DANIELE SILVA PEREIRA ROSADO

Caracterização funcional dos fatores de transcrição PIF (*Phytochrome Interacting Factors*) em tomateiro: papel na produtividade e qualidade nutricional de frutos carnosos

Functional characterization of tomato PIF (Phytochrome Interacting Factors): role in fleshy fruit yield and nutritional quality

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

Orientadora: Maria Magdalena Rossi
Co-orientador: Luciano Freschi

São Paulo

2019

Ficha Catalográfica

Rosado, Daniele Silva Pereira

Caracterização funcional dos fatores de transcrição PIF
(*Phytochrome Interacting Factors*) em tomateiro: papel na
produtividade e qualidade nutricional de frutos carnosos

Número de páginas: 161

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

1. *Solanum lycopersicum*. 2. Desenvolvimento 3. Luz. 4.
Sinalização. 5. Produtividade. 6 Fitocromo. 7. Fator de transcrição.
8. Vitamina E. 9. Tomate. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Dedico esta tese à minha mãe,
que sempre incentivou a busca por
conhecimento e independência.

Agradecimentos

Sou imensamente grata a todos que possibilitaram a realização deste trabalho com mão na massa, ideias ou apoio emocional. Agradeço:

A Magdalena Rossi pela orientação, carinho e amizade. Obrigada por confiar em mim, por me proporcionar espaço para crescer, por estar sempre disponível e por me ajudar a fazer um trabalho do qual podemos nos orgulhar. Todos esses anos foram extremamente produtivos. Que venham muitos outros!

A Luciano Freschi, meu co-orientador, por todo o apoio, pelas ideias e intervenções valiosas. Obrigada pelo apoio irrestrito e pela paciência para re-discutir o mesmo experimento inúmeras vezes. Será muito bom poder contar com você nas próximas etapas.

A Manuel Rodríguez-Concepción, gracias por la colaboración, por recibirme en tu Lab en CRAG y hacerme parte de tu grupo. Sin tu apoyo el segundo capítulo sería imposible. Gracias a Elena Monte por los valiosos consejos acerca de ChIP. Gracias a todos los “Manolos” y agregados por la ayuda y amistad. En especial a Miguel, Vicky, Salva, Neto, Briardo, Rosa, Sofía, Tomas, Veni, Eva, Pablo, Miriam, Alma, Nidia, Ángel y Laura. Brahma (André) obrigada pela companhia divertidíssima e pelo apoio nessa jornada hispânica.

Ao Prof. Fábio Tebaldi, pelo auxílio com materiais e ideias para os experimentos de floração. Aos amigos do GMDV, Diego, Letícia, Airton, João e Eder.

Aos queridos “moleculentos” do GMP. Em especial, ao Bruno, por estar sempre disposto a ajudar e ter me iniciado neste mundo lindo dos tomates. À GGDR (Giova), pela parceria e amizade que nos fez parir o Capítulo 2 sob risadas sem fim. À Alê, companheira de aventuras europeias, pela amizade e troca de experiências. À Bruna, pela amizade, confiança e mão na massa que fez essa tese possível; obrigada por segurar as pontas quando eu estive atolada de trabalho; tenho orgulho de fazer parte da sua formação! Ao Grilo (Sr. Bianchetti), pelas ideias valiosas, pelo apoio incansável, pela troca de experiências, pelas dicas, pela confiança e, principalmente, pela amizade muito além da bancada. À Silvia pelo auxílio indispensável e companhia. À Juliana pelas críticas e auxílio. À Fernanda, pela amizade e pelo baião que tornaram todo o processo mais

divertido. À Gabi, que, embora não tenha me acompanhado *in loco*, foi quem me incentivou a entrar no laboratório. Obrigada por todos esses anos de amizade, desde a graduação.

Aos tomateiros da fisio, Rafa, Fred (HY5) e Aline, pelo auxílio metodológico, pela amizade, pelas reflexões e trocas que me fizeram a seguir em frente. Agradeço aos companheiros de aventuras Marta, Renata, Priscila, Filipe, Perdigão, Antônio, Bruno Gobara e Marcos. Também a William, Aline Coelho, Camila, Ana Maria, Diego e Maria pelo apoio técnico que tornou este trabalho possível.

À Prof. Eny, por compartilhar conosco espaço e materiais. Ao Prof. Igor, pelos conselhos, café e amizade. Aos amigos da 107 e além, Bruno Navarro, Leandro, Giovanni e Marcella. Aos companheiros do Biocel e “Cesarinos”, Naiara, Michael, Manu, Amanda, Rapha, Gabriel, Sávio, André e Alexandre.

Aos amigos que fizeram destes os melhores anos da minha vida.

À minha linda Paula Elbl, por todo o amor, companheirismo e paciência. Por ler meus textos, discutir ideias malucas, ensaiar apresentações comigo. Por me ouvir reclamar e me ajudar a ser melhor. Por cada lágrima e gota de suor. Esta tese é em parte sua também, porque eu não teria chegado até aqui sem a sua ajuda.

À minha família, pelo apoio incondicional. Sou muito grata por me incentivarem a estudar todos esses anos e a seguir essa trajetória “doida”. Aos meus tios pelos livros, pelos quadrinhos, pelos filmes, pelos momentos de silêncio, pelo colo e por toda a diversão. À minha mãe, pelo amor e por me dar as condições de chegar até aqui. Obrigada por tudo!!!!

Aos professores e hoje companheiros de profissão, Ale, Luciana, Júlio, Márcia Rosa, Catarina, Cláudio, Lucélia, Rosângela e Simone, pelo exemplo e incentivo. Sou bióloga graças a vocês.

Finalmente, ao Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo pelo apoio acadêmico e estrutural. Ao CNPq, à FAPESP e à CAPES pelo suporte acadêmico e financeiro sem os quais este trabalho não seria possível.

Obrigada!

Sumário

Resumo	11
Abstract.....	13
INTRODUÇÃO GERAL	15
OBJETIVOS	41
CONSIDERAÇÕES FINAIS	45

Resumo

O tomate tem grande importância econômica e nutricional. Durante o amadurecimento do fruto, os cloroplastos são convertidos em cromoplastos, a clorofila é degradada e metabólitos secundários de importância nutracêutica, como carotenoides e vitamina E (VTE), são acumulados. A luz tem papel fundamental na regulação da atividade plastidial e, portanto, na determinação da qualidade nutricional dos frutos. Por exemplo, o silenciamento do gene *DE-ETIOLATED 1*, um efector negativo na via de transdução de sinal luminoso, leva ao aumento do número de cloroplastos e ao maior acúmulo de clorofila, carotenoides e VTE em frutos tomate. Ainda, a luz tem papel fundamental na determinação dos ritmos de crescimento e no tempo de floração em diversas espécies. Em *Arabidopsis thaliana*, na presença de luz, os fitocromos (PHYs) induzem a degradação dos fatores de interação a PHYs (PHY-Interacting Factors, PIFs). As AtPIFs são fatores de transcrição que atuam como reguladores negativos da fotomorfogênese e participam de uma extensa rede regulatória que controla diversos processos do desenvolvimento desde a germinação até a senescência. Diretamente, as AtPIF controlam genes relacionados à biogênese e manutenção de cloroplastos, síntese e degradação de clorofila, carotenogênese, floração e crescimento. Assim, as PIF surgem como potenciais alvos de manipulação para melhoramento da qualidade nutricional e da produtividade. Neste contexto, este projeto objetivou caracterizar funcionalmente as PIFs de tomateiro. Desta maneira, no Capítulo I, foram identificados os genes *SIPIF*, os quais foram estudados no contexto de diversidade, história evolutiva e perfil de expressão. No Capítulo II, foi avaliado o efeito da luz sobre o metabolismo de VTE e a participação das SIPIFs como fatores regulatórios. No Capítulo III, foi avaliado o impacto do silenciamento do gene *SIPIF4* sobre a produtividade e qualidade nutricional de frutos. Assim, este trabalho traz novas informações que auxiliam na compreensão do papel desempenhado pelas proteínas SIPIFs na regulação de importantes processos metabólicos e do desenvolvimento, que, por fim, afetam caracteres de interesse agrônômico e nutricional do tomate.

Abstract

Tomato is a species of great economical and nutritional importance. During fruit ripening, chloroplasts are converted into chromoplasts, chlorophylls are degraded and secondary metabolites of nutraceutical importance, such as carotenoids and vitamin E (VTE), accumulate. Light plays a key role in the regulation of plastid activity and, therefore, of fruit nutritional quality. For instance, silencing of *DE-ETIOLATED 1*, a negative effector on light signaling, leads to increased chloroplast number and higher levels of chlorophyll, carotenoids and vitamin E in tomato fruits. On the other hand, light affects growth rates and flowering time in various species. In *Arabidopsis thaliana*, light-activated phytochromes (PHYs) induce the degradation of PHY-interacting factors (PIFs). PIFs as transcription factors acting as negative regulators of photomorphogenesis, part of a complex regulatory network that controls many developmental processes, from seed germination to senescence. AtPIFs directly regulate genes involved in plastid biogenesis and maintenance, chlorophyll breakdown, carotenogenesis, as well as pathways regulating growth and flowering. Therefore, PIFs emerge as potential targets of genetic manipulation towards improving fruit yield and quality. In this context, this work aimed to functionally characterize tomato PIFs. In Chapter I, *SIPIFs* were identified, and their diversity, evolutionary history and expression profile were studied. In Chapter II, the impacts of light on vitamin E biosynthesis and the role of SIPIFs as regulators of this process were investigated. In Chapter III, the effects of *SIPIF4* constitutive silencing were evaluated regarding mainly fruit production and nutritional quality. Overall, this work brings new information that help understanding the role of SIPIFs in the regulation of important developmental and metabolic process, that ultimately affect agronomic and nutraceutical characteristic of the tomato fruit.

INTRODUÇÃO GERAL

“Of the many intricate and beautiful control mechanisms living organisms have evolved to optimize their survival in a variable and changing environment, none is more elegant than the phytochrome system of plants.”

Warren L. Butler

1. Considerações iniciais

Há milhares de anos, a busca por cultivares de alta produtividade e crescimento acelerado conduz a domesticação das plantas. De modo empírico, a humanidade modificou recursos vegetais por meio de cruzamentos e seleção artificial, finalmente, obtendo cultivares adaptados a crescer melhor em determinada época, região e clima. Esse tipo de melhoramento clássico levou ao surgimento de tomateiros de hábito semi-determinado e frutos grandes, de cereais com espigas altas e número aumentado de sementes que passaram a ser cultivados em regiões muito diferentes daquelas habitadas por seus ancestrais selvagens (Salamini et al., 2002; Meyer and Purugganan, 2013; Bergougnoux, 2014).

Embora a domesticação tenha trazido benefícios, a falta de conhecimento sobre a fisiologia ainda representava uma barreira para o melhoramento direcionado e o próprio processo produtivo. Por exemplo, agricultores ainda eram limitados pela sazonalidade particular de muitos cultivares para germinação, crescimento e floração. Não obstante, as bases fisiológicas do efeito das estações sobre o desenvolvimento só começaram a ser compreendidas no último século. Garner and Allard (1920), demonstraram que o tempo de exposição diária à luz é o fator ambiental mais importante na determinação da fase reprodutiva em tabaco e soja. Trabalhos subsequentes mostraram que existem variáveis graus de sensibilidade à luz: determinadas plantas só florescem quando expostas a um período mínimo de noite ininterrupta, enquanto outras permanecem em estado vegetativo se o comprimento da noite ultrapassar um período máximo, ainda há plantas indiferentes a essa variável.

Nas décadas seguintes, mostrou-se que outros processos são regulados pela luz, como a germinação, o alongamento de internós, a expansão foliar e a pigmentação. Foi proposto por Borthwick et al. (1952) que a germinação de sementes de alface dependia da ativação de um “pigmento” por luz na faixa do vermelho; e que a inativação desse “pigmento” por luz vermelho-extrema ou escuro seriam responsáveis por inibir esse processo. Interessantemente, descobriu-se que outros fenômenos controlados por fotoperíodo também estavam sob controle dessa reação fotorreversível (Liverman, 1960). Somente em 1959, o fitocromo foi isolado e reconhecido como molécula responsável por mediar estas respostas (Butler et al., 1959; Borthwick and Hendricks, 1960). Em 1985, o grupo de Peter Quail publicou a primeira sequência de um gene codificante

para um fitocromo de aveia (Hershey et al., 1985). Desde então, as bases moleculares das respostas mediadas por fitocromos são amplamente estudadas.

Hoje, o conhecimento sobre fotobiologia permite o cultivo de plantas fora de época, por exemplo, por meio da suplementação artificial - da qualidade, quantidade e duração - da luz necessária para induzir a floração e aumentar a produtividade (Dorais, 2003; Moe et al., 2005). Ainda, a engenharia das redes regulatórias controladas por fitocromos tem grande potencial para o melhoramento vegetal pois elas controlam inúmeros processos fisiológicos que determinam diversos caracteres de importância agrônômica. Não obstante, o conhecimento acumulado nos últimos 30 anos se concentra majoritariamente na espécie modelo *Arabidopsis thaliana*, sendo muito escasso para espécies de interesse comercial.

Trabalhos recentes sugerem que mutações selecionadas durante o processo de domesticação do tomateiro causaram uma atenuação do relógio circadiano e a perda de sensibilidade ao comprimento do dia para a floração (Müller et al., 2016; Soyk et al., 2017; Müller et al., 2018). Em ambos os casos, foi demonstrada uma interação genética dos *loci* mutados com o fitocromo B1 - embora a natureza molecular dessas interações não seja bem conhecida - ressaltando a importância da sinalização luminosa mediada por fitocromos para a adaptação ambiental (Cao et al., 2016; Cao et al., 2018; Müller et al., 2018). Especula-se que essas mutações foram importantes para permitir o plantio em regiões diferentes das habitadas pelos tomateiros ancestrais andinos. Neste contexto, o objetivo principal do presente trabalho é aumentar a compreensão dos processos regulados por fitocromos em tomateiro, especialmente aqueles mediados pelos fatores de transcrição *PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS (PIFs)*, e investigar como a manipulação da resposta à luz pode afetar a produtividade e qualidade nutricional de frutos carnosos.

2. PIFs e a atividade plastidial

Além de energia para as reações de fotossíntese, a luz também provê sinais ambientais que regulam os ritmos circadianos, a fotomorfogênese e até mesmo o movimento de órgãos e organelas (McDonald, 2003). Assim, o desenvolvimento das plantas, seres sésseis e foto-autotróficos, decorre justamente da capacidade de perceber e se adaptar, entre outros fatores ambientais, às

condições de luminosidade. As cascatas de transdução do sinal luminoso mediadas pelos fotorreceptores permitem que a planta responda a diferentes qualidades e intensidades de luz, adequando o metabolismo e os ritmos de crescimento ao ambiente em constante mudança (Kami et al., 2010).

Os fitocromos (PHYs) são fotorreceptores responsáveis pela percepção da luz vermelha, vermelha-extrema e azul e, portanto, componentes fundamentais da regulação do ritmo circadiano e da fotomorfogênese. Existem duas formas interconvertíveis dos PHYs, sensíveis ao espectro vermelho (Fv) e vermelho-extremo (Fve), consistindo nas formas inativa e ativa do fotorreceptor, respectivamente. A exposição à luz solar leva à ativação dos PHYs, enquanto a manutenção das plantas no escuro, leva à conversão lenta e espontânea de Fve para Fv (revisado em Mathews, 2006). Os PHYs em sua forma ativa migram do citosol para o núcleo, onde interagem com diversos fatores e induzem modificações no padrão de produção e processamento de transcritos em resposta à luz (Castillon et al., 2007; Leivar and Quail, 2011; Park et al., 2012; Shikata et al., 2014).

Dentre os fatores que intermediam essa via de sinalização, destacam-se as proteínas de interação aos PHYs (PIF – *phytochrome-interacting factor*). As PIFs são fatores de transcrição do tipo *basic helix loop helix* (bHLH) parte de uma família multigênica de seis membros em *A. thaliana* (i.e. *AtPIF1*, *AtPIF3*, *AtPIF4*, *AtPIF5*, *AtPIF7* e *AtPIF8*). As proteínas PIF se acumulam no escuro, induzindo respostas à ausência de luz. Já na presença de luz, PHYs interagem com as PIFs no núcleo, impedindo a ligação a seus alvos transcrpcionais e levando à degradação destas proteínas e, em alguns casos, do próprio fotorreceptor (Castillon et al., 2007; Shen et al., 2007; Leivar and Quail, 2011; Park et al., 2012; Ni et al., 2014).

A interação antagônica descrita acima coloca as PIFs como componentes centrais na regulação de importantes processos fisiológicos das plantas. Em plântulas de *A. thaliana* recém-germinadas, *AtPIF1* e *AtPIF3* inibem o acúmulo de clorofila (Chl) e a abertura dos cotilédones no escuro, enquanto *AtPIF3*, *AtPIF4* e *AtPIF5* promovem o alongamento do hipocótilo. Durante o estiolamento, as *AtPIF1* e *AtPIF3* inibem o desenvolvimento de cloroplastos e a biossíntese de Chl, reprimindo a síntese de anéis tetrapirrólicos e o acúmulo de protoclorofilide (Huq et al., 2004; De Lucas et al., 2008; Moon et al., 2008; Shin et al., 2009; Stephenson et al., 2009; Chen et al., 2013; Liu et al., 2013). Esta inibição é particularmente importante durante o início do processo de desetiolamento, quando a produção rápida e excessiva de precursores de Chl poderia levar a danos

oxidativos (Chen et al., 2013; Lockhart, 2013). Contraditoriamente, esta mesma inibição é importante para o correto esverdeamento do tecido. Plantas sobre-expressando AtPIF1 e AtPIF3 crescidas no escuro apresentam maiores taxas de esverdeamento quando expostas à alta luz em comparação com plantas selvagens (Chen et al., 2013).

Além do anel tetrapirrólico da clorofila, a biossíntese de outros metabólitos de origem plastidial é regulada diretamente pelas proteínas PIF; como os carotenoides. Estudos demonstram que a luz exerce controle sobre diversos passos da biossíntese desses compostos. Neste contexto, as PIFs atuam reprimindo a expressão da primeira enzima responsável pela biossíntese de carotenoides, a FITOENO SINTASE (PSY), tanto em *A. thaliana* quanto em tomateiro (Toledo-Ortiz et al., 2010; Llorente et al., 2016). No entanto, o controle sobre a síntese destes compostos ocorre também a montante da PSY, pela inibição de genes da via do metileritritol fosfato (MEP) que fornecem os precursores necessários para a carotenogênese (Chenge-Espinosa et al., 2018).

A diferenciação e atividade plastidial estão estritamente controladas pela luz por meio de uma complexa cascata de sinalização da qual as PIFs participam como reguladores negativos. Em contraposição, os genes *GOLDEN2-LIKE (GLKs)* codificam fatores de transcrição que induzem o desenvolvimento plastidial e a expressão de transcritos nucleares necessários à fotossíntese (Waters et al., 2008) na presença de luz. Foi descrito em *A. thaliana* que os promotores destes genes possuem motivos G-box, os quais são reconhecidos alternativamente pelas AtPIFs ou pela proteína LONG HYPOCOTYL 5 (AtHY5) (Song et al., 2014; Toledo-Ortiz et al., 2014). No escuro, em ausência de AtHY5, as AtPIFs se ligam a estes promotores inibindo a transcrição dos *AtGLKs*. Na luz, a degradação das AtPIFs e indução de AtHY5 pelos PHYs ativados levam à produção de AtGLKs e à diferenciação dos cloroplastos (Figura 1).

Devido à importância da luz na biologia dos cloroplastos, faz-se necessário um ajuste fino da expressão gênica nuclear e do metabolismo plastidial de acordo com o estágio de desenvolvimento e as condições de luminosidade (Biswal et al., 2013). Um trabalho de 2013 demonstrou a existência de um sinal retrógrado do cloroplasto que modula o *splicing* de diversos fatores nucleares em resposta à luz (Petrillo et al., 2014), evidenciando a importância de cloroplastos funcionais para respostas fisiológicas a diferentes condições de luminosidade. Por exemplo, em situações de excesso de luminosidade, um sinal retrógrado do cloroplasto reprime a expressão de *AtGLK1* por um mecanismo independente de AtPIFs, ainda não completamente

elucidado (Martín et al., 2016; Hernández-Verdeja and Strand, 2018). Esse fato é fundamental para a proteção contra estresse oxidativo provocado por luz. Ainda neste contexto, AtPIF1 e AtPIF3 atuam antagonicamente a AtHY5 na regulação de genes responsivos a ROS. As AtPIFs reprimem diretamente genes relacionados à estresse e, desta maneira, inibem a morte celular durante o desestiolamento. Pelo contrário, mutantes *Atpifs* produzem mais $^1\text{O}_2$ e apresentam mais sintomas de morte celular durante esse processo (Chen et al., 2013).

3. PIFs e o crescimento

Inúmeros estudos demonstram que a atividade da proteína e os níveis de transcritos de *AtPIF4* são regulados por diferentes estímulos além da luz, como a temperatura, o ritmo circadiano, o conteúdo de açúcares e hormônios. Neste contexto, AtPIF4 funciona como um fator integrador da complexa rede regulatória que controla o crescimento em resposta a condições ambientais e endógenas (Choi and Oh, 2016).

Após a germinação, por exemplo, plântulas são capazes de otimizar o uso de recursos para promover o crescimento dentro da terra em busca de luz: enquanto AtPIF1 e AtPIF3 inibem a diferenciação plastidial e a expansão dos cotilédones, AtPIF4 e AtPIF5 induzem o alongamento do hipocótilo no escuro. Ao atingir a luz, AtPHYs degradam AtPIFs, inibem o crescimento do hipocótilo e induzem a fotomorfogênese. A partir deste momento, AtPIF4 e AtPIF5 atuam na promoção do crescimento diário durante o período escuro, por meio da ativação direta de genes que estimulam o crescimento e por ativação das vias de biossíntese e de resposta à auxina. Em *A. thaliana*, viu-se que a taxa de crescimento está associada à interação entre a duração do período noturno e o relógio circadiano (Nozue et al., 2007; Niwa et al., 2009; Franklin et al., 2011; Kunihiro et al., 2011; Nusinow et al., 2011; Nomoto et al., 2012; Sun et al., 2012; De Montaigu et al., 2015).

Altas temperaturas induzem o acúmulo e atividade de AtPIF4, intensificando o alongamento de hipocótilos, folhas e caules. Esse efeito é conhecido há pelo menos uma década e é modulado pelo relógio circadiano e por fatores hormonais (Koini et al., 2009; Stavang et al., 2009; Franklin et al., 2011; Sun et al., 2012; Nieto et al., 2015; Gangappa and Kumar, 2017; Ibañez et al., 2018; Martínez et al., 2018). Não obstante, apenas recentemente o mecanismo molecular da

resposta à temperatura foi desvendado. Demonstrou-se que altas temperaturas aceleram a taxa de fotorreversão de PHYB de Fve para Fv, explicando ao menos parcialmente como temperatura e luminosidade interagem na regulação dos processos morfogênicos (Jung et al., 2016; Legris et al., 2016; Huang et al., 2019; Qiu et al., 2019).

Em plantas adultas, as AtPIFs regulam ainda o tempo de floração e a senescência induzida por escuro e idade (Kumar et al., 2012; Sakuraba et al., 2014; Song et al., 2014). Durante a senescência foliar, as AtPIFs participam da sinalização que culmina na degradação das Chls e no dismantelamento dos cloroplastos visando a remobilização de nutrientes. Esta atuação será discutida na seção a seguir.

4. PIFs e a regulação da senescência foliar

A indução da senescência foliar é desencadeada por fatores como a idade do órgão, estresse salino ou hídrico, privação de nutrientes e ausência de luz. Estes sinais são transduzidos por uma complexa rede regulatória, da qual participam fitormônios (Khan et al., 2014) e que objetiva a remobilização de nutrientes para outras regiões da planta (*e.g.* folhas jovens, estruturas reprodutivas, órgãos de reserva e frutos) (Buchanan-Wollaston, 1997). Como resultado da expressão dos *SENESCENCE-ASSOCIATED GENES (SAGs)*, ocorrem diversas modificações bioquímicas e estruturais que levam ao declínio da capacidade fotossintética e a degradação de Chls, de macromoléculas e de membranas (Sarwat et al., 2013).

Foi descrita a relação das AtPIF3, AtPIF4 e AtPIF5 com a senescência foliar em *A. thaliana* (Sakuraba et al., 2014; Song et al., 2014). Viu-se que estes fatores são expressos no início da senescência induzida por escuro e idade e levam à expressão de diversas proteínas SAGs. Mutantes de perda de função destas AtPIFs apresentam maiores conteúdos de Chls, taxas de fotossíntese e longevidade foliar. Além disso, a proteína AtPIF4 induz a produção de etileno, um dos hormônios responsáveis pela indução da senescência e do amadurecimento de frutos carnosos (Bleecker and Kende, 2000; Song et al., 2014).

Em *A. thaliana*, o gene *ORESARA1 (AtORE1)*, da família de fatores de transcrição NAC (NAM, ATAF, e CUC), controla diversos genes envolvidos na senescência, dentre eles os *AtSAGs*.

A proteína codificada por *AtORE1* interage com os *AtGLKs* formando um heterodímero, bloqueando a atividade desta última e resultando no desmantelamento dos cloroplastos. Adicionalmente, a expressão de *AtORE1* é induzida pelo envelhecimento de forma dependente de ETHYLENE INSENSITIVE 2 (EIN2), proteína da via de sinalização de etileno, e reprimida pelo miR164. Por sua vez, o nível de miR164 decresce com o envelhecimento via o efeito inibitório de EIN2 (Kim et al., 2009; Khan et al., 2014). Recentemente, foi verificado que *AtPIF4* e *AtPIF5* controlam os níveis de *AtORE1* em *A. thaliana*. Por meio da ativação de genes das vias de etileno (ETHYLENE INSENSITIVE 3) e de ABA (ABA-INSENSITIVE 5 e ENHANCED EM LEVEL), essas PIFs induzem a expressão de *AtORE1* e diversos *AtSAGs*, incluindo enzimas do catabolismo de Chl (Sakuraba et al., 2014) e levam direta (*via* repressão transcricional) e indiretamente (*via* *AtORE1*) à repressão dos *AtGLKs* (Rauf et al., 2013) (Figura 1).

A manipulação da senescência é uma estratégia importante para o melhoramento vegetal. Trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa revelam que a manipulação da senescência em tomateiro pode ter um efeito na produtividade e na qualidade nutricional dos frutos. Por exemplo, o silenciamento do gene que codifica a enzima FEOFITINASE (PPH), envolvida na degradação da Chl durante a senescência, afeta diferentes parâmetros de interesse comercial em tomateiro (Lira et al., 2016). Isso porque o silenciamento desse gene afeta a produção de carotenoides, vitamina E e o metabolismo de carbono em folhas e frutos. Ainda, foi demonstrado que o gene ortólogo ao *AtORE1* em tomateiro, *SLOREIS02*, é regulado também pelo miR164 e interage fisicamente com as *SIGLKs*, inibindo sua ação e desencadeando a senescência. O silenciamento do gene *SLOREIS02* resultou no retardo na senescência foliar mantendo a fotossíntese ativa por mais tempo resultando no aumento na produtividade e qualidade dos frutos (Lira et al., 2017). No entanto, o papel das *SIPIFs* neste processo não foi caracterizado até o momento em tomateiro.

5. PIFs e o controle da floração

O controle da floração está associado à adaptação de espécies vegetais ao ambiente, de maneira a otimizar o *fitness*. Diversos fatores endógenos e exógenos podem regular o tempo de floração, como o comprimento do dia, a temperatura e fitohormônios (Srikanth and Schmid, 2011). Em *A. thaliana*, o controle da floração é realizado pelo módulo CONSTANS (*AtCO*) –

FLOWERING LOCUS T (AtFT). Em dias curtos, o fator de transcrição AtCO induz a expressão de AtFT em folhas. Após a tradução, a proteína AtFT é translocada pelo floema para o meristema apical (*shoot apical meristem* – SAM), onde induz a transição do meristema vegetativo para floral (Golembeski et al., 2014).

Figura 1: Esquema da regulação da senescência descrito para *A. thaliana*. Adaptado de Rauf *et al.* (2013) e Sakuraba *et al.* (2014). FR: vermelho-extremo; R: vermelho; Pr: fitocromo inativo; Pfr: fitocromo ativo; PIF: PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR; HY5: LONG HYPOCOTYL 5; GLK: GOLDEN2-LIKE; ORE1: ORESARA1; EIN2 e EIN3: ETHYLENE INSENSITIVE 2 e 3, proteínas da rota de sinalização de etileno; ABI5 e EEL: ABA-INSENSITIVE e ENHANCED EM LEVEL, proteínas da rota de sinalização de ácido abscísico (ABA); miR164: microRNA 164.

Um segundo fator importante que regula a floração é a temperatura. Em *A. thaliana*, foi descrito recentemente que PHYB além de receptor luminoso, é também um termosensor, porque a reversão para a forma inativa é induzida por altas temperaturas, de modo que este fotorreceptor

atua na integração desses dois sinais ambientais (Legris et al., 2016). Assim, sob altas temperaturas, o fator BRASSINAZOLE RESISTANT 1 (AtBZR1) induz a expressão de *AtPIF4* que, associada à inativação de PHYB, leva a um acúmulo da proteína AtPIF4 (Ibañez et al., 2018). AtPIF4, por sua vez, interage diretamente com o promotor de *AtFT*, induzindo a expressão deste gene (Kumar et al., 2012). Ainda, AtPIF4 reprime a expressão do miR156, responsável por silenciar o gene *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE3* (*AtSPL3*), um indutor da floração (Kim et al., 2012; Xie et al., 2017). Como resultado dessas interações, há um aumento na expressão de *AtFT* e indução da floração sob altas temperaturas.

Uma diferença notável entre *A. thaliana* e *S. lycopersicum* é o fato de que o tomateiro é uma planta de dia-neutro, ou seja, indiferente ao comprimento do dia para a floração. Desta maneira, embora o módulo CO-FT seja conservado em angiospermas, o florescimento em tomateiro é induzido pelo homólogo de FT, SINGLE FLOWER TRUSS (SISFT), de maneira independente de CO (Molinero-Rosales et al., 2004; Lifschitz and Eshed, 2006; Srikanth and Schmid, 2011). Adicionalmente, a transição floral provoca o fim do crescimento vegetativo em *A. thaliana*, pois o SAM se diferencia em meristema reprodutivo, gerando uma flor terminal; este é o chamado crescimento determinado. Em tomateiro, no entanto, o SAM se diferencia para produzir um ramo floral e a gema lateral imediatamente abaixo adquire dominância e passa a produzir novas folhas. Isso ocorre sucessivamente, de modo que ocorra crescimento simpodial. A porção da planta entre cada nova folha e a terminação floral é denominada unidade simpodial (*sympodial unit* - SU). Dois genes são os principais responsáveis por este tipo de crescimento, o SISFT e o fator antagônico SELF PRUNING (SISP). *SISP* é expresso no SAM no início do desenvolvimento e é responsável pela manutenção do crescimento vegetativo. Ao longo do tempo, a expressão de SP diminuiu e, concomitantemente, a expressão de *SISFT* nas folhas aumenta levando à floração. Contraditoriamente, *SISFT* induz indiretamente a expressão de *SISP* na gema lateral, dando origem à próxima SU (Lifschitz and Eshed, 2006; Lifschitz et al., 2006). Existem também variedades com crescimento determinado como consequência da mutação *sp* (Pnueli et al., 1998). Finalmente, diferentes combinações alélicas entre SISP e SISFT, assim como outros genes envolvidos na morfogênese (*i.e.* CENTRORADIALIS/TERMINALFLOWER1/SELF-PRUNING – CETS gene Family) regulam a arquitetura da planta produzindo plantas semi-determinadas afetando a produtividade (Krieger et al., 2010; Jiang et al., 2013; Vicente et al., 2015). Embora o efeito da

relação entre *SISP* e *SISFT* sobre o crescimento e produtividade em tomateiro tenha sido extensamente estudado, não há relatos da relação das SIPIFs com a floração nesta espécie.

6. *Solanum lycopersicum* como espécie modelo

O tomateiro, *Solanum lycopersicum* L., pertence à família Solanaceae, a mesma de diversas outras espécies de importância agrônômica como a batata (*Solanum tuberosum*), o tabaco (*Nicotiana tabacum*) e a berinjela (*Solanum melongena*). O fruto desta planta é altamente consumido em todo o mundo tanto em sua forma *in natura*, como processada. O Brasil é 10º maior produtor mundial desta *commodity* e em 2017 foi responsável por 4,2 milhões das 182,3 milhões de toneladas produzidas no mesmo ano (FAOSTAT, acessado em 12/05/2019).

S. lycopersicum é uma espécie autógama, diploide, cujo genoma de 900 Mb compreendido em 12 cromossomos foi completamente sequenciado (Consortium, 2012). A existência de diversas espécies selvagens filogeneticamente próximas, com as quais é possível obter híbridos, constitui uma importante fonte de variabilidade para o melhoramento genético (Schauer et al., 2006). Exemplo disto são as diversas populações de linhagens introgridas interespecíficas estabelecidas (Eshed and Zamir, 1995). Finalmente, eficientes técnicas de transformação estável (Pino et al., 2010) e transiente (Orzaez et al., 2006; Quadrana et al., 2011) fazem do tomateiro uma espécie modelo alternativa a *A. thaliana*.

Particularmente, pela importância para a nutrição humana e a biologia dos frutos, *S. lycopersicum* se consolidou como o modelo para o estudo dos processos bioquímicos envolvidos no desenvolvimento e amadurecimento de frutos carnosos (Carrari and Fernie, 2006). Ao longo do desenvolvimento do fruto, distinguem-se quatro fases, que podem ser observadas na Figura 2: (i) o desenvolvimento da flor, desde a iniciação floral até antese; (ii) o período de intensa divisão celular que começa após fertilização (estágios verde-imaturos, *immature green* - IG); (iii) o período de expansão celular, que se estende desde o fim da fase de divisão até o início do amadurecimento, quando o fruto atinge o tamanho máximo e se torna responsivo ao etileno (estágio verde-maduro, *mature green* - MG); e (iv) o amadurecimento (estágios *breaker* - BR), marcado por alterações bioquímicas, incluindo o acúmulo de açúcares, ácidos, pigmentos e

compostos voláteis, que afetam a aparência, a textura e o teor nutricional atraindo organismos dispersores de sementes (Gillaspy et al., 1993; Giovannoni, 2004).

Figura 2: Desenvolvimento de flores e frutos de tomateiro MicroTom. F: flor em desenvolvimento, FA: flor em antese; IGs: estágios verde-imaturos; MG: estágio verde maduro; BR: breaker, BR1-BR12: 1-12 dias após início da mudança de cor.

Apesar dos frutos de tomateiro serem órgãos dreno, necessitando mais fotoassimilados do que conseguem produzir, durante as fases de divisão e expansão celular, a maquinaria fotossintética local é responsável por até 20% do total de carbono no fruto maduro (Carrara et al., 2001; Cocaliadis et al., 2014). Durante o amadurecimento do fruto, os cloroplastos fotossinteticamente ativos são convertidos em cromoplastos, sendo esse processo marcado pela desorganização do sistema interno de membranas e intensa alteração metabólica. Este processo é acompanhado da degradação de clorofila (Chl) e do acúmulo de diversos compostos nutracêuticos antioxidantes, tais como tocoferóis e carotenoides, dentre os quais predomina o licopeno, pigmento que determina a mudança de cor do fruto iniciada no estágio BR (Figura 2) (Egea et al., 2010; Klee and Giovannoni, 2011). A maturação do tomate, um fruto climatérico, coincide com a maturação da semente e está intimamente relacionada ao aumento da respiração e biossíntese de etileno, desencadeando a reprogramação da expressão gênica que regula importantes rotas metabólicas (Carrari and Fernie, 2006; Renato et al., 2014). Sob a perspectiva agrônômica, 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).

7. Plastídios e qualidade dos frutos

O fruto maduro de tomate contém quantidades significativas de açúcares e de compostos com atividade antioxidante, como carotenoides, flavonoides, fenilpropanoides e tocoferóis derivados do metabolismo secundário (Abushita et al., 2000; Giovannucci et al., 2002). As rotas que produzem os precursores para a biossíntese desses compostos são plastidiais. Neste sentido, genes que controlam o metabolismo plastidial tem demonstrado afetar a qualidade nutricional e industrial dos frutos (Cocaliadis et al., 2014). Por exemplo, o produto do gene *SIDE1* (*DE-ETIOLATED1*) é um regulador negativo da resposta à luz que controla a expressão gênica por meio do remodelamento da cromatina. A perda de função de *DET1* em frutos leva ao aumento do número e do volume dos cloroplastos por célula resultando em frutos com maior quantidade de carotenoides, flavonoides, fenilpropanoides e tocoferóis (Davuluri et al., 2004; Enfissi et al., 2010).

Em *S. lycopersicum*, os genes *SlGLK1* e *SlGLK2* são expressos nas folhas, sendo que apenas o transcrito de *SlGLK2* é detectado nos frutos. O padrão de expressão de *SlGLK2* nos frutos está distribuído em um gradiente latitudinal que gera o chamado “ombro verde”, local de maior densidade de cloroplastos e conteúdo de Chl (Powell et al., 2012). A sobre-expressão de *SlGLK2* resulta em frutos imaturos com maior número de cloroplastos que apresentam maior empilhamento dos grana (Lupi et al., 2019). Após amadurecimento, esses frutos possuem maiores conteúdos de açúcares solúveis, carotenoides e tocoferóis, evidenciando que o aumento em número e a manutenção de cloroplastos ativos nos frutos verdes são importantes para o acúmulo de nutrientes nos frutos maduros (Nguyen et al., 2014; Lira et al., 2017; Lupi et al., 2019). O alelo selvagem funcional de *SlGLK2* (*U*) foi perdido em tomateiros cultivados pela progressiva seleção de frutos com amadurecimento uniforme (*u/u* - *uniform ripening*). O alelo mutado *Slglk2* gera uma proteína truncada inativa pela inserção de uma base na sua região codificante. Em decorrência da falta de *SlGLK2* ativa, há diminuição dos níveis de carotenoides e sólidos solúveis (*brix*), evidenciando que o processo de domesticação dos tomateiros levou a perdas significativas da qualidade nutricional dos tomates (Powell et al., 2012; Nguyen et al., 2014).

Um trabalho publicado por nosso grupo de pesquisa (Almeida et al., 2015) demonstrou que mutantes de tomateiro deficientes no amadurecimento e na degradação da Chl apresentam alterações no acúmulo de carotenoides e tocoferóis em frutos. Finalmente, foi descrito que

mutantes de tomateiro deficientes em PHYs apresentam alteração no conteúdo de carotenoides nos frutos, assim como alteração na progressão entre as diferentes fases de desenvolvimento e amadurecimento (Gupta et al., 2014). Recentemente, demonstrou-se que o silenciamento fruto-específico dos genes SIPHYA e SIPHYB2 afeta a divisão e diferenciação plastidial, bem como o metabolismo dos plastídios nesse órgão (Bianchetti et al., 2018). E que, portanto, a expressão alterada de genes relacionados à força do dreno (metabolismo de açúcares) e biossíntese de carotenoides nos próprios frutos levaram à redução de açúcares solúveis e de carotenoides nessas plantas.

Desta forma, pelo papel fundamental da luz no desenvolvimento e atividade plastidial, e a participação das PIFs na sinalização luminosa, espera-se que estas proteínas afetem o padrão de amadurecimento e qualidade dos frutos maduros.

8. Vitamina E

Diversos radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio (ROS), são gerados naturalmente em função do metabolismo celular. Algumas condições abióticas, como estresse luminoso, temperaturas extremas, alta salinidade e seca; e também bióticas, como ataque de patógenos, podem levar a uma produção excessiva de ROS. São conhecidas algumas funções sinalizadoras para essas moléculas, que estão relacionadas a respostas ao ambiente (Choudhury et al., 2017). Entretanto, um desbalanço entre a produção e a capacidade celular de mitigar a ação desses radicais livres pode ocasionar o chamado estresse oxidativo, que tem como consequências danos a ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), proteínas, ácidos nucleicos e, em casos extremos, morte celular. Por este motivo, diversos mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos evoluíram em plantas e outros organismos para a manutenção da homeostase através da detoxificação de ROS (Tripathy and Oelmüller, 2012; Barbosa et al., 2014).

Em plantas, os cloroplastos, as mitocôndrias e os peroxissomos são as principais fontes de ROS nos tecidos verdes (Janků et al., 2019). Nos cloroplastos, a produção constante de oxigênio molecular (O_2) em função da fotólise da água origina um ambiente propício para a formação de ROS. Sob condições normais e acentuadamente sob luminosidade excessiva, a transferência ineficiente de energia da Chl para outros componentes da cadeia de transporte de elétrons causa a

conversão dessa molécula para o estado triplet (Chl^*), que por sua vez interage com O_2 levando à formação de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), uma espécie altamente reativa (Tripathy and Oelmüller, 2012). Desta maneira, a própria atividade fotossintética gera radicais danosos aos fotossistemas (PSI e PSII).

Para lidar com a produção de ROS nos cloroplastos, as plantas contam com um conjunto de moléculas antioxidantes não-enzimáticas, como carotenoides, ascorbato e tocoferóis. Estes últimos são moléculas lipossolúveis anfipáticas com grande poder antioxidante que, conjuntamente com os tocotrienóis, são chamados de vitamina E (VTE). Presentes no PSII, são especialmente importantes sob condições de alta luminosidade, pois eliminam $^1\text{O}_2$ e inibem a propagação da peroxidação lipídica, de modo a prevenir danos à maquinaria fotossintética protegendo as membranas dos tilacóides (Miret and Munné-Bosch, 2015). Estas funções foram comprovadas em diversos estudos. Por exemplo, em *Chlamydomonas reinhardtii*, foi verificado que o bloqueio na biossíntese de VTE por herbicidas leva à perda de atividade do PSII (Trebst et al., 2004). Em *A. thaliana*, mutantes deficientes na produção de VTE são mais suscetíveis à peroxidação lipídica e a danos fotooxidativos (Havaux et al., 2005).

Do ponto de vista da nutrição humana, os tocoferóis têm grande importância. Primeiramente, porque os danos oxidativos estão relacionados ao envelhecimento e a diversas doenças, como câncer e afecções cardíacas (Organization, 2004; Mathur et al., 2015; Grimm et al., 2016; Peh et al., 2016). Neste contexto, os tocoferóis são os principais antioxidantes lipossolúveis no sistema de defesa humano a ROS. Obtidos exclusivamente da dieta, os tocoferóis agem, de modo análogo às plantas, inibindo a peroxidação lipídica de PUFA's e outros componentes de membranas celulares. Os problemas ocasionados por deficiência de VTE decorrem, no geral, do extravasamento dos conteúdos das células pelo rompimento de membranas. Assim, o diagnóstico dessa deficiência pode ser feito pela detecção de enzimas musculares e altos níveis de produtos de peroxidação lipídica no plasma sanguíneo (Organization, 2004). Dentre as afeções causadas pela deficiência de VTE estão síndromes neuromusculares e neurodegenerativas como a ataxia (Guggenheim et al., 1982; Ouahchi et al., 1995), anemia hemolítica (Oski and Barness, 1967), e doenças coronárias (Bellizzi et al., 1994).

A VTE é sintetizada exclusivamente por organismos fotossintetizantes. A síntese ocorre nos plastídios, a partir da condensação de dois precursores: uma cauda apolar - o fitil-difosfato

(PDP) - e uma cabeça polar - o homogentisato -, derivados das vias do metil-eritritol fosfato (MEP) e do ácido chiquímico (SK), respectivamente. A biossíntese de tocoferol está intimamente relacionada ao metabolismo de Chl e de carotenoides. Isso porque a via do MEP fornece precursores isoprenóides também para a síntese dessas substâncias, o PDP e o geranylgeranyl difosfato, respectivamente. O PDP pode ser ainda originado por meio da reciclagem da cauda de fitol liberado na degradação da Chl, em complementação à síntese *de novo* via MEP (Almeida et al., 2015) (Figura 4).

Os tocoferóis existem em quatro diferentes formas que variam na quantidade e posição dos radicais metila (CH_3 -) no anel aromático da cabeça polar (Figura 5). Dentre estas formas, o α -tocoferol possui a maior atividade biológica de VTE, isto é, se apresenta como a forma com maior atividade e a mais absorvida em humanos (Bjørneboe et al., 1990; DellaPenna, 2005; Azzi, 2018). Ainda, o α -tocoferol é a forma mais abundante em folhas e frutos, inclusive em tomateiro (Almeida et al., 2011).

Nos últimos anos, o grupo do Laboratório de Genética Molecular de Plantas do Instituto de Biociências da USP tem estudado a biossíntese de tocoferóis em tomateiro. Neste contexto, foram identificados e caracterizados todos os genes que codificam enzimas participantes da biossíntese destas substâncias em *Solanum lycopersicum* (Almeida et al., 2011). Trabalhos do grupo demonstraram que a transcrição dos genes da biossíntese de VTE é regulada espaço-temporalmente e que diversos genes co-regulados em tecidos fotossintéticos e em frutos durante o amadurecimento apresentam os mesmos motivos *cis*-regulatórios nos seus promotores, sugerindo a regulação por fatores de transcrição comuns. Ainda, análises de redes de co-regulação revelaram que os perfis de expressão de alguns dos genes da rota de tocoferol correlacionam com os conteúdos de Chl (Quadrana et al., 2013).

Figura 4: Biossíntese de tocoferóis, carotenoides e Chl nos plastídios. As enzimas estão indicadas de acordo às seguintes abreviaturas: DXS, 1-deoxi-D-xilulose-5-P sintase; GGDR, geranilgeranil difosfato redutase; VTE2, homogentisato fitil transferase; VTE3, 2,3-dimetil-5-fetilquinol metiltransferase; VTE1, tocoferol ciclase; VTE4, γ -tocopherol-C-metil transferase; PSY, fitoeno sintase; PDS, fitoeno desaturase; LCY β , β -licopeno ciclase cloroplástica; CYC β , β -licopeno ciclase cromoplástica; CHLG, clorofila sintase; SGR1, *staygreen 1*; PPH, feofitina; PAO, feoforbide a oxigenase; VTE5, fitol quinase; VTE6, fitil fosfato quinase. Os metabólitos estão indicados de acordo às seguintes abreviaturas: GA3-P, gliceraldeído 3-P; DXP, 1-deoxi-D-xilulose-5-P; IDP, isopentenil difosfato; DMADP, dimetilalil difosfato; GGDP, geranilgeranil-difosfato; HPP, HGA, hidroxifenilpiruvato; homogentisato; Chlide a, clorofilide a; Pheide a, feoforbide a; RCC, catabolito vermelho da clorofila; MPBQ, 2-metil-6-geranilgeranilbenzoquinol; DMBQ, 2,3-dimetil-6-geranilgeranilbenzoquinol. Adaptado de Almeida et al. (2015).

O estudo da regulação transcricional também expôs que a disponibilidade de PDP é um fator limitante para o acúmulo de VTE (Quadrana et al., 2013), hipótese que foi reforçada pelo estudo dos perfis bioquímicos e de expressão de mutantes deficientes no amadurecimento e degradação de Chl (Almeida et al., 2015). Durante o amadurecimento dos frutos, o precursor geranilgeranil difosfato é canalizado para a produção de carotenoides, pela redução da transcrição de *GERANILGERANIL DIFOSFATO REDUTASE (GGDR)* (Figura 4), de modo que o fitol proveniente da degradação de Chl tem papel fundamental na manutenção dos níveis de tocoferol em frutos. O silenciamento do gene *VTE5 (FITOL QUINASE)*, que codifica a enzima responsável pela primeira etapa de fosforilação do fitol durante sua reciclagem, reduz em 80% a produção de VTE tanto em folhas quanto em frutos de tomateiro. Ainda, a deficiência de VTE resulta na queda da taxa fotossintética e afeta o particionamento de carbono, diminuindo a produtividade (Almeida et al., 2015). Mais recentemente, foi demonstrado que as plantas silenciadas para *VTE5* apresentam hipersensibilidade a condições de alta irradiância e alta temperatura (Spicher et al., 2017). Desta forma, os dados obtidos demonstram a importância agrônômica do tocoferol e expõem claramente a relação entre a luz, a Chl e a VTE. Neste contexto, as proteínas PIF emergem como possíveis reguladores dos conteúdos de VTE, dada a relação com o metabolismo isoprenóide discutido nas seções anteriores.

Figura 5: Estrutura dos tocoferóis. A atividade de vitamina E está representada em porcentagem relativizada com a de α -tocoferol (Adaptado de DellaPenna, 2005).

Atividade <i>versus</i> α -tocoferol			
Forma	R ₁	R ₂	Atividade vitamina E (%)
α -tocoferol	CH ₃	CH ₃	100
β -tocoferol	CH ₃	H	25-50
γ -tocoferol	H	CH ₃	8-19
δ -tocoferol	H	H	<3

9. Referências

- Abushita A, Daood H, Biacs P** (2000) Change in carotenoids and antioxidant vitamins in tomato as a function of varietal and technological factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 2075-2081
- Almeida J, Asís R, Molineri VN, Sestari I, Lira BS, Carrari F, Peres LEP, Rossi M** (2015) Fruits from ripening impaired, chlorophyll degraded and jasmonate insensitive tomato mutants have altered tocopherol content and composition. *Phytochemistry* **111**: 72-83
- Almeida J, Azevedo MdS, Spicher L, Glauser G, vom Dorp K, Guyer L, del Valle Carranza A, Asis R, de Souza AP, Buckeridge M** (2015) Down-regulation of tomato PHYTOL KINASE strongly impairs tocopherol biosynthesis and affects prenyllipid metabolism in an organ-specific manner. *Journal of experimental botany* **67**: 919-934
- Almeida J, Quadrana L, Asís R, Setta N, de Godoy F, Bermúdez L, Otaiza SN, Corrêa da Silva JV, Fernie AR, Carrari F** (2011) Genetic dissection of vitamin E biosynthesis in tomato. *Journal of experimental botany* **62**: 3781-3798
- Azzi A** (2018) Many tocopherols, one vitamin E. *Molecular aspects of medicine* **61**: 92-103
- Barbosa MR, Silva MMda, Willadino L, Ulisses C, Camara TR** (2014) Plant generation and enzymatic detoxification of reactive oxygen species. *Ciência Rural* **44**: 453-460
- Bellizzi M, Franklin M, Duthie G, James W** (1994) Vitamin E and coronary heart disease: the European paradox. *European journal of clinical nutrition* **48**: 822-831
- Bergougnoux V** (2014) The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnology advances* **32**: 170-189
- Bianchetti R, Silvestre Lira B, Santos Monteiro S, Demarco D, Purgatto E, Rothan C, Rossi M, Freschi L** (2018) Fruit-localized phytochromes regulate plastid biogenesis, starch synthesis, and carotenoid metabolism in tomato. *Journal of experimental botany* **69**: 3573-3586
- Biswal B, Krupinska K, Biswal UC** (2013) Plastid development in leaves during growth and senescence. Springer
- Bjørneboe A, Bjørneboe G-EA, Drevon CA** (1990) Absorption, transport and distribution of vitamin E. the *Journal of Nutrition* **120**: 233-242
- Bleecker AB, Kende H** (2000) Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual review of cell and developmental biology* **16**: 1-18
- Borthwick H, Hendricks S** (1960) Photoperiodism in plants. *Science* **132**: 1223-1228
- Borthwick HA, Hendricks SB, Parker M, Toole E, Toole VK** (1952) A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **38**: 662
- Buchanan-Wollaston V** (1997) The molecular biology of leaf senescence. *Journal of experimental botany* **48**: 181-199
- Butler WL, Norris K, Siegelman H, Hendricks S** (1959) Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **45**: 1703
- Cao K, Cui L, Zhou X, Ye L, Zou Z, Deng S** (2016) Four tomato FLOWERING LOCUS T-like proteins act antagonistically to regulate floral initiation. *Frontiers in plant science* **6**: 1213
- Cao K, Yan F, Xu D, Ai K, Yu J, Bao E, Zou Z** (2018) Phytochrome B1-dependent control of SP5G transcription is the basis of the night break and red to far-red light ratio effects in tomato flowering. *BMC plant biology* **18**: 158
- Carrara S, Pardossi A, Soldatini G, Tognoni F, Guidi L** (2001) Photosynthetic activity of ripening tomato fruit. *Photosynthetica* **39**: 75-78
- Carrari F, Fernie AR** (2006) Metabolic regulation underlying tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1883-1897
- Castillon A, Shen H, Huq E** (2007) Phytochrome interacting factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends in plant science* **12**: 514-521
- Chen D, Xu G, Tang W, Jing Y, Ji Q, Fei Z, Lin R** (2013) Antagonistic basic helix-loop-helix/bZIP transcription factors form transcriptional modules that integrate light and reactive oxygen species signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell* **25**: 1657-1673
- Chenge-Espinosa M, Cordoba E, Romero-Guido C, Toledo-Ortiz G, León P** (2018) Shedding light on the methylerythritol phosphate (MEP)-pathway: long hypocotyl 5 (HY 5)/phytochrome-interacting factors (PIFs) transcription factors modulating key limiting steps. *The Plant Journal* **96**: 828-841
- Choi H, Oh E** (2016) PIF4 integrates multiple environmental and hormonal signals for plant growth regulation in Arabidopsis. *Molecules and cells* **39**: 587

- Choudhury FK, Rivero RM, Blumwald E, Mittler R** (2017) Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal* **90**: 856-867
- Cocaliadis MF, Fernández-Muñoz R, Pons C, Orzaez D, Granell A** (2014) Increasing tomato fruit quality by enhancing fruit chloroplast function. A double-edged sword? *Journal of experimental botany* **65**: 4589-4598
- Consortium TG** (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* **485**: 635
- Davuluri GR, van Tuinen A, Mustilli AC, Manfredonia A, Newman R, Burgess D, Brummell DA, King SR, Palys J, Uhlig J** (2004) Manipulation of DET1 expression in tomato results in photomorphogenic phenotypes caused by post-transcriptional gene silencing. *The Plant Journal* **40**: 344-354
- De Lucas M, Daviere J-M, Rodríguez-Falcón M, Pontin M, Iglesias-Pedraz JM, Lorrain S, Fankhauser C, Blázquez MA, Titarenko E, Prat S** (2008) A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* **451**: 480
- De Montaigu A, Giakountis A, Rubin M, Tóth R, Cremer F, Sokolova V, Porri A, Reymond M, Weinig C, Coupland G** (2015) Natural diversity in daily rhythms of gene expression contributes to phenotypic variation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: 905-910
- DellaPenna D** (2005) Progress in the dissection and manipulation of vitamin E synthesis. *Trends in plant science* **10**: 574-579
- Dorais M** (2003) The use of supplemental lighting for vegetable crop production: light intensity, crop response, nutrition, crop management, cultural practices. *In Canadian Greenhouse Conference, Vol 9*
- Egea I, Barsan C, Bian W, Purgatto E, Latché A, Chervin C, Bouzayen M, Pech J-C** (2010) Chromoplast differentiation: current status and perspectives. *Plant and Cell Physiology* **51**: 1601-1611
- Enfissi EM, Barneche F, Ahmed I, Lichtlé C, Gerrish C, McQuinn RP, Giovannoni JJ, Lopez-Juez E, Bowler C, Bramley PM** (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
- Franklin KA, Lee SH, Patel D, Kumar SV, Spartz AK, Gu C, Ye S, Yu P, Breen G, Cohen JD** (2011) Phytochrome-interacting factor 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 20231-20235
- Gangappa SN, Kumar SV** (2017) DET1 and HY5 control PIF4-mediated thermosensory elongation growth through distinct mechanisms. *Cell reports* **18**: 344-351
- Garner WW, Allard HA** (1920) Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *Monthly Weather Review* **48**: 415-415
- Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W** (1993) Fruits: a developmental perspective. *The Plant Cell* **5**: 1439
- Giovannoni JJ** (2004) Genetic regulation of fruit development and ripening. *The plant cell* **16**: S170-S180
- Giovannucci E, Rimm EB, Liu Y, Stampfer MJ, Willett WC** (2002) A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute* **94**: 391-398
- Golembeski GS, Kinmonth-Schultz HA, Song YH, Imaizumi T** (2014) Photoperiodic flowering regulation in *Arabidopsis thaliana*. *In Advances in botanical research, Vol 72. Elsevier*, pp 1-28
- Grimm M, Mett J, Hartmann T** (2016) The impact of vitamin E and other fat-soluble vitamins on Alzheimer's disease. *International journal of molecular sciences* **17**: 1785
- Guggenheim MA, Ringel SP, Silverman A, Grabert BE** (1982) Progressive neuromuscular disease in children with chronic cholestasis and vitamin E deficiency: diagnosis and treatment with alpha tocopherol. *The Journal of pediatrics* **100**: 51-58
- Gupta SK, Sharma S, Santisree P, Kilambi HV, Appenroth K, Sreelakshmi Y, Sharma R** (2014) Complex and shifting interactions of phytochromes regulate fruit development in tomato. *Plant, cell & environment* **37**: 1688-1702
- 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
- Hernández-Verdeja T, Strand Å** (2018) Retrograde signals navigate the path to chloroplast development. *Plant physiology* **176**: 967-976
- Hershey HP, Barker RF, Idler KB, Lissemore JL, Quail PH** (1985) Analysis of cloned cDNA and genomic sequences for phytochrome: complete amino acid sequences for two gene products expressed in etiolated *Avena*. *Nucleic acids research* **13**: 8543-8559
- Huang H, McLoughlin KE, Sorkin ML, Burgie ES, Bindbeutel RK, Vierstra RD, Nusinow DA** (2019) PCH1 regulates light, temperature, and circadian signaling as a structural component of phytochrome B-photobodies in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**: 8603-8608

- Huq E, Al-Sady B, Hudson M, Kim C, Apel K, Quail PH** (2004) Phytochrome-interacting factor 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis. *Science* **305**: 1937-1941
- Ibañez C, Delker C, Martinez C, Bürstenbinder K, Janitza P, Lippmann R, Ludwig W, Sun H, James GV, Klecker M** (2018) Brassinosteroids dominate hormonal regulation of plant thermomorphogenesis via BZR1. *Current Biology* **28**: 303-310. e303
- Janků M, Luhová L, Petřivalský M** (2019) On the Origin and Fate of Reactive Oxygen Species in Plant Cell Compartments. *Antioxidants* **8**: 105
- Jiang K, Liberatore KL, Park SJ, Alvarez JP, Lippman ZB** (2013) Tomato yield heterosis is triggered by a dosage sensitivity of the florigen pathway that fine-tunes shoot architecture. *PLoS genetics* **9**: e1004043
- Jung J-H, Domijan M, Klose C, Biswas S, Ezer D, Gao M, Khattak AK, Box MS, Charoensawan V, Cortijo S** (2016) Phytochromes function as thermosensors in Arabidopsis. *Science* **354**: 886-889
- Kami C, Lorrain S, Hornitschek P, Fankhauser C** (2010) Light-regulated plant growth and development. *In* Current topics in developmental biology, Vol 91. Elsevier, pp 29-66
- Khan M, Rozhon W, Poppenberger B** (2014) The role of hormones in the aging of plants-a mini-review. *Gerontology* **60**: 49-55
- Kim JH, Woo HR, Kim J, Lim PO, Lee IC, Choi SH, Hwang D, Nam HG** (2009) Trifurcate feed-forward regulation of age-dependent cell death involving miR164 in Arabidopsis. *Science* **323**: 1053-1057
- Kim JJ, Lee JH, Kim W, Jung HS, Huijser P, Ahn JH** (2012) The microRNA156-SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE3 module regulates ambient temperature-responsive flowering via FLOWERING LOCUS T in Arabidopsis. *Plant Physiology* **159**: 461-478
- Klee HJ, Giovannoni JJ** (2011) Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annual review of genetics* **45**: 41-59
- Koini MA, Alvey L, Allen T, Tilley CA, Harberd NP, Whitelam GC, Franklin KA** (2009) High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the bHLH transcription factor PIF4. *Current Biology* **19**: 408-413
- Krieger U, Lippman ZB, Zamir D** (2010) The flowering gene SINGLE FLOWER TRUSS drives heterosis for yield in tomato. *Nature genetics* **42**: 459
- Kumar SV, Lucyshyn D, Jaeger KE, Alós E, Alvey E, Harberd NP, Wigge PA** (2012) Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering. *Nature* **484**: 242
- Kunihiro A, Yamashino T, Nakamichi N, Niwa Y, Nakanishi H, Mizuno T** (2011) Phytochrome-interacting factor 4 and 5 (PIF4 and PIF5) activate the homeobox ATHB2 and auxin-inducible IAA29 genes in the coincidence mechanism underlying photoperiodic control of plant growth of Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology* **52**: 1315-1329
- Legris M, Klose C, Burgie ES, Rojas CCR, Neme M, Hiltbrunner A, Wigge PA, Schäfer E, Vierstra RD, Casal JJ** (2016) Phytochrome B integrates light and temperature signals in Arabidopsis. *Science* **354**: 897-900
- Leivar P, Quail PH** (2011) PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends in plant science* **16**: 19-28
- Lifschitz E, Eshed Y** (2006) Universal florigenic signals triggered by FT homologues regulate growth and flowering cycles in perennial day-neutral tomato. *Journal of experimental botany* **57**: 3405-3414
- Lifschitz E, Eviatar T, Rozman A, Shalit A, Goldshmidt A, Amsellem Z, Alvarez JP, Eshed Y** (2006) The tomato FT ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 6398-6403
- Lira BS, Gramegna G, Trench BA, Alves FR, Silva EM, Silva GF, Thirumalaikumar VP, Lupi AC, Demarco D, Purgatto E** (2017) Manipulation of a senescence-associated gene improves fleshy fruit yield. *Plant physiology* **175**: 77-91
- Lira BS, Rosado D, Almeida J, de Souza AP, Buckeridge MS, Purgatto E, Guyer L, Hörtensteiner S, Freschi L, Rossi M** (2016) Pheophytinase knockdown impacts carbon metabolism and nutraceutical content under normal growth conditions in tomato. *Plant and Cell Physiology* **57**: 642-653
- Liu X, Chen C-Y, Wang K-C, Luo M, Tai R, Yuan L, Zhao M, Yang S, Tian G, Cui Y** (2013) PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3 associates with the histone deacetylase HDA15 in repression of chlorophyll biosynthesis and photosynthesis in etiolated Arabidopsis seedlings. *The Plant Cell* **25**: 1258-1273
- Liverman JL** (1960) Control of growth and reproductive processes by red and far-red light. *Radiation Research Supplement* **2**: 133-156
- Llorente B, D'andrea L, Ruiz-Sola MA, Botterweg E, Pulido P, Andilla J, Loza-Alvarez P, Rodriguez-Concepcion M** (2016) Tomato fruit carotenoid biosynthesis is adjusted to actual ripening progression by a light-dependent mechanism. *The Plant Journal* **85**: 107-119

- Lockhart J** (2013) Frenemies: antagonistic bHLH/bZIP transcription factors integrate light and reactive oxygen species signaling in Arabidopsis. *In. Am Soc Plant Biol*
- Lupi ACD, Lira BS, Gramegna G, Trench B, Alves FRR, Demarco D, Peres LEP, Purgatto E, Freschi L, Rossi M** (2019) *Solanum lycopersicum* GOLDEN 2-LIKE 2 transcription factor affects fruit quality in a light-and auxin-dependent manner. *PLoS one* **14**: e0212224
- Martín G, Leivar P, Ludevid D, Tepperman JM, Quail PH, Monte E** (2016) Phytochrome and retrograde signalling pathways converge to antagonistically regulate a light-induced transcriptional network. *Nature communications* **7**: 11431
- Martínez C, Espinosa-Ruiz A, de Lucas M, Bernardo-García S, Franco-Zorrilla JM, Prat S** (2018) PIF4-induced BR synthesis is critical to diurnal and thermomorphogenic growth. *The EMBO journal* **37**
- Mathur P, Ding Z, Saldeen T, Mehta JL** (2015) Tocopherols in the prevention and treatment of atherosclerosis and related cardiovascular disease. *Clinical Cardiology* **38**: 570-576
- McDonald MS** (2003) Photobiology of higher plants. John Wiley & Sons
- Meyer RS, Purugganan MD** (2013) Evolution of crop species: genetics of domestication and diversification. *Nature reviews genetics* **14**: 840
- Miret JA, 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
- Moe R, Grimstad SO, Gislérød H** (2005) The use of artificial light in year round production of greenhouse crops in Norway. *In V International Symposium on Artificial Lighting in Horticulture* 711, pp 35-42
- Molinero-Rosales N, Latorre A, Jamilena M, Lozano R** (2004) SINGLE FLOWER TRUSS regulates the transition and maintenance of flowering in tomato. *Planta* **218**: 427-434
- Moon J, Zhu L, Shen H, Huq E** (2008) PIF1 directly and indirectly regulates chlorophyll biosynthesis to optimize the greening process in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 9433-9438
- Müller NA, Wijnen CL, Srinivasan A, Ryngajllo M, Ofner I, Lin T, Ranjan A, West D, Maloof JN, Sinha NR** (2016) Domestication selected for deceleration of the circadian clock in cultivated tomato. *Nature genetics* **48**: 89
- Müller NA, Zhang L, Koornneef M, Jiménez-Gómez JM** (2018) Mutations in EID1 and LNK2 caused light-conditional clock deceleration during tomato domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**: 7135-7140
- Nguyen CV, Vrebalov JT, Gapper NE, Zheng Y, Zhong S, Fei Z, Giovannoni JJ** (2014) Tomato GOLDEN2-LIKE transcription factors reveal molecular gradients that function during fruit development and ripening. *The Plant Cell* **26**: 585-601
- Ni W, Xu S-L, Tepperman JM, Stanley DJ, Maltby DA, Gross JD, Burlingame AL, Wang Z-Y, Quail PH** (2014) A mutually assured destruction mechanism attenuates light signaling in Arabidopsis. *Science* **344**: 1160-1164
- Nieto C, López-Salmerón V, Davière J-M, Prat S** (2015) ELF3-PIF4 interaction regulates plant growth independently of the evening complex. *Current Biology* **25**: 187-193
- Niwa Y, Yamashino T, Mizuno T** (2009) The circadian clock regulates the photoperiodic response of hypocotyl elongation through a coincidence mechanism in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology* **50**: 838-854
- Nomoto Y, Kubozono S, Yamashino T, Nakamichi N, Mizuno T** (2012) Circadian clock-and PIF4-controlled plant growth: a coincidence mechanism directly integrates a hormone signaling network into the photoperiodic control of plant architectures in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology* **53**: 1950-1964
- Nozue K, Covington MF, Duek PD, Lorrain S, Fankhauser C, Harmer SL, Maloof JN** (2007) Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature* **448**: 358
- Nusinow DA, Helfer A, Hamilton EE, King JJ, Imaizumi T, Schultz TF, Farré EM, Kay SA** (2011) The ELF4–ELF3–LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature* **475**: 398
- Organization WH** (2004) Food and agriculture organization of the United Nations. Vitamin and mineral requirements in human nutrition **2**
- Orzaez D, Mirabel S, Wieland WH, Granell A** (2006) Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant physiology* **140**: 3-11
- Oski FA, Barness LA** (1967) Vitamin E deficiency: a previously unrecognized cause of hemolytic anemia in the premature infant. *The Journal of pediatrics* **70**: 211-220
- Osorio S, Scossa F, Fernie A** (2013) Molecular regulation of fruit ripening. *Frontiers in plant science* **4**: 198

- Ouahchi K, Arita M, Kayden H, Hentati F, Hamida MB, Sokol R, Arai H, Inoue K, Mandel J-L, Koenig M** (1995) Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the α -tocopherol transfer protein. *Nature genetics* **9**: 141
- Park E, Park J, Kim J, Nagatani A, Lagarias JC, Choi G** (2012) Phytochrome B inhibits binding of phytochrome-interacting factors to their target promoters. *The Plant Journal* **72**: 537-546
- Peh HY, Tan WD, Liao W, Wong WF** (2016) Vitamin E therapy beyond cancer: Tocopherol versus tocotrienol. *Pharmacology & Therapeutics* **162**: 152-169
- Petrillo E, Herz MAG, Fuchs A, Reifer D, Fuller J, Yanovsky MJ, Simpson C, Brown JW, Barta A, Kalyna M** (2014) A chloroplast retrograde signal regulates nuclear alternative splicing. *Science* **344**: 427-430
- Pino LE, Lombardi-Crestana S, Azevedo MS, Scotton DC, Borgo L, Quecini V, Figueira A, Peres LE** (2010) The Rg1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato 'Micro-Tom' model system. *Plant methods* **6**: 23
- Pnueli L, Carmel-Goren L, Hareven D, Gutfinger T, Alvarez J, Ganai M, Zamir D, Lifschitz E** (1998) The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1. *Development* **125**: 1979-1989
- Powell AL, Nguyen CV, Hill T, Cheng KL, Figueroa-Balderas R, Aktas H, Ashrafi H, Pons C, Fernández-Muñoz R, Vicente A** (2012) Uniform ripening encodes a Golden 2-like transcription factor regulating tomato fruit chloroplast development. *Science* **336**: 1711-1715
- Qiu Y, Li M, Jean R, Moore CM, Chen M** (2019) Daytime temperature is sensed by phytochrome B in Arabidopsis through a transcriptional activator HEMERA. *Nature communications* **10**: 140
- Quadrana L, Almeida J, Otaiza SN, Duffy T, Da Silva JVC, de Godoy F, Asís R, Bermúdez L, Fernie AR, Carrari F** (2013) Transcriptional regulation of tocopherol biosynthesis in tomato. *Plant molecular biology* **81**: 309-325
- Quadrana L, Rodriguez MC, López M, Bermudez L, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Descalzo A, Asis R, Rossi M, Asurmendi S** (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* **156**: 1278-1291
- Rauf M, Arif M, Dortay H, Matallana-Ramírez LP, Waters MT, Nam HG, Lim PO, Mueller-Roeber B, Balazadeh S** (2013) ORE1 balances leaf senescence against maintenance by antagonizing G2-like-mediated transcription. *EMBO reports* **14**: 382-388
- Renato M, Pateraki I, Boronat A, Azcón-Bieto J** (2014) Tomato fruit chromoplasts behave as respiratory bioenergetic organelles during ripening. *Plant physiology* **166**: 920-933
- Sakuraba Y, Jeong J, Kang M-Y, Kim J, Paek N-C, Choi G** (2014) Phytochrome-interacting transcription factors PIF4 and PIF5 induce leaf senescence in Arabidopsis. *Nature communications* **5**: 4636
- Salamini F, Özkan H, Brandolini A, Schäfer-Pregl R, Martin W** (2002) Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. *Nature Reviews Genetics* **3**: 429
- Sarwat M, Naqvi AR, Ahmad P, Ashraf M, Akram NA** (2013) Phytohormones and microRNAs as sensors and regulators of leaf senescence: assigning macro roles to small molecules. *Biotechnology advances* **31**: 1153-1171
- Schauer N, Semel Y, Roessner U, Gur A, Balbo I, Carrari F, Pleban T, Perez-Melis A, Bruedigam C, Kopka J** (2006) Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nature biotechnology* **24**: 447
- Shen Y, Khanna R, Carle CM, Quail PH** (2007) Phytochrome induces rapid PIF5 phosphorylation and degradation in response to red-light activation. *Plant physiology* **145**: 1043-1051
- Shikata H, Hanada K, Ushijima T, Nakashima M, Suzuki Y, Matsushita T** (2014) Phytochrome controls alternative splicing to mediate light responses in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 18781-18786
- Shin J, Kim K, Kang H, Zulfugarov IS, Bae G, Lee C-H, Lee D, Choi G** (2009) Phytochromes promote seedling light responses by inhibiting four negatively-acting phytochrome-interacting factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 7660-7665
- Song Y, Yang C, Gao S, Zhang W, Li L, Kuai B** (2014) Age-triggered and dark-induced leaf senescence require the bHLH transcription factors PIF3, 4, and 5. *Molecular plant* **7**: 1776-1787
- Soyk S, Müller NA, Park SJ, Schmalenbach I, Jiang K, Hayama R, Zhang L, Van Eck J, Jiménez-Gómez JM, Lippman ZB** (2017) Variation in the flowering gene SELF PRUNING 5G promotes day-neutrality and early yield in tomato. *Nature Genetics* **49**: 162

- Spicher L, Almeida J, Gutbrod K, Pipitone R, Dörmann P, Glauser G, Rossi M, Kessler F** (2017) Essential role for phytol kinase and tocopherol in tolerance to combined light and temperature stress in tomato. *Journal of experimental botany* **68**: 5845-5856
- Srikanth A, Schmid M** (2011) Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cellular and molecular life sciences* **68**: 2013-2037
- Stavang JA, Gallego-Bartolomé J, Gómez MD, Yoshida S, Asami T, Olsen JE, García-Martínez JL, Alabadí D, Blázquez MA** (2009) Hormonal regulation of temperature-induced growth in Arabidopsis. *The Plant Journal* **60**: 589-601
- Stephenson PG, Fankhauser C, Terry MJ** (2009) PIF3 is a repressor of chloroplast development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 7654-7659
- Sun J, Qi L, Li Y, Chu J, Li C** (2012) PIF4-mediated activation of YUCCA8 expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating Arabidopsis hypocotyl growth. *PLoS genetics* **8**: e1002594
- Toledo-Ortiz G, Huq E, Rodríguez-Concepción M** (2010) Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 11626-11631
- Toledo-Ortiz G, Johansson H, Lee KP, Bou-Torrent J, Stewart K, Steel G, Rodríguez-Concepción M, Halliday KJ** (2014) The HY5-PIF regulatory module coordinates light and temperature control of photosynthetic gene transcription. *PLoS genetics* **10**: e1004416
- Trebst A, Depka B, Jäger J, Oettmeier W** (2004) Reversal of the inhibition of photosynthesis by herbicides affecting hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by plastoquinone and tocopheryl derivatives in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science* **60**: 669-674
- Tripathy BC, Oelmüller R** (2012) Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant signaling & behavior* **7**: 1621-1633
- Vicente MH, Zsögön A, de Sá AFL, Ribeiro RV, Peres LE** (2015) Semi-determinate growth habit adjusts the vegetative-to-reproductive balance and increases productivity and water-use efficiency in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of plant physiology* **177**: 11-19
- Xie Y, Liu Y, Wang H, Ma X, Wang B, Wu G, Wang H** (2017) Phytochrome-interacting factors directly suppress MIR156 expression to enhance shade-avoidance syndrome in Arabidopsis. *Nature communications* **8**: 348

OBJETIVOS

Considerando-se que as proteínas PIF são fatores chave da sinalização luminosa, da importância da sinalização luminosa para a atividade plastidial e desta para a determinação da produtividade e qualidade nutricional, este trabalho tem como hipótese que a modulação da expressão de PIFs terá um impacto sobre a produtividade e qualidade nutricional. Assim, o objetivo geral do projeto é caracterizar funcionalmente as PIFs de tomateiro. Para isto, propõem-se os seguintes objetivos específicos: (I) estudar a diversidade, história evolutiva e perfil de expressão dos genes *SIPIFs*; (II) avaliar o efeito da luz sobre o metabolismo de VTE e a participação das SIPIFs como fatores regulatórios; (III) avaliar o impacto do silenciamento do gene *SIPIF4* sobre a produtividade e qualidade nutricional. Assim, o trabalho está organizado em três capítulos que compreendem os objetivos mencionados:

Capítulo I: Diversidade, História Evolutiva e Perfil de Expressão de *SIPIFs*

- 1) Estudo filogenético e evolutivo dos genes *PIF* em Viridiplantae.
- 2) Caracterização do perfil de transcritos de *SIPIFs* durante:
 - a. o desestiolamento de plântulas;
 - b. ao longo da senescência induzida por escuro;
 - c. ao longo do fotoperíodo e;
 - d. o amadurecimento de frutos.

Capítulo II: Efeito da luz sobre o metabolismo de VTE e a participação das SIPIFs como fatores regulatórios

- 1) Estudar o efeito da luz sobre o acúmulo de VTE;
- 2) Estudar o efeito da luz sobre a expressão dos genes da rota biossintética de VTE e;
- 3) Estudar a regulação direta por SIPIFs dos genes responsivos à luz.

Capítulo III: Impacto do silenciamento do gene *SIPIF4* sobre a produtividade e qualidade nutricional

- 1) Obtenção de linhagens de tomateiro silenciadas para o gene *SIPIF4*.
- 2) Avaliação fenotípica de linhagens silenciadas para o gene *SIPIF4*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

*“A story must be told or there'll be no story, yet it is the
untold stories that are most moving.”*

J. R. R. Tolkien

Considerando-se a importância da luz para o desenvolvimento vegetal, a manipulação da percepção e sinalização luminosa é uma estratégia eficiente para a engenharia de diversos caracteres simultaneamente. No entanto, a falta de conhecimento sobre os fatores de transcrição PIF, componentes centrais da rede regulatória controlada por luz, limita a aplicação dessa estratégia em tomateiro. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo a caracterização dos genes *PIF* em *Solanum lycopersicum*. Para isto, foram estabelecidos três objetivos específicos.

O primeiro visou a identificação dos genes *SIPIF*. A partir de uma extensa análise filogenética, foram descobertos seis genes em tomateiro e foi estabelecida a relação de ortologia com os genes correspondentes da espécie modelo *A. thaliana*. Ainda, por meio da datação dos eventos de divergência entre genes parálogos, foi possível compreender a importância dos eventos de duplicação genômica ao longo da história evolutiva de Viridiplantae na diversificação dessa família gênica em Solanaceae. Diferentes pressões evolutivas atuaram sob os genes duplicados, culminando na sub- e neofuncionalização de diversos deles, atestada pelo perfil transcricional dos *SIPIF* sob diferentes condições luminosas e contextos fisiológicos. Por fim, foi possível propor a forte conservação funcional dentro do clado PIF4, comparando-se o comportamento dos transcritos de *SIPIF4* ao dos seus ortólogos *AtPIF4* e *AtPIF5* sob semelhantes condições. Estes conhecimentos foram aplicados nos capítulos seguintes.

O segundo objetivo teve por fim investigar o papel de SIPIFs na determinação da qualidade nutricional em tomateiro, especificamente na regulação da síntese de VTE. Para isto, primeiramente foi necessário comprovar a influência da luz no metabolismo de VTE. Em frutos destacados, a luz induz o acúmulo de VTE por meio da ativação de genes dessa rota biossintética, de maneira PHY-dependente. Em seguida, viu-se que esta regulação PHY-dependente é mediada pela proteína SIPIF3, que se liga diretamente ao promotor do principal gene que regula o acúmulo de VTE, *GGDR*, inibindo-o. Desta forma, descobriu-se mais uma rota plastidial regulada por luz e o primeiro fator de transcrição a regular diretamente a biossíntese de VTE.

O terceiro objetivo propôs a caracterização de linhagens silenciadas constitutivamente para o gene *SIPIF4*, escolhido como alvo dada a sugerida semelhança funcional aos ortólogos em *A. thaliana*. Nestas plantas, foram observados efeitos pleiotrópicos durante o desenvolvimento vegetativo, floração, frutificação e desenvolvimento dos frutos. O silenciamento teve como principais consequências a diminuição da produtividade, causada pelo crescimento reduzido,

alterado particionamento de carbono e reduzida produção de flores; bem como o aumento do conteúdo de carotenoides nos frutos. Estes resultados comprovam concretamente a conservação funcional do clado PIF4, comparando-se os efeitos sobre a produtividade em diferentes espécies (e.g. *A. thaliana*, *O. sativa*, *Z. mays*). Sugerem, ainda, que as diferentes SIPIFs até o momento estudadas (SIPIF1a, SIPIF3 e SIPIF4) convergem na determinação do conteúdo nutricional de tomateiro.

Concluindo, este trabalho trouxe contribuições valiosas à área, conectando-se a estudos anteriores do grupo sobre determinação do conteúdo de VTE, regulação da senescência foliar e papel dos fitocromos na fisiologia dos frutos. Porém, deixa diversas questões abertas e sugere novos caminhos a serem explorados. Por exemplo, não se sabe se diversificação transcricional dos genes parálogos *SIPIF1a* e *SIPIF1b* acarreta em diferenças funcionais significativas entre as proteínas por eles codificadas; e também se a manipulação dos níveis de SIPIF3 afeta a produção de VTE sob condições normais de cultivo. Tampouco foi possível encontrar uma explicação robusta para os efeitos do silenciamento de *SIPIF4* sobre o tempo de amadurecimento e o aumento do conteúdo de carotenoides em frutos, sugerindo a possível participação de algum fator ainda desconhecido. Por fim, a observada perda de responsividade à temperatura em plantas silenciadas para *SIPIF4*, abre portas para o estudo aprofundado do efeito desse fator ambiental na fisiologia do tomateiro. Trabalhos atuais do grupo mostram um envolvimento dos PHYs na percepção de temperatura em folhas e frutos. Neste contexto, o estudo das *SIPIF4*-silenciadas sob diferentes temperaturas poderia iluminar os mecanismos regulatórios da termo-responsividade em tomateiro e auxiliar a obtenção de cultivares resistentes a condições ambientais extremas.