloísa, Frederico, Guilherme, João Pedro, Jonata, Lucas, Marcela, Maísa, Matheus e Stevan.

À Adriana, Eglee, Eveline e Viviane do laboratório de Fisiologia Ecológica de Plantas (LAFIECO) pelo convívio, auxílio nas análises laboratoriais (nitrogênio!) e trâmites internacionais. À Amanda de Souza pela maratona de medidas de fotossíntese; pela valiosa ajuda nas quantificações de açúcares e discussão dos resultados.

A Julien, Kentaro e Natsuko do INRA-Bordeaux, pela convivência e ajuda. Às queridas colegas de La Rouquette: Julia, Ilinka, Carolina, Elizabeth, Fah, Tamara e Regiane pelo convívio aconchegante; por compartir tantas boas experiências de suas culturas.

A Celine, Cyrille, Monica, Veronique do Laboratoire de Physiologie Végétale, pelo acolhimento e suporte durante a estadia em Neuchâtel. Aos colegas Deneb, Manu e Alaleh pela boa vizinhança no Jardin Botanique; pela generosa ajuda com o cotidiano franco-suíço.

A Aditi, Noemi, Song, Kathrin do grupo Molecular Plant Physiology UZH, pela solicitude; pelo interesse sincero na cultura brasileira.

Aos colegas do GaTE, Érika, Kleber e Mayra, pela ajuda oportuna; à Tatiana Côrrea pela presteza costumeira; pelo suporte de reagentes/protocolos, equipamentos e pelos incontáveis cafés.

Ao André Nakasato do LAM pelo suporte no sequenciamento.

Ao Homelhan pela solicitude; por tanto me ajudar com a manutenção das plantas.

Ao Waldir (IBUSP) e Mário (CEFAP) pelo suporte na obtenção das imagens de microscopia confocal.

À Carol, Mari e Sil, novamente, por ir além do razoável. Tanto e tanto.

Aos meus pais, Manoel e Cida, por todo apoio e torcida reconfortante; às minhas irmãs, Andréia e Nadia. Ao Miguel pela animação com os tomates.

Ao Bruno, por ser e estar, sempre.

"A felicidade aparece para aqueles que choram, para aqueles que se machucam, para aqueles que buscam e tentam sempre. E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam por suas vidas"

Clarice Lispector

ABREVIATURAS E NEOLOGISMOS

aa – aminoácidos
BLAST – ferramenta básica de busca de alinhamentos locais (do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*)
bp – pares de bases (o mesmo que pb)
cDNA – DNA complementar
cM – centimorgan
Ct – ciclo limiar (do inglês *treshold cycle*)
DEPC – dietilpirocarbonato
DNA – ácido desoxirribonucléico
DNAse – desoxirribonuclease
dNTP – desorribonucleotídeos trifosfatado
EDTA – ácido etilenodiamonotetracético
GFP – proteína fluorescente verde (do inglês *Green Fluorescent Protein*)
GOI – gene de interesse (do inglês *Gene of Interest*)
IL – linhagens introgredidas (do inglês *introgressed line*)
Kb – kilo pares de base
LB – meio de crescimento Luria-Bertani
Mb – mega pares de bases
MES – ácido 2-morfolinoetanosulfónico monohidratado
NADP – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido
nt – nucleotídeos
PCR – reação em cadeia da polimerasa (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)
ppm - partes por milhão
qPCR - reação em cadeia da polimerasa quantitativa (do inglês *Quantitative Polymerase Chain Reaction*)
QTL – *locus* para caráter quantitativo (do inglês *Quantitative Trait Locus*)
RNA – ácido ribonucléico
RNAi – RNA de interferência
RNAm – RNA mensageiro
rpm – revoluções por minuto
SGN – *Solanaceae Genome Network*
unigene – consenso de sequências de cDNA segundo a Solanaceae Genomics Network
U.V. - ultravioleta
5´UTR – região 5´ não traduzida do RNAm
3´UTR – região 3´ não traduzida do RNAm

SUMÁRIO

RESUMO 15
ABSTRACT 17
INTRODUÇÃO GERAL 19
1. A vitamina E: estrutura e importância nutricional 19
2. A biossíntese de tocoferol 21
3. A importância do tocoferol para o organismo vegetal 22
4. Melhoramento das espécies cultivadas: a exploração da diversidade natural e manipulação genética 24
5. O tomateiro: modelo de estudo com importância agronômica 27
6. A regulação da vitamina E em tomateiro: antecedentes e construção das hipóteses de trabalho 31
7. Referências bibliográficas 35
OBJETIVOS 43
CAPÍTULO I. ESTUDO DA REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL DA ROTA BIOSSINTÉTICA DE TOCOFERÓIS EM TOMATEIRO 45
CAPÍTULO II. ANÁLISE DO PERFIL TRANSCRICIONAL DOS GENES ASSOCIADOS À BIOSSÍNTESE DE VITAMINA E EM LINHAGENS INTROGREDIDAS (IL) QUE APRESENTAM AUMENTO NO CONTEÚDO DE TOCOFERÓIS 65
1. Introdução 65
2. Objetivos específicos 68
3. Material e métodos 69
3.1. Material vegetal 69
3.2. Análise da expressão gênica 69
3.2.1. Extração de RNA total e síntese de cDNA 69
3.2.2. PCR quantitativa em tempo real (qPCR) 70
4. Resultados e discussão 72
4.1. Perfil transcricional das IL6-1 e 6-2 72
4.2. Perfil transcricional das IL9-2 e 9-2-6 74
4.3. Perfil da IL9-1 76
5. Conclusão 81
6. Referências bibliográficas 82
CAPÍTULO III. ESTUDO DO EFEITO DOS GENES *CLOROFILASE1, FARNESOL QUINASE* E *FITOL QUINASE* NA BIOSSÍNTESE DE TOCOFERÓIS EM FRUTOS DE TOMATE VIA SILENCIAMENTO GÊNICO POR INDUZIDO VÍRUS 85
1. Introdução 85
2. Objetivos específicos 87

3. Material e métodos 88
3.1. Material vegetal 88
3.2. Cepas bacterianas e vetores 88
3.2.1. *Escherichia coli* 88
3.2.2. *Agrobacterium tumefaciens* 89
3.2.3. Plasmídeos 89
3.3. Extração de RNA total e síntese de cDNA 90
3.4. Construção dos vetores de VIGS 91
3.4.1. Clonagem do fragmento do gene de interesse (*GOI*) para VIGS 91
3.4.2. Clonagem do fragmento *GFP-GOI* 92
3.4.3. Obtenção da construção pTRV2*GFP-GOI* 92
3.4.4. Transformação de *A. tumefaciens* e seleção de clones pTRV2*GFP-GOI* 93
3.4.5. Agroinfiltração de botões florais e de folhas com TRV 93
3.5. Análise da expressão gênica 94
3.6. Quantificação do conteúdo de tocoferóis por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) 94
3.6.1. Preparação dos extratos 94
3.6.2. Determinação por HPLC 94
3.7. Quantificação de clorofila 95
4. Resultados 96
5. Discussão 101
6. Conclusão 103
7. Referências Bibliográficas 104
CAPÍTULO IV. AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE TOCOFERÓIS EM MUTANTES DE TOMATEIRO DEFICIENTES NO AMADURECIMENTO DE FRUTO, NA SENESCÊNCIA E NA PERCEPÇÃO DE ÁCIDO JASMÔNICO 107
CAPÍTULO V. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO GENE *CLOROFILASE1* EM TOMATEIRO 121
1. Introdução 121
2. Objetivos específicos 124
3. Material e métodos 125
3.1. Material vegetal 125
3.2. Cepas bacterianas e vetores 125
3.2.1. *Escherichia coli* 125
3.2.2. *Agrobacterium tumefaciens* 125

3.2.3. Plasmídeos 126
3.3. Extração de RNA total e síntese de cDNA 126
3.4. Obtenção da construção para estudo da localização subcelular da proteína SlCLH(1) . 126
3.5. Transformação transiente de folhas de *Nicotiana benthamiana* por agroinfiltração 127
3.6. Construção dos vetores para silenciamento gênico por RNAi 128
3.7. Transformação genética estável 128
3.8. Verificação da presença do transgene 129
3.9. Análise de expressão gênica nas linhagens RNAi transgênicas 129
3.10. Caracterização fenotípica das linhagens *SlCLH(1)*-RNAi transgênicas 130
3.10.1. Quantificação de prenilipídeos por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas 130
3.10.2. Clorofila e carotenóides 130
3.10.3. Quantificação de açúcares solúveis e amido 131
3.10.4. Parâmetros de fluorescência e trocas gasosas 132
4. Resultados 133
4.1. Verificação da localização subcelular 133
4.2. Obtenção de linhagens transgênicas estáveis silenciadas para *CLH(1)* 134
4.3. Caracterização fenotípica de plantas de tomateiro silenciadas para *CLH(1)* 135
4.3.1. Quantificação de clorofila e catabólitos verdes 136
4.3.2. Conteúdo de tocoferol 137
4.3.3. Perfil de prenilipídeos 138
4.3.4. Parâmetros fotossintéticos e determinação dos carboidratos foliares 138
4.3.5. Perfil de expressão 141
5. Discussão 143
6. Conclusão 145
7. Referências Bibliográficas 146
CAPÍTULO VI. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO GENE *FITOL QUINASE* EM TOMATEIRO 149
CONSIDERAÇÕES FINAIS 201
Referências bibliográficas 205
ARTIGOS PUBLICADOS 206
ANEXO I 207
ANEXO II 223
ANEXO III 237
ANEXO IV 241

RESUMO

Tocoferóis, compostos com atividade de vitamina E (VTE), são antioxidantes lipofílicos sintetizados exclusivamente por organismos fotossintetizantes. A produção desses compostos ocorre a partir da ligação de um grupo cromanol a uma cadeia isoprênica, esta originada a partir de duas vias metabólicas possíveis: pela síntese *de novo* ou pela ativação do fitol liberado durante a quebra da clorofila, esta dependente de fitol quinase (VTE5). Conhecer os mecanismos responsáveis pela síntese e pelo acúmulo de vitamina VTE em plantas cultivadas é de grande interesse devido sua importância para a fisiologia vegetal e para a saúde humana. Frutos de tomate e seus derivados constituem fonte significativa de VTE na dieta humana. Para além da importância nutricional, o tomateiro emerge como um interessante modelo de estudo dos mecanismos regulatórios subjacentes à biossíntese de tocoferóis, visto que seu fruto combina uma ativa síntese *de novo* de isoprenóides juntamente com a degradação de clorofila durante o amadurecimento. Em estudo anterior, *loci* para caracteres quantitativos (QTL) para tocoferol em frutos foram identificados a partir da determinação dos níveis das isoformas α, β, μ e δ em uma população de linhagens introgredidas (ILs) de *Solanum pennellii*. Genes candidatos dentro dos intervalos dos QTL foram propostos, incluindo alguns relacionados à defitilação da clorofila e ao metabolismo fitol, *CLOROFILASE* (*CLH*) e um homólogo à *VTE5*, nomeado *FARNESOL QUINASE* (*FOLK*). Nesse contexto, o presente trabalho apresenta contribuições para o entendimento da regulação da biossíntese de VTE em tomateiro. Para tanto, adotaram-se diferentes abordagens, as quais incluem: a caracterização inicial da regulação transcricional dos genes envolvidos na biossíntese de tocoferóis ao longo do desenvolvimento de tomateiro; a exploração dos determinantes genéticos envolvidos no QTL para tocoferol a partir da análise do perfil transcricional de ILs; a análise integrada das mudanças do metabolismo de tocoferóis e outros isoprenóides em mutantes de tomateiro deficientes no amadurecimento e na degradação de clorofila; e, por fim, o estudo detalhado do metabolismo do fitol por meio da caracterização funcional dos genes codificantes para VTE5, *FOLK* e *CLH(1)*. Os resultados obtidos fornecem valiosas informações sobre os mecanismos que controlam o acúmulo de VTE, além de expor inúmeras conexões entre o metabolismo de tocoferol e outras vias metabólicas que, em última análise, impactam a fisiologia de tomateiro.

ABSTRACT

Tocopherols, compounds with vitamin E activity, are lipid-soluble antioxidants exclusively synthesized by photosynthetic organisms. The formation of tocopherol involves the condensation of a chromanol group with an isoprenoid chain, derived from two possible metabolic pathways: from the *de novo* biosynthesis or from chlorophyll phytol tail recycling, which depends on phytol kinase (VTE5) activity. Understanding the mechanisms underlying synthesis and accumulation of vitamin E in crops is of great interest because of its implications for plant physiology and human health. Tomato fruit and its derivatives constitute a significant dietary source of VTE for humans. Beyond the nutritional value, tomato emerges as an interesting study model of the regulatory mechanisms underlying tocopherol biosynthesis, since fruit couples an active *de novo* synthesis of isoprenoids together with chlorophyll degradation along ripening. In a previous work, quantitative trait *loci* (QTL) for VTE content were identified in ripe fruits by tocopherol determination of α, β, μ e δ isoform levels in a population of *Solanum pennellii* introgression lines (IL). Candidate genes within QTL intervals were proposed, including some related to chlorophyll dephytylation and phytol metabolism, a *CHLOROPHYLLASE* (CLH) and a *VTE5* homolog, named *FARNESOL KINASE* (*FOLK*). In this context, this work presents contributions to understanding the regulation of VTE biosynthesis in tomato. For this, different approachs were taken including: an initial characterization of transcriptional regulation of the genes involved in tocopherol biosynthesis along tomato development; the exploitation of genetic determinants involved in QTL for tocopherol from the transcriptional profile analyses of ILs; the integrated analyses of tocopherols metabolism changes and other isoprenoids in ripening impaired and chlorophyll degraded tomato mutants; and, finally, the detailed study of phytol metabolism by means of functional characterization of the genes encoding for *VTE5*, *FOLK* and *CLH(1).* Our results provide valuable insights into the mechanisms that control the VTE accumulation and also expose several cross-talks between the tocopherol metabolism and other metabolic pathways that, ultimately, impact on tomato physiology.

INTRODUÇÃO GERAL

1. A vitamina E: estrutura e importância nutricional

A evolução dos processos metabólicos aeróbios, tais como a respiração e a fotossíntese, promoveu inevitavelmente a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos. Ânions superóxidos ($O2^{\bullet-}$), radicais lipídicos peroxil ($ROO^{\bullet}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxil ($OH^{\bullet}$), oxigênio singleto ($^1O_2$) são continuamente produzidos durante o metabolismo aeróbico dos organismos. Embora atuem como sinalizadores em diversos processos celulares, o desequilíbrio na produção de ROS é capaz de causar danos oxidativos significativos às proteínas, ao DNA e aos lipídeos. A detoxificação de ROS é feita por uma rede antioxidante dinâmica, interconectada e redundante, que inclui mecanismos enzimáticos – superóxido dismutase, ascobarto peroxidase, glutationa peroxidase, catalase – e não-enzimáticos – ascorbato (VTC), glutationa, flavonóides, carotenóides e tococromanóis (VTE) (Apel & Hirt, 2004).

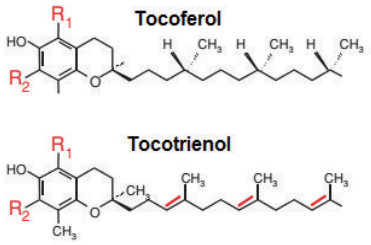
O termo VTE abrange uma classe de compostos lipossolúveis antioxidantes, tocoferóis e tocotrienóis, fundamentais para saúde humana, e coletivamente conhecidos como tococromanóis (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996; DellaPenna & Pogson, 2006). O valor nutricional desses compostos em animais foi descoberto há mais de um século, descrito inicialmente como fator da dieta importante para a reprodução animal (Evans & Bishop, 1922). Exclusivamente sintetizados por organismos fotossintetizantes, tocoferóis e tocotrienóis podem ocorrer naturalmente como quatro espécies diferencialmente metiladas (α, β, γ e δ) (Grusak & DellaPenna, 1999). O prefixo grego refere-se ao grau de metilação do grupo aromático; enquanto α-tocoferol e α-tocotrienol representam os tococromanóis com maior número de metilações, as respectivas formas δ são aquelas com menor grau. Tocoferóis, mais abundante em plantas, têm cadeia lateral saturada derivada do fitil-difosfato, enquanto tocotrienóis, abundantes nas sementes de monocotiledôneas, possuem cauda insaturada derivada do geranilgeranil difosfato (Figura 1). Embora todos análogos apresentem atividade antioxidante *in vitro*, α-tocoferol é a forma biológica mais ativa, em parte, devido a sua retenção seletiva no corpo humano pela proteína transportadora de α-tocoferol (α-TTP) (Traber & Sies, 1996; Ricciarelli *et al.*, 2001).

Como para todos os nutrientes essenciais, níveis mínimos de VTE são necessários na dieta humana. A deficiência clínica de VTE é rara e resulta em anemia hemolítica em bebês prematuros e alterações neurológicas diversas, incluindo a ataxia (impedimento no balanço e coordenação) e miopatia (fraqueza muscular). A baixa ingestão de VTE tem sido associada com aumento do risco a doenças vasculares, alguns tipos de câncer, além da diminuição da função imunológica (Kushi *et al.*, 1996; Wright *et al.*, 2006). Por sua vez, os estudos utilizando suplementação terapêutica têm

produzido efeitos ainda inconclusivos em virtude das inúmeras variáveis envolvidas como a diferença na biodisponibilidade, no transporte por proteínas específicas e no metabolismo das isoformas de VTE (Cardenas & Gosh, 2014). Na criação de gado, a suplementação da dieta com VTE tem grande importância para a indústria alimentar, pois melhora a qualidade e prolonga o tempo de prateleira da carne (Sander *et al.*, 1997). Além disso, a vida de prateleira de óleos vegetais e alimentos ricos em lipídeos também é influenciada pelo conteúdo e pela composição de tococromanóis (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996).

Os óleos de sementes constituem a principal fonte de VTE da dieta humana, porém, nestes alimentos α-tocoferol está presente com frequência como espécie minoritária. Por outro lado, tecidos fotossintéticos de hortaliças e frutos, por exemplo, brócolis, espinafre e tomate, apresentam altos teores de α-tocoferol. Em estudo comparativo, Chun *et al.* (2006) reportou valores de α-tocoferol que variam de 0,53 a 4,66 mg/100 g de peso comestível no tomate *in natura* e seus produtos derivados (pasta em conserva), respectivamente. O índice recomendado de ingestão diária é de 15 mg/dia da isoforma α pura ou 22.4 IU (*National Institute of Health*, http://ods.od.nih.gov/factsheets/list-all/VitaminE/).

Grande parte das propriedades benéficas de tocoferóis como VTE é atribuída a sua função como antioxidante, baseada na habilidade desses compostos em sequestrar (*scavenging*) radicais peroxil, prevenindo a propagação da peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados que compõem as membranas celulares (Serbinova *et al.*, 1991; Traber & Atkinson, 2008). Um segundo mecanismo de proteção observado em tocoferóis é a capacidade de eliminar (*quenching*) oxigênio singleto ($^1O_2$) (Kaiser *et al.*, 1990; Di Mascio *et al.*, 1990; Fukuzawa *et al.*, 1997), função que tem relevância na manutenção do aparato fotossintético em plantas (Krieger-Liszkay & Trebst, 2006; Triantaphylidès & Havaux, 2009).



Atividade versus α-tocoferol

Tococromanol	R_1	R_2	ligação com α-TPP	Atividade vitamina E
α-tocopherol	CH_3	CH_3	100	100
α-tocotrienol	CH_3	CH_3	12.5	21-50
β-tocopherol	CH_3	H	38	25-50
β-tocotrienol	CH_3	H	nd	nm
γ-tocopherol	H	CH_3	9	8-19
γ-tocotrienol	H	CH_3	nd	nm
δ-tocopherol	H	H	1.5	<3
δ-tocotrienol	H	H	nd	nm

Figura 1: Estrutura química dos tococromanóis e atividade de VTE. A tabela indica (i) o número e posição do radical metil no anel em α, β, γ e δ- tocoferol e tocotrienol (R1 e R2), (ii) a ligação de cada tococromanol à proteína transportadora de α-tocoferol humana (α-TTP), (iii) a atividade VTE de acordo com o ensaio de gestação-reabsorção em ratos, expresso como porcentagem relativa ao α-tocoferol (100%). Em vermelho, as diferenças estruturais. nm: não mensurável. Adaptado de Dellapenna & Pogson (2006)

2. A biossíntese de tocoferol

A síntese de tocoferol ocorre somente em organismos fotossintetizantes e produz as moléculas anfipáticas compostas por um anel hidroxicromanol, derivado do homogentisato, e uma cadeia prenílica, produtos da via do chiquimato (SK) e metil-eritritrol-fosfato (MEP), respectivamente (Munné-Bosch & Alegre, 2002). A condensação de ambos precursores inicia as reações que compõem a rota central da VTE, na qual as seguintes enzimas estão envolvidas: homogentisato fitil transferase (VTE2), dimetil-fitil-quinol metil transferase (VTE3), γ-tocoferol metiltransferase (VTE4), tocoferol ciclase (VTE1), além da fitol quinase (VTE5) (Dellapenna & Last, 2006). Após a ligação do fitil difosfato ao homogentisato pela VTE2 e posterior metilação, catalisada pela VTE3, o intermediário formado - 2,3-dimetil-5-fitil-1,4-hidroquinol (DMPQ) - é convertido em γ-tocoferol pela VTE1. O α-tocoferol é então produzido pela ação da VTE4. Para produção do fitil difosfato, além da síntese *de novo*, existe uma via alternativa dependente da fitol quinase (VTE5), que fosforila o fitol liberado durante a degradação da clorofila para incorporação subsequente na síntese de tocoferóis (Valentin *et al.*, 2006; Ischebeck *et al.*, 2006) (Figura 2A).

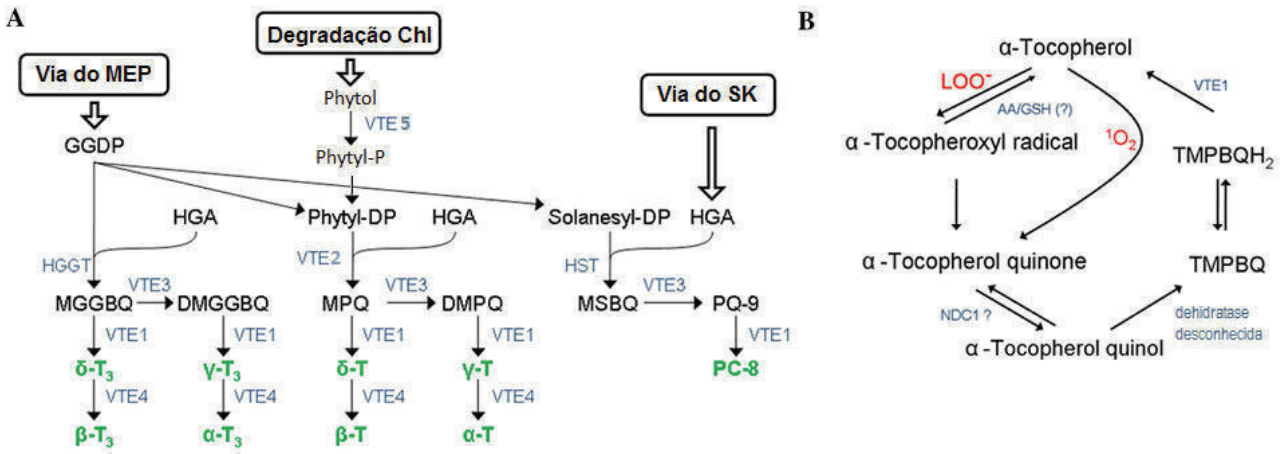


Figura 2. Visão geral da biossíntese de tococromanóis em plantas e do ciclo de oxidação e reciclagem de α-tocoferol. (A) Biossíntese. T, tocoferol; T_3, tocotrienol; PC-8, plastocromanol-8; PQ-9, plastoquinona-9; MPQ, 2-methyl-6-fitil-1,4-hidroquinol; DMPQ, 2,3-dimetil-5-fitil-1,4-benzoquinol; MGGBQ, 2-metil-6-geranilgeranil benzoquinol; DMGGBQ, 2,3-dimetil-6-geranilgeranil benzoquinol; MSBQ, 2-metil-6-solanesil-1,4-benzoquinol; DMSBQ, 2,3-dimetil-6-solanesil-1,4-benzoquinol; HST, homogentisato solanesil transferase; GGDP, geranilgeranil difosfato; HGA, homogentisato; Chl, clorofila; MEP, metil eritritol fosfato; SK, chiquimato. (B) Ciclo de oxidação e reciclagem de α-tocoferol. AA/GSH, ciclo do ascorbato/glutationa; NDC1, oxiredutase de quinona dependente de NAD(P)Hase; TMPBQ, 2,3,5-trimetil-6-fitil-1,4-benzoquinona; TMPBQH2, 2,3,5-trimetil-6-fitil-1,4-benzoquinol. Além do sequestro de radicais peroxil lipídicos (LOO·) e oxigênio singleto ($^1O_2$); tocoferol pode fisicamente desativar $^1O_2$ na membrana dos tilacóides (não representado). ?: denota possíveis fatores envolvidos na conversão representada. Adaptado de Miret & Munne-Bosch (2015).

VTE1, VTE3 e VTE4 são igualmente responsáveis pela formação de tocotrienóis e, nas espécies que acumulam significativamente esses compostos, há uma preniltransferase específica para cadeia insaturada, a homogentisato geranilgeranil transferase (HGGT) (Cahoon *et al.*, 2003; Hunter & Cahoon, 2007) (Figura 2A). Para além da síntese *de novo,* VTE1 também atua no ciclo redox de tocoferóis. Após a reação com radical peroxil, o radical α-tocoferoxil formado é logo reduzido por outros antioxidantes (*i.e.* ascorbato e glutationa); o intermediário produzido, α-tocoferolquinol (α-TQH_2), pode ser convertido novamente a tocoferol por uma sequência de reações que depende da atividade de VTE1 (Kobayashi & DellaPenna, 2008; Eugeni-Piller *et al.*, 2014) (Figura 2B).

Outra peculiaridade da biossíntese de VTE em plantas é sua estreita relação com a formação de outras prenilquinonas (Block *et al.*, 2013). Primeiro, o anel cromanol de plastoquinona-9 (PQ-9), transportador de elétrons que atua no fotossistema II (PSII), também é originado do homogentisato. Segundo, VTE3 também atua como metiltransferase no intermediário quinol produzido na síntese de PQ-9. Finalmente, PQ-9 serve como substrato para a síntese de outro tococromanol nos plastoglóbulos, o plastocromanol (PC-8), reação catalisada pela VTE1 (Figura 2A). Embora pouco estudado comparado ao tocoferol, PC-8 também atua como antioxidante em plantas (Kruk *et al.*, 2014).

Nas células vegetais, enquanto as atividades de VTE2, VTE3, VTE4 e VTE5 estão associadas à membrana interna do plastídeo (Soll *et al.*, 1985; Cheng *et al.*, 2003; Ischebeck *et al.*, 2006; Zbierzak *et al.*, 2010), a VTE1 está compartimentalizada em inclusões lipídicas conhecidas como plastoglóbulos (Vidi *et al.*, 2006; Lundquist *et al.*, 2012). Tais observações sugerem um intenso tráfego de intermediários dentro do plastídeo para síntese desses compostos (Brehélin *et al.*, 2007; Besagni & Kessler, 2013). Coincidentemente, em tecidos fotossintéticos, tococromanóis estão presentes em grande quantidade em todas as membranas plastidiais: envelope, tilacóides fotossinteticamente ativos e plastoglóbulos (Lichtenthaler, 2007). Fora do cloroplasto, também podem ser encontrados nos corpos oleosos, derivados do retículo endoplasmático, de sementes como girassol e aveia (DellaPena & Mène-Saffrané, 2011).

3. A importância do tocoferol para o organismo vegetal

A presença marcante de tococromanóis nos cloroplastos está intimamente relacionada a algumas das principais funções atribuídas para esses antioxidantes em plantas. Durante a fotossíntese, tanto o vazamento de elétrons da cadeia de transporte de elétrons, quanto a fotorreatividade da clorofila favorecem a formação de ROS (Foyer & Noctor, 2005). Como parte da maquinaria de fotoproteção, tocoferóis atuam particularmente no controle (i) dos níveis de $^1O_2$ no PSII, que possibilita o contínuo *turnover* da proteína D_1, necessário para manutenção dos centros de reação

(Krieger-Liszkay & Trebst 2006), (ii) da extensão da peroxidação lipídica nos tilacóides, especialmente durante condições de estresse (Triantaphylidès & Havaux, 2009; Rastogi *et al.*, 2014; Miret & Munné-Bosch, 2015).

A caracterização de mutantes para VTE e plantas transgênicas tem contribuído de maneira significativa para o conhecimento da função de tocoferóis em plantas (revisto por Falk & Munné-Bosch, 2010; DellaPenna & Mène-Saffrané, 2011). Estes estudos sugerem que além de funções associadas à fotoproteção, VTE desempenha um papel em diversos processos fisiológicos como germinação e estabelecimento da plântula, senescência foliar, resposta aos estresses abióticos, crescimento e particionamento de fotoassimilados (Falk & Munné-Bosch, 2010; Mène-Saffrané *et al.*, 2010; Asensi-Fabado *et al.*, 2014; Eugeni-Piller *et al.*, 2014; Maeda *et al.*, 2014).

Curiosamente, plantas adultas deficientes em tocoferol apresentam fenótipo discrepante sob condições ótimas de crescimento. Enquanto plantas de batata (*Solanum tuberosum*) e de milho (*Zea mays*) deficientes em *VTE1* exibem folhas fonte com prejuízo na exportação de açúcares e déficit no crescimento em condições normais (Provencher *et al.*, 2001; Hofius *et al.*, 2004), tal fenótipo não é observado em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) e ocorre em mutantes de *Arabidopsis thaliana vte2* apenas sob condições de estresse causado por baixa temperatura (Maeda *et al.* 2006; 2008). Tais diferenças observadas na partição de açúcares poderiam ser explicadas considerando as demandas fisiológicas das espécies em questão: batata e milho, diferentemente de *Arabidopsis* e tabaco, possuem órgãos drenos fortes que demandam alta taxa de exportação de açúcares das folhas fonte (Asensi-Fabado *et al.*, 2014). Todavia, a falta de fenótipos óbvios em plantas adultas aparentemente contradiz as funções de fotoproteção atribuídas ao tocoferol no cloroplasto. Esse fenômeno, porém, pode ser entendido à luz da rede de detoxificação que atua nos cloroplastos, na qual outros antioxidantes lipossolúveis podem compensar a ausência de VTE nas membranas de plantas deficientes. Vários trabalhos que caracterizam mutantes desprovidos de componentes do sistema antioxidante apontam a indução de vias alternativas de defesa (Miret & Munné-Bosch, 2015). No entanto, o estudo de duplos mutantes - por exemplo, deficientes tanto em tocoferóis quanto em componentes do ciclo da xantofila - assinalam que a rede de antioxidantes do cloroplasto tolera a deficiência de um componente, mas efeitos severos serão observados quando mais de uma via é acometida (Munné-Bosch & Falk, 2004; Havaux *et al.*, 2005).

O acúmulo de tocoferóis nos tecidos vegetais é um processo altamente controlado. Por um lado, está sujeito à modulação ambiental; em resposta a estresses, incluindo seca, baixa temperatura, alta luminosidade e osmótico, os níveis de tocoferóis aumentam em geral (Munné-Bosch, 2005). Tais observações estão de acordo com a responsividade dos genes envolvidos na síntese de VTE a hormônios como etileno, jasmonato, ácido salicílico e ácido abscísico (revisto por Havaux & García-

Plazaola, 2014). Além disso, fatores internos também determinam a regulação do conteúdo de tocoferol, especialmente durante o processo de senescência, em que os níveis de tocoferol aumentam gradativamente (Hormaetxe *et al.*, 2005). Da relação coordenada entre os níveis de clorofila e de tocoferóis durante a senescência, ambas moléculas derivadas da cadeia isoprênica fitil difosfato, depreendeu-se que o tocoferol poderia ser um dreno do fitol gerado pela quebra da clorofila (Rise *et al.*, 1989). Contudo, para ser incorporado na síntese de tocoferol, o fitol deveria ser ativado por subsequentes fosforilações. A demonstração de uma via de reciclagem específica para este álcool prenílico juntamente com a clonagem do gene codificante para uma das quinases, a enzima VTE5, reforçou a hipótese de tocoferóis como dreno do fitol (Figura 2). Mutantes de *Arabidopsis vte5* apresentam redução de aproximadamente 80% e 65% do conteúdo de tocoferóis em sementes e folhas maduras, respectivamente (Valentin *et al.*, 2006). Evidências adicionais foram obtidas no estudo com plântulas de *Arabidopsis* supridas com fitol exógeno marcado; estas exibiram não só aumento de tocoferóis, mas também de ésteres de fitol, compostos igualmente induzidos sob condições de estresses e que se acumulam nos plastoglóbulos (Ischebeck *et al.*, 2006). Considerando a possível toxicidade atribuída ao fitol livre nas células, tocoferóis e ésteres do fitol formariam um mecanismo de detoxificação que atuaria no cloroplasto associado aos plastoglóbulos (Dörmann, 2007).

4. Melhoramento das espécies cultivadas: a exploração da diversidade natural e manipulação genética

Em virtude da sua importância na fisiologia vegetal e para a nutrição humana, muitos esforços têm sido feitos para entender os mecanismos responsáveis pela biossíntese e acúmulo de VTE em plantas, especialmente nas espécies cultivadas, com o objetivo de melhorar a produtividade e a qualidade nutricional.

A exploração da diversidade natural constitui uma das possíveis abordagens para o melhoramento do conteúdo de VTE nas plantas cultivadas. Até o momento, inúmeros *loci* para caracteres quantitativos (QTL) que explicam a variação no conteúdo total e na composição de VTE foram identificados, utilizando populações de mapeamento de *Arabidopsis*, soja (*Glicine max*), colza (*Brassica napus*), girassol (*Helianthus annuus*), milho e tomate (*Solanum lycopersicum*) (Gilliland *et al.* 2006; Schauer *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2011; Dwiyanti *et al.* 2011; Haddadi *et al.* 2012; Lipka *et al.*, 2013; Shutu *et al.* 2012; Wang *et al.* 2012). Em alguns desses estudos, genes da rota central de tocoferol colocalizam com os QTL, embora o tamanho do intervalo tenha limitado a demonstração definitiva de sua base molecular (Fitzpatrick *et al.*, 2012).

A elucidação da rota biossintética da VTE permitiu substancial progresso na manipulação genética dessa via, permitindo a obtenção de plantas transgênicas em várias espécies cultivadas com

altos teores VTE, destacando-se milho, soja e canola (Fitzpatrick *et al.*, 2012). Desde a primeira demonstração que a composição de VTE poderia ser alterada em favor da síntese de α-tocoferol (Shintani & DellaPenna, 1998), vários esforços têm sido feitos para aumentar o conteúdo e/ou biodisponilidade de VTE. Dos resultados obtidos pelos estudos subsequentes, depreende-se que VTE3 e VTE4 representam pontos chaves no controle da composição de tocoferol em diferentes espécies (Collakova & DellaPenna, 2003a; Van Eenennaam *et al.*, 2003; Quadrana *et al.*, 2011), enquanto HGGT e VTE2 são limitantes para os níveis totais de tocotrienóis e tocoferóis, respectivamente (Cahoon *et al.*, 2003; Collakova & DellaPenna, 2003b; Sattler *et al.*, 2004; Karunanandaa *et al.*, 2005; Seo *et al.*, 2011). Com efeito, a sobrexpressão de VTE2 resultou apenas em modesto aumento no conteúdo VTE, particularmente, em soja, canola e tomate. Uma explicação plausível para esses resultados apoia-se na complexa regulação do *pool* de fitil difosfato no plastídeo, proveniente tanto da síntese *de novo* - a partir da via do MEP - quanto da degradação da clorofila; de fato, a disponibilidade de cadeia isoprênica constitui um dos importantes gargalos para o aumento de tocoferóis.

Outro limitante, todavia, é o *pool* de homogentisato. Tentativas de manipulação do conteúdo de VTE em plantas transgênicas por meio da sobrexpressão da hidroxifenil piruvato (HPPD), que catalisa o passo final na produção do homogentisato, produziram apenas incrementos modestos (Tsegaye *et al.*, 2002; Falk *et al.*, 2003; Karunanandaa *et al.*, 2005). Nesse caso, o gargalo metabólico para produção do homogentisato decorre do forte *feedback* negativo exercido pela tirosina nas reações finais da via do SK que levam à síntese do hidrofenil piruvato, impedindo, portanto, o aumento da disponibilidade desse precursor para a produção de tocoferóis (Rippert & Matringe, 2002; Tzin & Galili, 2010). A introdução de genes bacterianos e de leveduras em plantas sobrepuseram essa regulação negativa (Figura 3). Plantas transgênicas de *Arabidopsis* e de soja, que sobrexpressam uma corismato mutase/prefenato desidratase (CM/PDT) bifuncional bacteriana insensível ao *feedback* negativo da tirosina mostraram um considerável acúmulo de tococromanóis, especialmente de tocotrienóis (Karunanandaa *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2013). De forma semelhante, plantas de tabaco sobrexpressando uma prefenato dehidrogenase (PDH) de levedura capaz de converte prefenato em hidrofenil piruvato diretamente – rota identificada também em leguminosas (Schenk *et al.*, 2015) – também resultou no incremento no conteúdo de tocotrienóis (Rippert *et al.*, 2004).

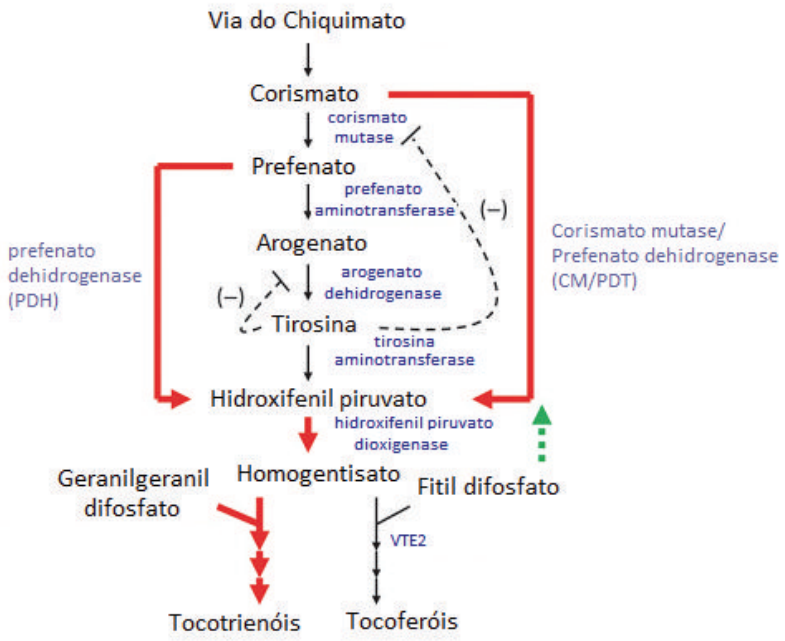


Figura 3: Biossíntese do homogentisato e regulação pós-transcricional da via do chiquimato. O nível de homogentisato é altamente regulado pela concentração de tirosina por meio de feedback negativo nas enzimas da rota (linhas tracejadas). Pontos regulatórios sobrepostos em plantas pela expressão de genes de microrganismos estão destacados em vermelho. O desbalanço eficiente na produção de homogentisato é atingido juntamente com a sobrexpressão da hidroxigenil piruvato dioxigenase, que resulta no aumento de VTE, principalmente de tocotrienóis. Adaptado de Zhang *et al.* (2013).

Os trabalhos descritos acima revelam que o acúmulo de VTE é influenciado por perturbações das vias precursoras tanto do MEP quanto do SK. Tais observação implicam uma maior complexidade para a manipulação do conteúdo desse nutracêutico em plantas, visto que ambas são vias centrais no metabolismo do plastídeos. Enquanto a rota do MEP é responsável pela formação de isoprenóides, precursores da síntese de clorofilas, carotenóides e prenilquinonas (DellaPenna & Pogson, 2006), a rota do SK produz intermediários para a síntese de folato (vitamina B_9), prenilquinonas, aminoácidos aromáticos e seus derivados, como fenilpropanóides e alcalóides (Tzin *et al.*, 2010).

Nessa perspectiva, manipulações de fatores genéticos que influenciem o metabolismo e desenvolvimento plastidial poderiam afetar o conteúdo de VTE. Com efeito, em tomateiro, a alteração de fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento e amadurecimento dos frutos (Enfissi *et al.*, 2010; Karlova *et al.*, 2011) e na formação da cutícula de frutos (Adato *et al.*, 2009) modificaram o conteúdo de tocoferóis. Notavelmente, plantas transgênicas de *S. lycopersicum* que sobrexpressam em fruto o gene *FITOENO SINTASE* (*PSY*), que codifica para enzima chave da biossíntese de carotenóides, apresentaram incremento nos níveis de carotenóides e também de tocoferol (Fraser *et al.*, 2007). Em contrapartida, modificações na atividade do complexo NAD(P)H dehidrogenase plastidial, que catalisa a redução das PQ-9, favoreceu o acúmulo de tocoferóis em detrimento de licopeno em tomate (Nashilevitz *et al.*, 2010).

5. O tomateiro: modelo de estudo com importância agronômica

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L., antigo *Lycopersicon esculentum*) desponta atualmente como uma das horticulturas de maior importância econômica mundial além de ser organismo modelo para estudo dos aspectos relacionados ao desenvolvimento e fisiologia dos frutos carnosos.

Sob a perspectiva agronômica, o tomateiro é uma das hortaliças mais cultivadas mundialmente, cuja produção ultrapassa 160 milhões de toneladas anualmente. China, Índia e Estados Unidos destacam-se na produção mundial, enquanto o Brasil consolida-se na oitava posição com um volume de 4,2 milhões de toneladas ao ano (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO, http://faostat.fao.org). O destino da produção é, principalmente, o consumo humano na forma *in natura* ou de produtos processados pela indústria. O fruto de tomate e seus derivados constituem fonte importante de aminoácidos essenciais, fibras, flavonóides, vitaminas C (VTC), (VTE) e carotenóides para a dieta humana (Abushita *et al.*, 1997; Beecher, 1998).

S. lycopersicum é uma das espécies domesticadas da família Solanaceae da qual também fazem parte batata, berinjela (*Solanum melongena*), pimenta (*Capsicum* ssp) e tabaco (várias espécies). Dentro dessa família, o tomateiro é a espécie mais profundamente estudada, sendo o modelo primário para o estudo da biologia de frutos carnosos e climatéricos (Giovannoni, 2004).

O fruto do tomateiro é constituído de uma epiderme, de um espesso pericarpo - derivado da parede do ovário - e de tecido placentário que envolve as sementes. Ao longo do desenvolvimento do fruto, distinguem-se quatro fases (Figura 4A): (i) o desenvolvimento da flor, desde a iniciação floral até antese; (ii) o período de intensa divisão celular que começa após fertilização; (iii) o período de expansão celular, que se estende desde o fim da fase de divisão até o início do amadurecimento, no qual o fruto atinge seu tamanho máximo, e passa por sucessivos processos de endoreduplicação gerando células altamente polissomáticas (256C); e (iv) o amadurecimento, marcado por alterações bioquímicas, incluindo o acúmulo de açúcares, ácidos, pigmentos e voláteis, que afetam a aparência, a textura e o teor nutricional atraindo organismos dispersores de sementes (Gillaspy *et al.*, 1993; Giovannoni, 2004). Sob a perspectiva agronômica, o valor nutricional, o sabor, o aroma, as características de processamento e o tempo de prateleira determinam a qualidade do fruto (Osorio *et al.*, 2013).

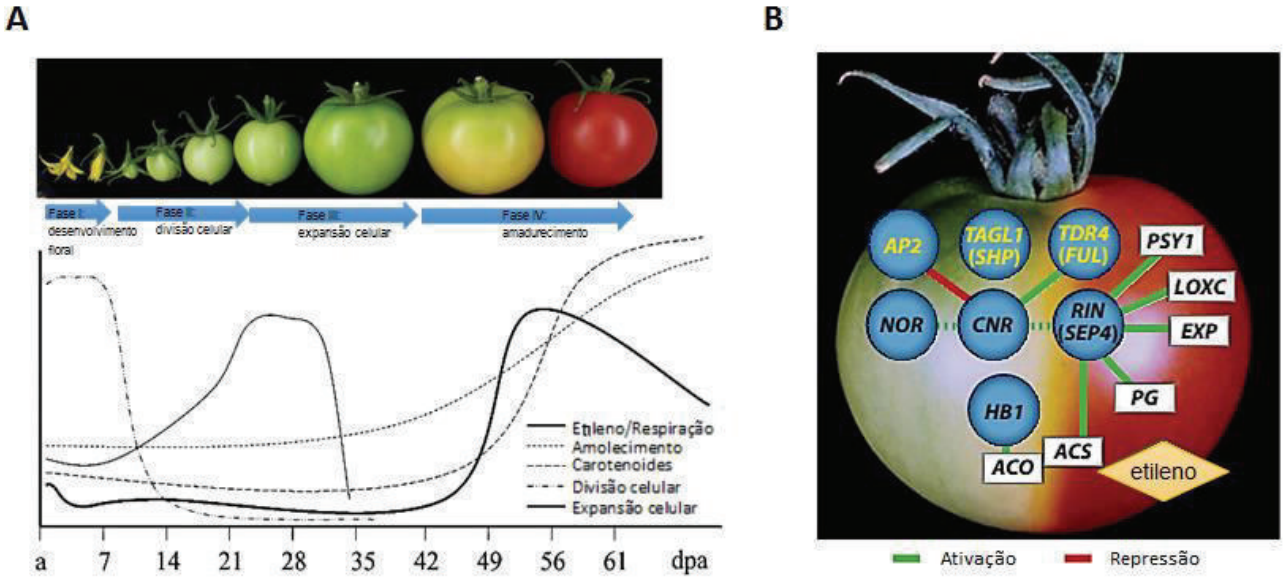


Figura 4. Desenvolvimento do fruto de tomateiro. (A) Aspecto do fruto desde a antese até o amadurecimento e principais alterações bioquímicas e fisiológicas. a: antese. dpa: dias pós-antese. Adaptado de Giovannoni (2004) e Karlova *et al.* (2014). (B) Rede molecular de regulação do amadurecimento de frutos carnosos com os principais reguladores conhecidos. Os círculos azuis são fatores de transcrição; os genes em amarelo são os ortólogos também encontrados em frutos deiscentes como de *Arabidopsis*. Alguns dos genes regulados pelos fatores são mostrados em caixas brancas. Precisamente, o modo de interação entre NOR, CNR e RIN ainda é desconhecido e representado por linhas pontilhadas. As abreviaturas correspondem a: gene homeótico floral *APETALA2* (*AP2*); gene *MADS-box TOMATO AGAMOUS LIKE1* (*TAGL1*); gene *MADS box* (*TDR4/FUL*); gene da proteína com *HOMEODOMÍNIO DE ZÍPER DE LEUCINA* (*HB1*); genes envolvidos na síntese de etileno *ACC OXIDASE* (*ACO*) e *ACC SINTASE* (*ACS*), de carotenóides *FITOENO SINTASE* (*PSY1*), de parede celular *EXPANSINA* (*EXP*) e *POLIGALACTURONASE* (*PG*), e de compostos voláteis *13-LIPOXIGENASE* (*LoxC*). Adaptado de Seymour *et al.* (2013).

O amadurecimento em frutos climatéricos coincide com a maturação da semente e está intimamente relacionado com o aumento da respiração e biossíntese de etileno, desencadeando uma complexa, coordenada e rápida alteração no perfil metabólico (Giovannoni, 2004). Um dos processos importantes nessa fase de desenvolvimento dos frutos é a conversão de cloroplastos a cromoplastos (Figura 5). Ao longo do amadurecimento, os tilacóides dos cloroplastos se desorganizam; os plastoglóbulos, por sua vez, aumentam de tamanho. Simultaneamente, enquanto a clorofila é degradada, a síntese de carotenóides é dramaticamente estimulada e resulta no acúmulo de predominante de licopeno, determinando, assim, a mudança de cor (Klee & Giovannoni 2011). O impressivo avanço na compreensão dos aspectos moleculares que regulam o amadurecimento foi alcançado, em parte, por meio da caracterização de mutantes monogênicos de tomateiro deficientes nesse processo, tais como *ripening-inhibitor* (*rin*), *non-ripening* (*nor*), *colorless non-ripening* (*Cnr*) e *never-ripe* (*Nr*; Giovannoni, 2006). Enquanto a proteína Nr corresponde a um dos receptores de etileno, NOR, CNR e RIN são fatores de transcrição que regulam globalmente o amadurecimento. Detalhados estudo de imunoprecipitação de cromatina demonstraram que RIN modula a expressão de centenas de genes envolvidos em vias ativas durante a transição de frutos verdes para maduros,

i.e. carotenogênese, degradação da clorofila, síntese e percepção de etileno, remodelamento da parede celular (Klee & Giovannoni 2011; Martel *et al.*, 2011; Fujisawa *et al.*, 2013) (Figura 4B).

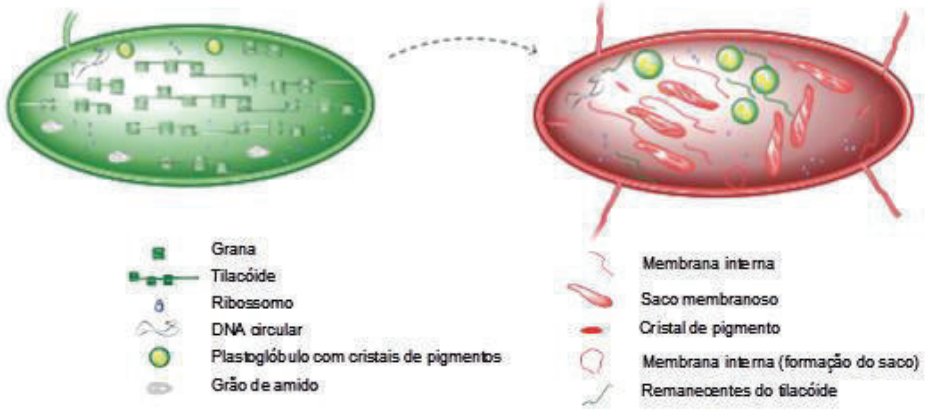


Figura 5. Representação esquemática das mudanças que ocorrem na diferenciação de cloroplastos em cromoplastos. Adaptado de Bian *et al.* (2011).

A utilização do tomateiro como modelo de estudo é decorrente das diversas características intrínsecas da espécie, como genoma diplóide de tamanho reduzido (900 Mb), curto tempo de geração e reprodução por autofecundação (Shibata, 2005). Além disso, importantes ferramentas para análise genética são aplicadas com sucesso em tomateiro como, por exemplo, a transformação genética estável e o silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) (Barone *et al.*, 2008; Quadrana *et al.*, 2011). Finalmente, nas últimas duas décadas, uma vasta diversidade de recursos genéticos e genômicos foram desenvolvidos, os quais incluem: (i) mapas genéticos de alta densidade; (ii) caracterização do germoplasma selvagem; (iii) populações de mapeamento de QTL; (iv) coleções de mutantes e plataformas para TILLING (*Targeted Induced Local Lesions in Genomes*); (iv) genoma sequenciado tanto da espécie cultivada *S. lycopersicum* (*cv*. Heinz 1706) quanto de espécies selvagens correlatas como *Solanum pennellii* e *Solanum pimpinellifolioum* (The Tomato Genome Consortium, 2012; Bolger *et al.*, 2014), todos de acesso público (*Solanaceae Genomics Network,* http://solgenomics.net/). Com o advento das tecnologias de sequenciamento da nova geração (*next-generation sequencing*), para além das sequências genômicas altamente curadas, também estão disponíveis o transcriptoma de *S. lycopersicum* em diferentes tecidos e condições, que incluem tanto dados de RNA codificante (mRNA) quanto de RNAs regulatórios - pequenos RNA (sRNA) e micro RNA (miRNA) - além da caracterização do epigenoma (Zhong *et al.*, 2013). Dos 34.727 genes codificantes para proteínas preditos no genoma de referência (ITAG Release 2.3), 30.855 são suportados pelos dados de sequenciamento de RNA (The Tomato Genome Consortium, 2012).

Dentro da seção Lycopersicon existem 12 espécies selvagens, as quais exibem grande diversidade fenotípica (Peralta *et al.*, 2005), incluindo variações no conteúdo de metabólitos em folhas e frutos (Schauer *et al.,* 2005). Essas espécies são portadoras de valiosos genes que podem contribuir para o melhoramento nutricional e industrial do cultivar de elite (Zamir, 2001; Fernie & Klee, 2011). A maioria dos caracteres de interesse agronômico é de herança quantitativa, sendo determinada por QTL (Fernie & Schauer, 2009; Stitt *et al.,* 2010). Partindo da exploração da variação natural, uma das abordagens para estudo genético das características de heranças complexas, é o mapeamento de QTL, que utiliza populações experimentais produzidas a partir do cruzamentos de linhagens geneticamente divergentes e com fenótipo contrastante (Rothan & Causse, 2007; Stitt *et al.*, 2010). Dentre elas, as populações de linhagens introgredidas (ILs) constituem uma poderosa ferramenta para espécies autógamas. Isso porque são geradas por retrocruzamentos sucessivos da progênie F_1 com um dos genitores e, ao final, os indivíduos contêm apenas um único fragmento introgredido do genótipo doador que se contrapõem ao fundo genético isogênico (Figura 6A). Por conseguinte, qualquer diferença fenotípica observada entre a IL e o parental recorrente é atribuída, exclusivamente, ao fragmento genômico introgredido. De fato, outra vantagem dessa população experimental é a homozigose da introgressão, permitindo a manutenção por autofecundação e, portanto, a utilização em diversas situações experimentais (Zamir, 2001; Lippman *et al.*, 2007; Rothan & Causse, 2007).

No caso do tomateiro, uma população de ILs que combina fragmentos genômicos da espécie selvagem *S. pennellii* (LA716) no fundo genético da espécie domesticada *S. lycopersicum* (*cv*. M82) (Eshed & Zamir, 1995) tem sido extensivamente caracterizada. Ao todo, os fragmentos introgredidos das ILs de *S. pennellii* cobrem por completo o genoma do tomateiro sendo bem delimitados por marcadores moleculares (http://www.sgn.cornell.edu/maps/pe.pl) (Figura 6B). A caracterização fenotípica das ILs de *S. pennellii* permitiu a identificação de milhares de QTL que afetam desde morfologia da planta, produtividade, atividade enzimática e metabolismo do fruto (Lippman *et al.*, 2007; Fernie & Schauer, 2009; Steinhauser *et al.*, 2011; Chitwood *et al.*, 2013; Alseekh *et al.*, 2015; Perez-Fons *et al.*, 2014), incluindo o conteúdo de VTE.

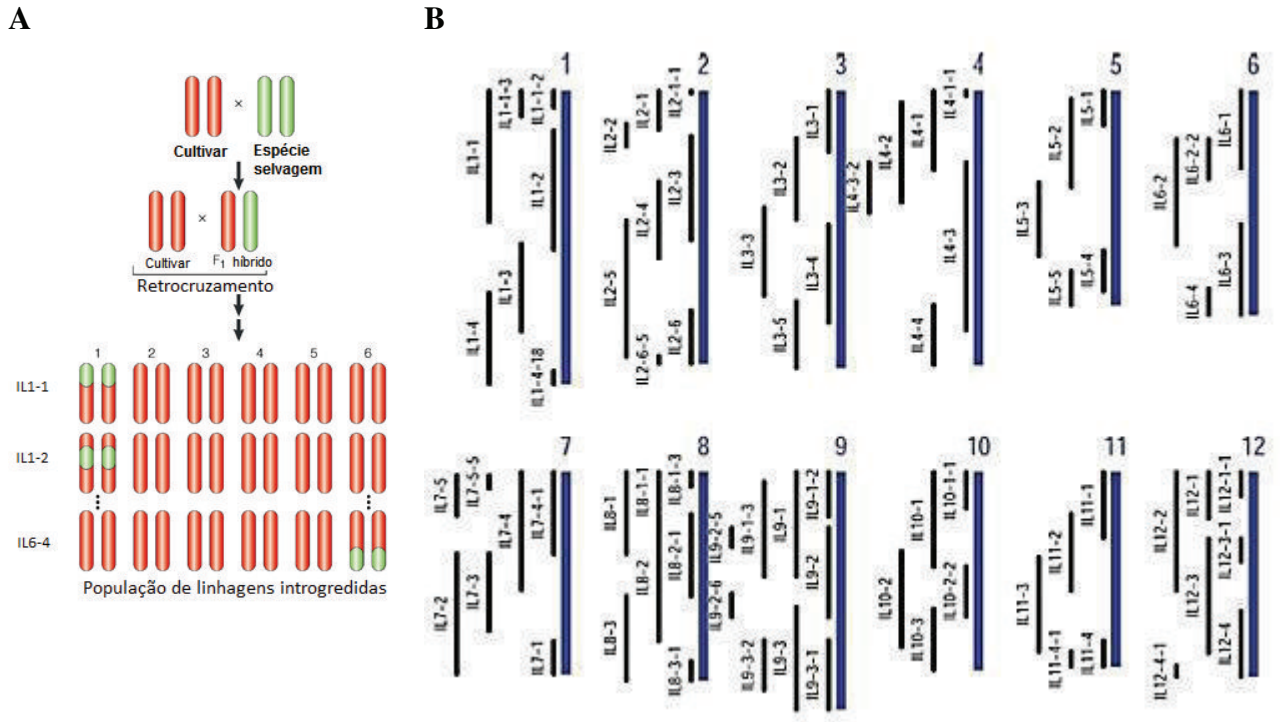


Figura 6: Representação esquemática da população de ILs de *S. pennellii* desenvolvidas por Eshed & Zamir (1995). (A) Obtenção das ILs. O esquema mostra um exemplo de três IL para os cromossomos 1 e 6. As ILs foram obtidas por meio de sucessivos retrocruzamentos e seleção assistida por marcadores moleculares, seguido de duas gerações de autofecundação para obtenção dos fragmentos em homozigose. Adaptado de Zamir (2001). (B) Coleção das ILs que recobrem o genoma de *S. lycopersicum* em linhas pretas. As linhas azuis correspondem aos cromossomos. Adaptado de Lippman *et al.* (2007).

6. A regulação da vitamina E em tomateiro: antecedentes e construção das hipóteses de trabalho

Diferentemente dos estudos que realizaram perfis metabólicos extensivos em frutos das ILs por técnicas de alto rendimento mapeando dezenas de metabólitos simultaneamente (Schauer *et al.*, 2006; Perez-Fons *et al.*, 2014), nosso grupo investigou detalhadamente o perfil das quatro espécies genômica dos *loci* relacionados à biossíntese de tocoferol. As variações encontradas permitiram mapear 12 QTL para o conteúdo de tocoferol em tomateiro. A análise integrada dos dados metabólicos, genômicos e genéticos levou a proposição de 16 *loci* candidatos que poderiam explicar as mudanças no conteúdo de tocoferóis observadas (Almeida *et al.*, 2011) (Figura 7). Em conjunto, os resultados obtidos pelo grupo representam uma vasta plataforma de dados para exploração dos componentes genéticos envolvidos na determinação da variação natural do conteúdo de VTE.

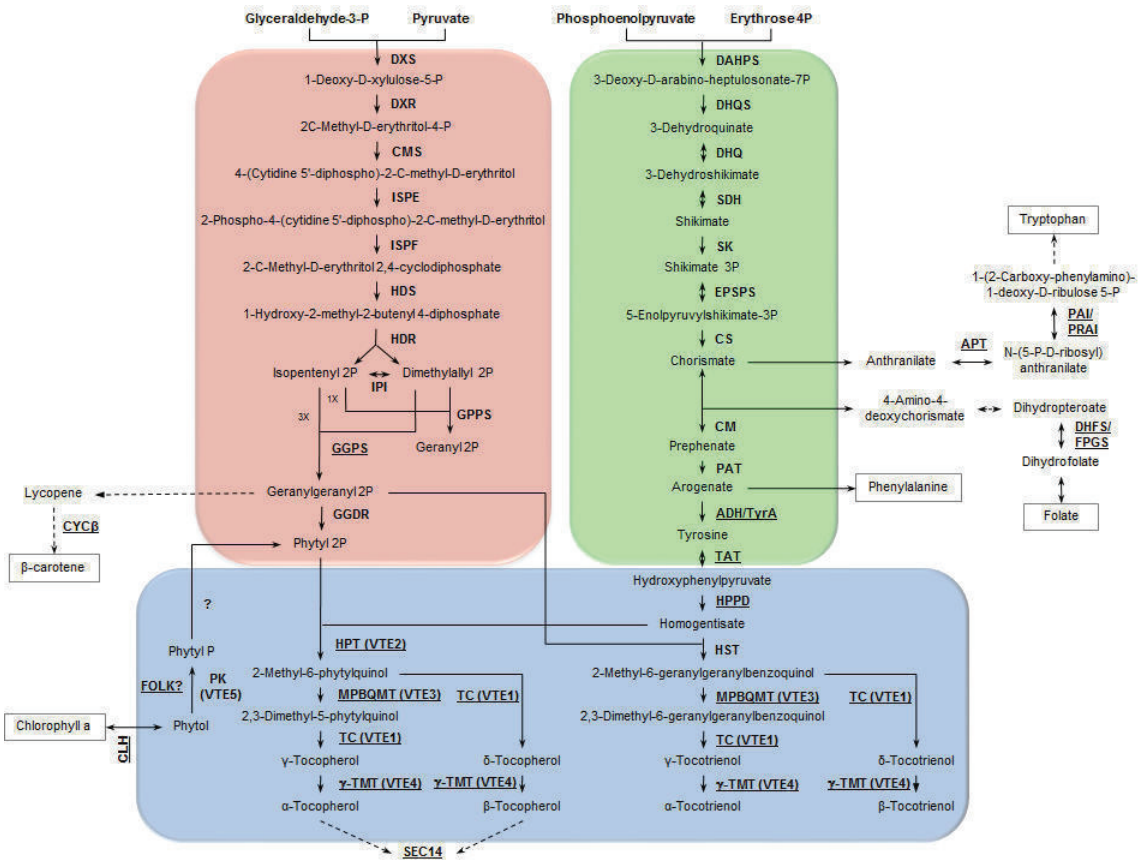


Figura 7: Mapa da biossíntese de VTE e genes candidatos identificados para QTL associados ao conteúdo de VTE em frutos de tomate. As rotas de síntese de MEP, SK e central de tocoferol estão destacadas em vermelho, verde e azul, respectivamente. Genes candidatos encontram-se sublinhados. Os genes que codificam para as enzimas estão nomeados de acordo às seguintes abreviações: *1-DEOXI-D-XILULOSE-5-P SINTASE (DXS), 2-C-METIL-D- ERITRITOL 4-FOSFATO SINTASE (DXR), 2-C-METIL-D- ERITRITOL 4-FOSFATO CITIDILILTRANSFERASE (CMS), 4-(CITIDINA 5'-DIFOSFO)-2-C-METIL-D-ERITRITOL QUINASE (ISPE), 2-C-METIL-D-ERITRITOL 2,4-CICLODIFOSFATO SINTASE (ISPF), 4-HIDROXI-3-METILBUT-2-ENIL- DIFOSFATO SINTASE (HDS), 4-HIDROXI-3-METILBUT-2-ENIL- DIFOSFATO REDUTASE (HDR), ISOPENTENIL DIFOSFATO ISOMERASE (IPI), GERANIL DIFOSFATO SINTASE (GPPS), GERANILGERANIL DIFOSFATO SINTASE (GGPS), GERANILGERANIL REDUTASE (GGDR), 3-DEOXI-D-ARABINO-HEPTULOSONATO-7-P SINTASE (DAHPS), 3-DEHIDROQUINATO SINTASE (DHQS), CHIQUIMATO DEHIDROGENASE (SDH)/ 3-DEHIDROQUINATO DEHIDRATSE (DHQ), CHIQUIMATO QUINASE (SK), 5-ENOLPIRUVILCHIQUIMATO-3-P SINTASE (EPSPS), CORISMATO SINTASE (CS), CORISMATO MUTASE (CM), PREFENATO AMINOTRANSFERASE (PAT), AROGENATO DEHIDROGENASE (ADH), TIROSINA AMINOTRANSFERASE (TAT),* 4-*HIDROXIFENILPIRUVATO DIOXIGENASE1* (*HPPD*), *TOCOFEROL CICLASE* (*VTE1*), *HOMOGENTISATO FITIL TRANSFERASE (VTE2), DIMETIL-FITILQUINOL METIL TRANSFERASE (VTE3), γ-TOCOFEROL C-METIL TRANSFERASE (VTE4), FITOL QUINASE (VTE5), FARNESOL QUINASE (FOLK), CLOROFILASE (CLH), LICOPENO β CICLASE* (*CYCβ*), *FOSFORIBOSILANTRANILATO ISOMERASE* (*PAI*), *DIHIDROFOLATO SINTASE* (*DHFS*), *ANTRANILATO FOSFORRIBOSILTRANSFERASE (APT)*. Adaptado de Almeida *et al.* (2011).

Considerando a intensa degradação de clorofila que o fruto de tomate sofre durante o amadurecimento, os genes codificantes para clorofilase (CLH, Solyc06g053980) e a farnesol quinase (FOLK, antigo VTE5, Solyc09g018510), que são enzimas envolvidas no metabolismo do fitol, destacaram-se como interessantes candidatos associados aos QTL dos cromossomos 6 e 9, respectivamente.

Até recentemente, a CLH era a única enzima conhecida responsável pela defitilação da clorofila, evento inicial da degradação do pigmento. No entanto, ausência de correlação dos

transcritos e da atividade enzimática durante o processo de senescência em várias espécies, incluindo *Arabidopsis*, além um cenário incoerente quanto à localização subcelular sugeriam a existência de vias alternativas para degradação da clorofila (Amir-Shapira et al., 1987; Yamauchi et al., 1991; Matile et al., 1996; Fang et al., 1998; Takamiya et al., 2000; Schenk et al., 2007). A identificação da feofitinase (PPH), enzima defitiladora protagonista durante o processo de senescência foliar, resolveu a questão parcialmente (Schelbert *et al.*, 2009). Não obstante, a regulação do catabolismo de clorofila ainda não foi completamente elucidada e o cenário emergente aponta para um processo complexo. Em contrapartida à *Arabidopsis*, outros trabalhos suportam o envolvimento das CLHs na defitilação da clorofila em outras espécies, como *Brassica oleracea* e *Citrus,* durante o processo de desverdecimento de inflorescência e do amadurecimento de frutos induzido por etileno (Harpaz-Saad *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008). Em tomateiro, Guyer *et al.* (2014) recentemente mostraram que, em linhagens transgênicas silenciadas para *PPH,* embora a degradação de clorofila esteja comprometida durante a foliar senescência, os frutos ainda são capazes de degradar clorofila durante o amadurecimento. Os resultados sugerem a participação de outras hidrolases na defitilação da clorofila em frutos como as clorofilases ou outra(s) hidrolase(s) ainda não identificada(s) (Guyer *et al.*, 2014). Com a finalização do genoma de *S. lycopersicum,* nosso grupo identificou quatro genes parálogos codificantes para CLHs (Lira *et al.*, 2014) localizados no cromossomo 6 (*SlCLH1*), 9 (*SlCLH2* e *SlCLH3*) e 12 (*SlCLH4*). O gene candidato do cromossomo 6 descrito por Almeida *et al.* (2011) corresponde a *SlCLH1*; por sua vez, *SlCLH2* colocaliza com o QTL descrito para VTE no cromossomo 9. A relevância biológica dessas enzimas para a fisiologia de tomateiro ainda não está esclarecida. Ainda que sua atividade seja prescindível para o processo de senescência foliar, CLHs poderiam participar da quebra da clorofila durante o amadurecimento ou, ainda, estariam envolvidas no *turnover* da clorofila em tecidos fotossinteticamente ativos.

Valentin *et al.* (2006) caracterizaram funcionalmente o gene At5g04490 como uma VTE5 e identificaram um putativo parálogo, At5g58560. Baseado na homologia com esse último, o *locus* candidato FARNESOL QUINASE (*FOLK*, Solyc09g018510) do cromossomo 9 foi inicialmente anotado como *VTE5* em Almeida *et al.* (2011). Diante de evidências experimentais posteriores, que demonstraram que At5g58560 codifica para FOLK em *Arabidopsis* (Fitzpatrick *et al.*, 2011), a anotação do gene candidato de tomateiro foi atualizada, assim como identificado o respectivo gene codificante para VTE5 no genoma de *S. lycopersicum* (Solyc03g071720). Entretanto, vale ressaltar que a predição *in silico* da localização subcelular da proteína FOLK de *S. lycopersicum* sugere o direcionamento para o cloroplasto (Almeida *et al.*, 2011). Tal constatação diverge das evidências reportadas na literatura; a atividade farnesol kinase é verificada, principalmente, na fração microsomal da célula vegetal (Thai *et al.*, 1999). Dessa maneira, se FOLK é direcionada ao

cloroplasto em tomateiro, eventualmente, poderia contribuir para fosforilação do fitol e, consequemente com a síntese de tocoferóis.

É na perspectiva de melhor compreender como ocorre a regulação da da biossíntese de VTE em tomateiro que esta tese se insere. Apresenta-se, primeiramente, uma análise detalhada do perfil transcricional dos genes associados à biossíntese de VTE nas seguintes condições: ao longo do desenvolvimento de folhas e frutos de tomateiro, nas ILs de *S. pennellii* que apresentam aumento no conteúdo de tocoferóis, e nos frutos de mutantes de tomateiro deficientes nos processos de amadurecimento e de degradação da clorofila. Tal proposta sustenta-se sob a hipótese de que alterações na abundância desses transcritos, causadas tanto pelo controle endógeno, quanto pela presença de variantes alélicas, modulam o acúmulo de VTE em tomateiro. Por fim, um estudo aprofundado do metabolismo do fitol é apresentado por meio da caracterização funcional dos genes codificantes para *VTE5, CLH1* e *FOLK*. Neste caso, considera-se que tais fatores são relevantes para o controle dos níveis de tocoferol, principalmente em fruto, uma vez que neste órgão ocorre significativa quebra de clorofila durante o processo de amadurecimento. Os resultados obtidos constituem um avanço expressivo no conhecimento dos mecanismos que regulam o acúmulo de VTE, além de expor inúmeras conexões entre o metabolismo de tocoferol e outras vias metabólicas que impactam a fisiologia de *S. lycopersicum*.

7. Referências bibliográficas

Abushita, A. A., Hebshi, E. A., Daood, H. G., Biacs, P. A. (1997) Determination of antioxidant vitamins in tomatoes. *Food Chemistry,* 60, 207–212.

Adato, A., Mandel, T., Mintz-Oron, S., Venger, I., Levy, D., Yativ, M., *et al.* (2009) Fruit-surface flavonoid accumulation in tomato is controlled by a SLMYB12-regulated transcriptional network. *PLoS Genetics*, 5, e1000777.

Almeida, J., Quadrana, L., Asis, R., Setta, N., de Godoy, F., Bermudez, L., Otaiza, S., *et al.* (2011) Genetic dissection of vitamin E biosynthesis in tomato. *Journal of Experimental Botany,* 62, 3781–3798.

Alseekh, S., Tohge, T., Wendenberg, R., Scossa, F., Omranian, N., Li, J., *et al.* (2015) Identification and Mode of Inheritance of Quantitative Trait Loci for Secondary Metabolite Abundance in Tomato. *The Plant Cell*, 27, 485-512.

Amir-Shapira, D., Goldschmidt, E. E., Altman, A. (1987) Chlorophyll catabolism in senescing plant tissues: *In vivo* breakdown intermediates suggest different degradative pathways for *Citrus* fruit and parsley leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *84*, 1901–1905.

Asensi-Fabado, M. A., Ammon, A., Sonnewald, U., Munné-Bosch, S., Voll, L.M. (2014) Tocopherol deficiency reduces sucrose export from salt-stressed potato leaves independently of oxidative stress and symplastic obstruction by callose. *Journal of Experimental Botany*, 66, 957–971.

Barone, A., Chiusano, M. L., Ercolano, M. R., Giuliano, G., Grandillo, S., Frusciante, L. (2008) Structural and functional genomics of tomato. *International Journal of Plant Genomics*, 2008, 820274.

Beecher, G. R. (1998) Nutrient content of tomatoes and tomato products. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 218, 98-100.

Besagni, C., Kessler, F. (2013) A mechanism implicating plastoglobules in thylakoid disassembly during senescence and nitrogen starvation. *Planta*, 237, 463–470.

Bian, W., Barsan, C., Egea, I., Purgatto, E., Chervin, C., Zouine, M., Latché, A., *et al*. (2011) Metabolic and molecular events occurring during chromoplast biogenesis. *Journal of Botany*, 11, 1-13.

Block, A., Fristedt, R., Rogers, S., Kumar, J., Barnes, B., Barnes, J., *et al*. (2013) Functional Modeling Identifies Paralogous Solanesyl Diphosphate Synthases that Assemble the Side Chain of Plastoquinone-9 in Plastids. *The Journal of Biological Chemistry*, 288, 27594–27606.

Bolger, A., Scossa, F., Bolger, M. E., Lanz, C., Maumus, F., Tohge, T., Quesneville, H., *et al*. (2014) The genome of the stress-tolerant wild tomato species *Solanum pennellii. Nature Genetics*, 46, 1034–1038.

Bréhélin C., Kessler F., van Wijk, K.J. (2007) Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids. *Trends in Plant Science*, 12, 260–266.

Cardenas, E., Ghosh, R. (2013) Vitamin E: a dark horse at the crossroad of cancer management. *Biochemical Pharmacology*, 86, 845-852.

Chen, L. F. O., Lin, C. H., Kelkar, S. M., Chang, Y. M., Shaw, J. F. (2008) Transgenic broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) with antisense chlorophyllase (BoCLH1) delays postharvest yellowing. *Plant Science,* 174, 25–31.

Cheng, Z., Sattler, S., Maeda, H., Sakuragi, Y., Bryant, D. A., DellaPenna, D. (2003) Highly divergent methyltransferases catalyze a conserved reaction in tocopherol and plastoquinone synthesis in cyanobacteria and photosynthetic eukaryotes. *The Plant Cell*, 15, 2343–2356.

Chitwood, D. H., Kumar, R., Headland, L. R., Ranjan, A., Covington, M. F., Ichihashi, Y., *et al*. (2013) A quantitative genetic basis for leaf morphology in a set of precisely defined tomato introgression lines. *Plant Cell*, 25, 2465–2481.

Chun, J., Lee, J., Ye, L., Exler, J., Eitenmiller, R.R. (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.

Collakova, E., DellaPenna, D. (2003a) The role of homogentisate phytyltransferase and other tocopherol pathway enzymes in the regulation of tocopherol synthesis during abiotic stress. *Plant Physiology*, 133, 930–940.

Collakova, E., DellaPenna, D. (2003b) Homogentisate phytyltransferase activity is limiting for tocopherol biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology,* 131, 632–642.

DellaPenna, D., Last, R.L. (2006) Progress in the dissection and manipulation of plant vitamin E biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 126, 356–368.

DellaPenna, D., Pogson, B.J. (2006) Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 711–738.

DellaPenna, D., Mène-Saffrané, L. (2011).Vitamin E in Biosynthesis of vitamins in plants. *Advances in Botanical Research,* 59, 179-227.

Di Mascio, P., Devasagayam, T.P., Kaiser, S., Sies, H. (1990) Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. *Biochemical Society Transactions*, 18, 1054–1056.

Dörmann, P. (2007) Functional diversity of tocochromanols in plants. *Planta*, 225, 269–276.

Dwiyanti, M. S., Yamada, T., Sato, M., Abe, J., Kitamura, K. (2011) Genetic variation of γ-tocopherol methyltransferase gene contributes to elevated α-tocopherol content in soybean seeds. *BMC Plant Biology*, 11, 152.

Enfissi, E. M. A., Barneche, F., Ahmed, I., Lichtlé, C., Gerrish, C., McQuinn, R. P., *et al*. (2010) Integrative transcript and metabolite analysis of nutritionally enhanced DE-ETIOLATED1 downregulated tomato fruit. *The Plant Cell*, 22, 1190–1215.

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.

Eugeni-Piller, L., Glauser, G., Kessler, F., Besagni, C. (2014) Role of plastoglobules in metabolite repair in the tocopherol redox cycle. *Frontiers in Plant Science*, 5, 298.

Evans, H. M., Bishop, K. S. (1922) On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science*, 56, 650–651.

Falk, J., Andersen, G., Kernebeck, B., Krupinska, K. (2003) Constitutive overexpression of barley 4–hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in tobacco results in elevation of the vitamin E content in seeds but not in leaves. *FEBS Letters*, 540, 35–40.

Falk, J., Munne-Bosch, S. (2010) Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. *Journal of Experimental Botany,* 61, 1549–1566.

Fang, Z., Bouwkamp, J. C., Solomos, T. (1998) Chlorophyllase activities and chlorophyll degradation during leaf senescence in non-yellowing mutant and wild type of *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Experimental Botany*, 49, 503–510.

Fernie, A. R., Schauer, N. (2009) Metabolomics-assisted breeding: A viable option for crop improvement? *Trends Genetics*, 25, 39–48.

Fernie, A. R., Klee, H. J. (2011) The use of natural genetic diversity in the understanding of metabolic organization and regulation. *Frontiers in Plant Science*, 2, 59.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. Tomato production. http://faostat.fao.org/ (2013). Data de acesso 20/05/15.

Fitzpatrick, A. H., Bhandari, J., Crowell, D. N. (2011) Farnesol kinase is involved in farnesol metabolism, ABA signaling and flower development in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 66, 1078–1088.

Fitzpatrick, T. B., Basset, G. J. C., Borel, P., Carrari, F., DellaPenna, D., Fraser, P. D., *et al*. (2012) Vitamin Deficiencies in Humans: Can Plant Science Help? *The Plant Cell Online*, 24, 395–414.

Fraser, P. D., Enfissi, E. M. A, Halket, J. M., Truesdale, M. R., Yu, D., Gerrish, C., Bramley, P. M. (2007) Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: effects on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism. *The Plant Cell*, 19, 3194–3211.

Foyer, C.H., Noctor, G. (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, 17, 1866–1875.

Fujisawa, M., Nakano, T., Shima, Y., Ito, Y. (2013) A large-scale identification of direct targets of the tomato MADS Box transcription factor RIPENING INHIBITOR reveals the regulation of fruit ripening. *The Plant Cell*, 25, 371–386.

Fukuzawa, K., Matsuura, K., Tokumura, A., Suzuki, A., Terao, J. (1997) Kinetics and dynamics of singlet oxygen scavenging by alpha-tocopherol in phospholipid model membranes. *Free Radical Biology and Medicine*, 22, 923–930.

Gillaspy, G., Ben-David, H., Gruissem, W. (1993) Fruits: a developmental perspective. *The Plant Cell*, 5, 1439–1451.

Gilliland, L. U., 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 of the United States of America*, 103, 18834–18841.

Giovannoni, J. J. (2004) Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. *The Plant Cell,* 16, 170–181.

Giovannoni, J. J. (2007). Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 283–289.

Grusak, M. A., DellaPenna, D. (1999) Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 133–161.

Guyer, L., Schelbert H. S., Christ, B., Lira, B. S., Rossi, M., Hörtensteiner, S. (2014) Different mechanisms are responsible for chlorophyll dephytylation during fruit ripening and leaf senescence in tomato. *Plant Physiology,* 166, 44-56.

Haddadi, P., Ebrahimi, A., Langlade, N. B., Yazdi-samadi, B., Berger, M., Calmon, A., *et al*. (2012) Genetic dissection of tocopherol and phytosterol in recombinant inbred lines of sunflower through quantitative trait locus analysis and the candidate gene approach. *Molecular Breeding*, 29, 717–729.

Harpaz-Saad, S., Azoulay, T., Arazi, T., Ben-Yaakov, E., Mett, A., Shiboleth, Y.M., *et al*. (2007) Chlorophyllase is a rate-limiting enzyme in chlorophyll catabolism and is posttranslationally regulated. *The Plant Cell*, 19, 1007–1022.

Havaux, M., Eymery, F., Porfirova, S., Rey, P., Dörmann, P. (2005) Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell*, 17, 3451–3469.

Havaux, M., García-Plazaola, J.I. (2014). Beyond non-photochemical fluorescence quenching: the overlapping antioxidant functions of zeaxanthin and tocopherols. Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria. *Advances in Photosynthesis and Respiration. Springer Netherlands*, 583-603.

Hofius, D., Hajirezaei, M.-R., Geiger, M., Tschiersch, H., Melzer, M., Sonnewald, U. (2004) RNAi-mediated tocopherol deficiency impairs photoassimilate export in transgenic potato plants. *Plant Physiology*, 135, 1256–1268.

Hormaetxe, K., Esteban, R., Becerril, J. M., García-Plazaola, J. I. (2005) Dynamics of the α-tocopherol pool as affected by external (environmental) and internal (leaf age) factors in Buxus sempervirens leaves. *Physiologia Plantarum*, 125, 333–344.

Hunter, S. C., Cahoon, E. B. (2007) Enhancing vitamin E in oilseeds: Unraveling tocopherol and tocotrienol biosynthesis. *Lipids*, 42, 97–108.

Ischebeck, T., Zbierzak, A. M., Kanwischer, M., Dörmann, P. (2006) A salvage pathway for phytol metabolism in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 2470–2477.

Kaiser, S., Di Mascio, P., Murphy, M. E., Sies, H. (1990) Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 277, 101–108.

Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L. A. (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31, 671–701.

Karunanandaa, B., Qi, Q., Hao, M., Baszis, S. R., Jensen, P. K., Wong, Y. H. H., *et al*. (2005) Metabolically engineered oilseed crops with enhanced seed tocopherol. *Metabolic Engineering*, 7, 384–400.

Karlova, R., Rosin, F. M., Busscher-Lange, J., Parapunova, V., Do, P. T., Fernie, A. R., et al. (2011) Transcriptome and metabolite profiling show that APETALA2a is a major regulator of tomato fruit ripening. *The Plant Cell*, 23, 923–941.

Klee, H. J., Giovannoni, J. J. (2011) Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annual Review of Genetics*, 45, 41–59.

Kobayashi, N., DellaPenna, D. (2008) Tocopherol metabolism, oxidation and recycling under high light stress in Arabidopsis. *The 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., Szymańska, R., Cela, J., Munne-Bosch, S. (2014) Plastochromanol-8: Fifty years of research. *Phytochemistry*, 108, 9–16.

Kushi, L. H., Folsom, A. R., Prineas, R. J., Mink, P. J., Wu, Y., Bostic, R. M. (1996) Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *New England Journal of Medicine*, 334, 1156–1162.

Lichtenthaler, H.K. (2007) Biosynthesis, accumulation and emission of carotenoids, a-tocopherol, plastoquinone, and isoprene in leaves under high photosynthetic irradiance. *Photosynthesis Research*, 92, 163–179.

Lira, B. S., de Setta, N., Rosado, D., Almeida, J., Freschi, L., Rossi, M. (2014) Plant degreening: evolution and expression of tomato (*Solanum lycopersicum*) dephytylation enzymes. *Gene*, 546, 359-366.

Lipka, A. E., Gore, M. A., Magallanes-Lundback, M., Mesberg, A., Lin, H., Tiede, T., *et al*. (2013) Genome-wide association study and pathway-level analysis of tocochromanol levels in maize grain. *G3: Genes| Genomes| Genetics*, 3, 1287-1299.

Lippman, Z. B., Semel, Y., Zamir, D. (2007) An integrated view of quantitative trait variation using tomato interspecific introgression lines. *Current Opinion in Genetics & Development*, 17, 545–552.

Lundquist, P. K., Poliakov, A., Bhuiyan, N. H., Zybailov, B., Sun, Q., van Wijk, K. J. (2012) The Functional Network of the Arabidopsis Plastoglobule Proteome Based on Quantitative Proteomics and Genome-Wide Coexpression Analysis. *Plant Physiology*, 158, 1172-1192.

Maeda, H., Song, W., Sage, T. L., DellaPenna, D. (2006) Tocopherols play a crucial role in low-temperature adaptation and Phloem loading in Arabidopsis. *Plant Cell*, 18, 2710–2732.

Maeda, H., Sage, T. L., Isaac, G., Welti, R., Dellapenna, D. (2008) Tocopherols modulate extraplastidic polyunsaturated fatty acid metabolism in Arabidopsis at low temperature. *Plant Cell*, 20, 452–470.

Martel, C., Vrebalov, J., Tafelmeyer, P., Giovannoni, J. J. (2011) The tomato MADS-box transcription factor RIPENING INHIBITOR interacts with promoters involved in numerous ripening processes in a COLORLESS NONRIPENING-dependent manner. *Plant Physiology*, 157, 1568–1579.

Matile, P., Hortensteiner, S., Thomas, H., Krautler, B. (1996). Chlorophyll Breakdown in Senescent Leaves. *Plant Physiology*, 112, 1403–1409.

Miret, J. A., Munné-Bosch, S. (2015) Redox signaling and stress tolerance in plants: a focus on vitamin E. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1340, 29-38.

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., Falk, J. (2004) New insights into the function of tocopherols in plants. *Planta*, 218, 323–326.

Munné-Bosch, S. (2005) The role of α-tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 162, 743–748.

Nashilevitz, S., Melamed-Bessudo, C., Izkovich, Y., Rogachev, I., Osorio, S., Itkin, M., *et al*. (2010) An orange ripening mutant links plastid NAD(P)H dehydrogenase complex activity to central and specialized metabolism during tomato fruit maturation. *The Plant Cell*, 22, 1977–97.

Osorio, S., Scossa, F., Fernie, A. R. (2013) Molecular regulation of fruit ripening. *Frontiers in Plant Science*, 4, 198.

Peralta, I. E., Knapp, S. K., Spooner, D. M. (2005) New species of wild tomatoes (Solanum section Lycopersicon: Solanaceae) from Northern Peru. *Systematic Botany*, 30, 424–434.

Perez-Fons, L., Wells, T., Corol, D. I., Ward, J. L., Gerrish, C., Beale, M. H., *et al*. (2014) A genome-wide metabolomic resource for tomato fruit from Solanum pennellii. *Scientific Reports*, 4, 3859.

Provencher, L. M., Miao, L., Sinha, N., Lucas, W. J. (2001) Sucrose export defective1 encodes a novel protein implicated in chloroplast-to-nucleus signaling. *The Plant Cell*, 13, 1127–1141.

Quadrana, L., Rodriguez, M. C., Lopez, M., Bermudez, L. M., Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R., *et al*. (2011) Coupling virus induced gene silencing to exogenous green fluorescence protein expression provides a highly efficient system for functional genomics, in Arabidopsis and across all stages of tomato fruit development. *Plant Physiology*, 56, 1278–1291.

Rastogi, A., Yadav, D. K., Szymanska, R., Kruk, J., Sedlárová, M., Pospíšil, P. (2014) Singlet oxygen scavenging activity of tocopherol and plastochromanol in Arabidopsis thaliana: relevance to photooxidative stress. *Plant, Cell & Environment*, 37, 392–401.

Ricciarelli, R., Zingg, J., Azzi, A. (2002) The 80 th Anniversary of Vitamin E: Beyond Its Antioxidant Properties. *Biological Chemistry*, 383, 457-465.

Rippert, P., Matringe, M. (2002) Purification and kinetic analysis of the two recombinant arogenate dehydrogenase isoforms of Arabidopsis thaliana. *European Journal of Biochemistry*, 269, 4753–4761.

Rippert, P., Scimemi, C., Dubald, M. and Matringe, M. (2004) Engineering plant shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. *Plant Physiology*, 134, 92–100.

Rise, M., Cojocaru, M., Gottlieb, H. E., Goldschmidt, E. E. (1989) Accumulation of a-Tocopherol in Senescing Organs as Related to Chlorophyll Degradation. *Plant Physiology*, 89, 1028-1030.

Rothan, C., Causse, M. (2007) Natural and artificially induced genetic variability in crop and model plant species for plant systems biology. *Plant Systems Biology*, 97, 21-53.

Sanders, S. K., Morgan, J. B., Wulf, D. M., Tatum, J. D., Williams, S. N., Smith, G. C. (1997) Vitamin E supplementation of cattle and shelf-life of beef for the Japanese market. *Journal of Animal Science*, 75, 2634–2640.

Sattler, S. E., Gilliland, L. U., Magallanes-lundback, M., Pollard, M., Dellapenna, D. (2004) Vitamin E Is Essential for Seed Longevity and for Preventing Lipid Peroxidation during Germination. *The Plant Cell*, 16, 1419–1432.

Schauer, N., Zamir, D., Fernie, A. R. (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.

Schauer, N., Semel, Y., Roessner, U., Gur, A., Balbo, I., Carrari, F., *et al*. (2006) Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nature Biotechnology*, 24, 447–54.

Schenck, C. A., Chen, S., Siehl, D. L., Maeda, H. A. (2014) Non-plastidic, tyrosine-insensitive prephenate dehydrogenases from legumes. *Nature Chemical Biology*, 11, 52–57.

Schenk, N., Schelbert, S., Kanwischer, M., Goldschmidt, E. E., Dörmann, P., Hörtensteiner, S. (2007). The chlorophyllases AtCLH1 and AtCLH2 are not essential for senescence-related chlorophyll breakdown in Arabidopsis thaliana. *FEBS Letters*, 581, 5517–5525.

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 Radical Biology and Medicine*, 10, 263–275.

Seo, Y. S., Kim, S. J., Harn, C. H., Kim, W. T. (2011) Ectopic expression of apple fruit homogentisate phytyltransferase gene (MdHPT1) increases tocopherol in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) leaves and fruits. *Phytochemistry*, 72, 321–329.

Seymour, G. B., Østergaard, L., Chapman, N. H., Knapp, S., Martin, C. (2013) Fruit development and ripening. *The Annual Review of Plant Biology*, 64, 219–241.

Schelbert, S., Aubry, S., Burla, B., Agne, B., Kessler, F., Krupinska, K., Hörtensteiner, S. (2009) Pheophytin pheophorbide hydrolase (pheophytinase) is involved in chlorophyll breakdown during leaf senescence in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21, 767–785.

Shibata, D. (2005) Genome sequencing and functional genomics approaches in tomato. *Journal of General Plant Pathology*, 71, 1–7.

Shintani, D., DellaPenna, D. (1998) Elevating the vitamin E contente of plants through metabolic engineering. *Science*, 282, 2098–2100.

Shutu, X., Dalong, Z., Ye, C., Yi, Z., Shah, T., Ali, F., *et al*. (2012) Dissecting tocopherols content in maize (Zea mays L.), using two segregating populations and high-density single nucleotide polymorphism markers. *BMC Plant Biology*, 12, 201.

Soll, J., Schultz, G., Joyard, J., Douce, R., Block, M.A. (1985) Localization and synthesis of prenylquinones in isolated outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 238, 290–299.

Steinhauser, M., Steinhauser, D., Gibon, Y., Bolger, M., Arrivault, S., Usadel, B., *et al*. (2011) Identification of enzyme activity quantitative trait loci in a *Solanum lycopersicum* x *Solanum pennellii* introgression line population. *Plant Physiology*, 157, 998–1014.

Stitt, M., Sulpice, R., Keurentjes, J. (2010) Metabolic networks: how to identify key components in the regulation of metabolism and growth? *Plant Physiology*, 152, 428–444.

Thai, L., Rush, J. S., Maul, J. E., Devarenne, T., Rodgers, D. L., Chappell, J., Waechter, C. J. (1999) Farnesol is utilized for isoprenoid biosynthesis in plant cells via farnesyl pyrophosphate formed by successive monophosphorylation reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 13080–13085.

Takamiya, K. I., Tsuchiya, T., Ohta, H. (2000) Degradation pathway(s) of chlorophyll: what has gene cloning revealed? *Trends in Plant Science*, 5, 426–43.

Tomato Genome Consortium. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485, 635-641

Traber, M. G., Atkinson, J. (2008). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*, 43, 4-15.

Traber, M. G., Sies, H. (1996) Vitamin E in humans: demand and delivery. *Annual Review of Nutrition*, 16, 321–347.

Triantaphylidès, C., Havaux, M. (2009) Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in Plant Science*, 14, 219–228.

Tsegaye, Y., Shintani, D. K., DellaPenna, D. (2002) Overexpression of the enzyme p–hydroxyphenolpyruvate dioxygenase in Arabidopsis and its relation to tocopherol biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 913–920.

Tzin, V., Galili, G. (2010) New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Molecular Plant*, 3, 956–972.

Valentin, H. E., Lincoln, K., Moshiri, F., Jensen, P. K., Qi, Q., Venkatesh, T. V., *et al*. (2006) The Arabidopsis vitamin E pathway gene5-1 mutant reveals a critical role for phytol kinase in seed tocopherol biosynthesis. *The Plant Cell*, 18, 212–224.

Van Eenennaam, A. L., Lincoln, K., Durrett, T. P., Valentin, H. E., Shewmaker, C. K., Thorne, G. M., *et al*. (2003) Engineering vitamin E content: From Arabidopsis mutant to soy oil. *The Plant Cell*, 15, 3007–3019.

Vidi, P. A., Kanwischer, M., Baginsky, S., Austin, J. R., Csucs, G., Dörmann, P., *et al*. (2006) Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 11225–11234.

Wang, X., Zhang, C., Li, L., Fritsche, S., Endrigkeit, J., Zhang, W., *et al*. (2012) Unraveling the Genetic Basis of Seed Tocopherol Content and Composition in Rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plos One*, 7, 8–14.

Wright, M. E., Lawson, K. A., Weinstein, S. J., Pietinen, P., Taylor, P. R., Virtamo, J., *et al.* (2006) Higher baseline serum concentrations of vitamin E are associated with lower total and cause-specific mortality in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84, 1200–1207.

Yamauchi, N., Watada, A. E. (1991). Regulated Chlorophyll Degradation in Spinach Leaves during Storage. *Journal of the America Society for Horticultural Science*, 116, 58–62.

Zamir, D. (2001) Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nature Reviews Genetics*, 2, 983–989.

Zbierzak, A. M., Kanwischer, M., Wille, C., Vidi, P. A., Giavalisco, P., Lohmann, A., *et al*. (2010) Intersection of the tocopherol and plastoquinol metabolic pathways at the plastoglobule. *Biochemical Journal*, 425, 389–399.

Zhang, C., Cahoon, R. E., Hunter, S. C., Chen, M., Han, J., Cahoon, E. B. (2013) Genetic and biochemical basis for alternative routes of tocotrienol biosynthesis for enhanced vitamin E antioxidant production. *The Plant Journal*, 73, 628–39.

Zhong, S., Fei, Z., Chen, Y.-R., Zheng, Y., Huang, M., Vrebalov, J., *et al.* (2013) Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening. *Nature Biotechnology*, 31, 154–159.

OBJETIVOS

O presente trabalho visa aprofundar o conhecimento sobre a regulação da rota biossintética de vitamina E em tomateiro. Para tanto, elegeram-se duas estratégias, em essência, com base no conjunto de dados prévios estabelecidos por Almeida *et al.* (2011). Na primeira, investigou-se a associação entre a regulação transcricional dos genes envolvidos na biossíntese de tocoferol e o acúmulo desse antioxidante a partir de duas perspectivas: à luz do desenvolvimento de tomateiro e da variação alélica natural presente tanto nas linhagens introgredidas de *S. pennellii,* quanto em mutantes de tomateiro deficientes nos processos de amadurecimento e de degradação da clorofila. Na segunda abordagem, elegeu-se o metabolismo do fitol como foco para a manipulação metabólica, circunscrevendo, em particular, os papéis desempenhados por VTE5, FOLK e CLH(1). Dessa maneira, buscou-se compreender o papel da reciclagem do fitol provindo da degradação de clorofila no suprimento da cadeia isoprênica para síntese de tocoferóis e sua relação com as demais vias metabólicas plastidiais em folhas e em frutos de tomateiro. Formulado nesses termos, para o desenvolvimento deste trabalho foram propostos os seguintes objetivos:

i. Estudar a regulação transcricional da rota biossintética de tocoferóis (Capítulo I).
ii. Analisar o perfil transcricional dos genes associados à biossíntese de VTE em linhagens introgredidas (IL) que apresentam aumento no conteúdo de tocoferóis (Capítulo II).
iii. Estudar a contribuição dos genes *CLOROFILASE 1*, *FARNESOL QUINASE* e *FITOL QUINASE* no conteúdo de tocoferóis em frutos de tomateiro via silenciamento gênico induzido por vírus (Capítulo III).
iv. Avaliar o conteúdo de tocoferóis em mutantes de tomateiro deficientes no amadurecimento de fruto, na degradação de clorofila e na percepção de ácido jasmônico (Capítulo IV).
v. Caracterizar funcionalmente o gene *CLOROFILASE 1* (Capítulo V).
vi. Caracterizar funcionalmente o gene *FITOL QUINASE* (Capítulo VI).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho teve como propósito aprofundar o conhecimento sobre a regulação da rota biossintética de vitamina E em tomateiro. Os resultados apresentados estabelecem inúmeras relações entre tocoferóis e o restante do metabolismo vegetal e assinalam os muitos aspectos ainda por serem resolvidos que estão sob foco de pesquisa atual. Todavia, os esforços realizados ao longo dos seis capítulos ampliam não só a compreensão dos mecanismos regulatórios centrados na transcrição e sua resposta ao desenvolvimento e a perturbações causadas pela presença de variantes alélicas, mas também do controle do metabolismo celular. Consequentemente, tal constatação implica que as mudanças nos níveis de tocoferóis podem ser percebidas pelo organismo vegetal e disparam mecanismos adaptativos nas células.

Sob a perspectiva metodológica, primeiramente, fez-se necessário o estabelecimento de uma plataforma analítica para avaliação do perfil transcricional dos genes envolvidos na biossíntese de tocoferóis, o *array* de qPCR para VTE. O ponto de partida foi a sistemática caracterização *in silico* desses genes realizada anteriormente pelo nosso grupo (Almeida *et al.*, 2011). De fato, a eficiência dessa plataforma, alcançada pelo criterioso desenho experimental implementado, possibilitou a análise de perfis transcricionais, completos ou parciais, em todas as situações experimentais apresentadas (Capítulo I a VI). Os dados de expressão gênica juntamente com os perfis de tocoferóis e outros metabólitos foram analisados, nos Capítulos I e IV, à luz de métodos de inferência de redes regulatórias, as quais resultaram muito informativas e expuseram pontos chaves do metabolismo. Em segundo lugar, destaca-se a diversidade de genótipos de tomateiro utilizados aqui como material vegetal, incluindo desde a planta cultivada "selvagem" ao longo de diferentes estádios do desenvolvimento, passando por linhagens introgredidas, por mutantes naturais monogênicos - deficientes no amadurecimento, na degradação de clorofila e na percepção ao ácido jasmônico – e oriundos de população mutageneizada com EMS, até linhagens transgênicas silenciadas. Essa abordagem permitiu observar recorrências e especificidades da regulação da biossíntese de VTE nos diferentes tipos celulares/teciduais. O segundo ponto, por conseguinte, entrelaça-se com o terceiro: esta tese valeu-se da riqueza de métodos e recursos disponíveis para a espécie modelo *S. lycopersicum*. Nos Capítulos IV, V e VI, as linhagens transgênicas e os mutantes analisados estão em fundo genético da variedade anã Micro-Tom, que apresenta vantagens de tamanho reduzido e ciclo de vida curto. Para manipulação genética, fez-se uso tanto da técnica de VIGS - opção para análise do silenciamento gênico transiente e circunscrito ao fruto - quanto da transformação genética estável sob controle do promotor 35S, nesse caso, para avaliar o efeito no organismo como um todo. Por fim,

o genoma completo de tomateiro teve papel decisivo em tornar completo o cenário referente a VTE5 e CLH, identificando os respectivos parálogos.

Convém mencionar, diante da relevância das vias metabólicas abordadas – MEP, SK, clorofila, prenilquinonas, carotenóides, ésteres de fitol – no contexto da Biologia Vegetal, que os sucessivos avanços dos últimos anos foram gradativamente incorporados nas análises realizadas. Em particular, salientam-se as descobertas reportadas na literatura para as etapas iniciais da degradação da clorofila, incluindo as informações referentes às proteínas STAYGREEN (SGR) e FEOFITINASE (PPH). Especificamente, durante a elaboração dessa tese, destacam-se as publicações que reavaliaram a função defitiladora das CLH *in planta*, especialmente em *Arabidopsis*: na homeostase da clorofila (Lin *et al.*, 2014), no desverdecimento das sementes e subsequente suprimento para tocoferol (Zhang *et al.*, 2015), e na degradação da clorofila que ocorre durante o colapso celular frente à situação de herbivoria (Hu *et al.*, 2015). Apenas para este último fenômeno houve evidências contundentes sobre a participação da CLH, sobretudo como componente de um sistema de defesa contra herbivoria. Por conseguinte, em *Arabidopsis*, CLH não participa da quebra da clorofila em tecidos íntegros. Do mesmo modo, considerando os resultados aqui obtidos (Capítulo III e V), em contrapartida ao amadurecimento induzido por etileno em flavedo de *Citrus*, CLH(1) parece não contribuir para a degradação de clorofila em pericarpo de frutos de tomate. Com efeito, não se pode descartar por completo o papel das demais CLHs codificadas pelos genes parálogos. Perante esses resultados, parece pouco provável que esse gene tenha influência direta na determinação do QTL para VTE descrito na IL6-1 (Capítulo II), ainda que o $e\mathrm{QTL}_{CLH(1)}$ tenha sido identificado. Entretanto, considerando a localização extra-plastidial das CLHs e os perfis de expressão dos genes *CLH* (Lira *et al.*, 2014), uma hipótese a ser testada seria seu envolvimento na degradação de clorofila presente no parênquima gelatinoso dentro da cavidade locular do fruto de tomate, uma vez que esse tecido sofre degeneração ao longo do amadurecimento. Para tanto, seria interessante obter plantas deficientes para os dois genes parálogos com expressão relevante em fruto, *CLH(1)* e *CLH(4).* Por outro lado, se as CLHs estão envolvidas no sistema de defesa contra herbivoria em folhas de tomateiro, também necessita ser demonstrado.

O uso da diversidade natural e da transgênese para supressão da ativação do fitol oriundo da degradação da clorofila revelaram importantes pontos regulatórios: (i) como a transcrição pode responder a perturbações nos metabólitos da via; e (ii) como a alteração na alocação de precursores modulam os influxos de intermediários entre as vias biossintéticas (*i.e.* nos mutantes *rin*, *nor*, *greenflesh* e *lutescent;* nas linhagens transgênicas *SlVTE5-RNAi*), sendo os resultados, por sua vez, dependente do órgão analisado.

Uma das conclusões centrais dessa tese é que a síntese de tocoferol em tomateiro é altamente dependente do fitol liberado da clorofila, tanto durante o *turnover* nos tecidos fotossinteticamente ativos quanto em frutos durante a degradação da clorofila no decorrer do amadurecimento. Esses dados contrastam com o cenário proposto para *Arabidopsis*, na qual a via dependente de VTE5 seria predominante em sementes e, em menor grau, em folhas. Além disso, os resultados obtidos com as linhagens transgênicas *SlVTE5-RNAi* nos permitem revisitar algumas das proposições/observações feitas ao longo dessa tese. Uma delas refere-se aos mutantes *rin*, *nor* e *greenflesh*: a manutenção da síntese *de novo* de fitil-difosfato compensaria a falta do fitol proveniente da degradação de clorofila para produção de tocoferóis nos estádios finais do desenvolvimento do fruto (Capítulo IV). A relação, nesse caso, pode não ser direta. É plausível ponderar que, nesses mutantes que retêm clorofila, a sustentação da biossíntese de clorofila e seu constante *turnover* nos estágios finais do fruto produz fitol suficiente para manter os níveis de tocoferol similares às plantas selvagens. Por outro lado, à luz da importância da rota de ativação do fitol dependente de VTE5 para síntese de tocoferóis em frutos, os resultados obtidos com os experimentos de VIGS tanto para *VTE5* quanto para *FOLK* são intrigantes. Primeiro, os mutantes de *folk-1* não apresentaram a redução pequena, porém significativa, no conteúdo de tocoferóis observada no experimento de VIGS em fruto. Além disso, a ausência de atividade fitol quinase compensatória nas plantas *SlVTE5-RNAi,* contribui para descartar uma contribuição significativa, se alguma, de *FOLK* na ativação do fitol direcionado à síntese de tocoferóis. Vale mencionar que um efeito do *background* genético ocasionado pelo tratamento com EMS não pode ser desconsiderado, dado que não foram realizados retrocruzamentos sucessivos para sua eliminação nos mutantes. À parte dessa questão, o mutante *folk-1* identificado pela estratégia de TILLING constitui um material vegetal de grande valor para investigar o papel biológico da proteína FOLK em *S. lycopersicum*; a começar pela demonstração da atividade farnesol quinase. Se confirmada, uma explicação para a divergência dos resultados de localização subcelular poderia ser o duplo direcionamento ao qual esta proteína estaria submetida na célula, sendo alocada tanto nos cloroplastos quanto no retículo endoplasmático.

No caso da ausência de fenótipo nos frutos silenciados para *VTE5* por VIGS, a verificação da possibilidade de transporte de fitil difosfato entre os tecidos é reforçada, ainda que a ocorrência de compostos hidrofóbicos no ambiente aquoso do floema seja pouco conhecida. No entanto, os achados de lipídeos e proteínas ligantes de lipídeos nos exudados de floema de *Arabidopsis* demonstram a existência de um transporte de longa distância para lipídeos em plantas (Guelette *et al.*, 2012). Diante da heterogeneidade do silenciamento obtida nos experimentos de VIGS, esse sistema não resultou adequado para avaliação dessa hipótese. No entanto, a geração de plantas transgênicas silenciadas

para VTE5 sob controle específico de fruto pode fornecer informações oportunas sobre a existência de transporte da cadeia isoprênica.

Por fim, as plantas deficientes em tocoferol *SlVTE5-RNAi* representam um valioso material vegetal para investigação do papel de tocoferóis na fisiologia de tomateiro nas mais diferentes condições experimentais, pois, ao contrário da deficiência em enzimas da biossíntese como VTE1 e VTE3, não interfere no conteúdo de PQ-9 em folhas, preservando assim a cadeia de transporte de elétrons.

Referências bibliográficas

Almeida, J., Quadrana, L., Asis, R., Setta, N., de Godoy, F., Bermudez, L., Otaiza, S., *et al.* (2011) Genetic dissection of vitamin E biosynthesis in tomato. *Journal of Experimental Botany,* 62, 3781–3798.

Guelette, B. S., Benning, U. F., Hoffmann-Benning, S. (2012) Identification of lipids and lipid-binding proteins in phloem exudates from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 63, 3603–3616.

Hu, X., Makita, S., Schelbert, S., Sano, S., Ochiai, M., Tsuchiya, T., Hasegawa, S.F., *et al.* (2015) Re-examination of chlorophyllase function implies its involvement in defense against chewing herbivores. *Plant Physiology*, 167, 660-670.

Lin, Y. P., Lee, T., Tanaka, A., Charng, Y. (2014) Analysis of an *Arabidopsis* heat-sensitive mutant reveals that chlorophyll synthase is involved in reutilization of chlorophyllide during chlorophyll turnover. *The Plant Journal*, 80, 14–26.

Lira, B. S., de Setta, N., Rosado, D., Almeida, J., Freschi, L., Rossi, M. (2014) Plant degreening: evolution and expression of tomato (Solanum lycopersicum) dephytylation enzymes. *Gene*, 546, 359-366.

Zhang, W., Liu, T., Ren, G., Hörtensteiner, S., Zhou, Y., Cahoon, E. B., Zhang, C. (2014) Chlorophyll degradation: the tocopherol biosynthesis-related phytol hydrolase in arabidopsis seeds is still missing. *Plant Physiology*, 166, 70–79.

ARTIGOS PUBLICADOS

Decorrentes da publicação de capítulos da tese

Capítulo I

Quadrana, L.*, **Almeida, J.***, Otaiza, S., Duffy, T., Correa-Silva, J. V., de Godoy, F., Asís, R., Bermudez, L., Fernie, A., Carrari, F., Rossi, M. (2013). Transcriptional regulation of vitamin E biosynthesis in tomato. *Plant Molecular Biology*, 81, 309-325. * *Contribuição equivalente*.

Capítulo IV

Almeida, J., Asís, R., Molineri, V. N., Sestari, I., Lira, B. S., Carrari, F., Peres, L. E. P., Rossi, M. (2015). Fruits from ripening impaired, chlorophyll degraded and jasmonate insensitive tomato mutants have altered tocopherol content and composition. *Phytochemistry*, *111*, 72–83.

Capítulo VI

Almeida, J., Azevedo, M. S., Spicher L., Glauser, G., vom Dorp, K., Guyer, L., Carranza, A. V., Asis, R., de Souza, A. P., Buckeridge, M., Demarco, D., Bres, C., Rothan, C., Peres, L. E. P., Hörtensteiner, S., Kessler, F., Dörmann, P., Carrari, F., Rossi, M. Tocopherol content is highly dependent on *PHYTOL KINASE* in tomato (submetido).

Decorrentes de resultados da tese, mas que não formam parte dela:

Capítulo II

Quadrana, L., **Almeida, J.**, Asís, R., Duffy, T., Dominguez, P. G., Bermúdez, L., Conti, G., Correa-Silva, J. V., Peralta, I., Colot, V., Sebastian, A., Fernie, A., Rossi, M., Carrari, F. (2014). Natural occurring epialleles determine vitamin E accumulation in tomato fruits. *Nature Communications*, 5, 3027.

Decorrentes de colaboração com outros projetos do grupo de pesquisa:

Lira, B. S., de Setta, N., Rosado, D., **Almeida, J**., Freschi, L., Rossi, M. (2014). Plant degreening: evolution and expression of tomato (Solanum lycopersicum) dephytylation enzymes. *Gene*, 546, 359-366.

Bermúdez, L., de Godoy, F., Baldet, P., Demarco, D., Osorio, S., Quadrana, L., **Almeida, J.**, Asis, R., Gibon, Y., Fernie, A.R., Rossi, M., Carrari, F. (2014) Silencing of the tomato sugar partitioning affecting protein (SPA) modifies sink strength through a shift in leaf sugar metabolism. *The Plant Journal*, 77, 676-687.

de Godoy, F., Bermúdez, L., Lira, B. S., de Souza, A.P., Elbl, P., Demarco, D., Alseekh, S., Insani, M., Buckeridge, M., **Almeida, J.**, Grigioni, G., Fernie, A.R., Carrari, F., Rossi, M. (2013) Galacturonosyltransferase 4 silencing alters pectin composition and carbon partitioning in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 64, 2449-2466.