UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

GERALDO FELIPE FERREIRA E SILVA

A inter-relação entre as vias miR156/*SBP* e o fitormônio giberelina no controle da transição de fase vegetativo-reprodutivo em tomateiro

Piracicaba
2016

GERALDO FELIPE FERREIRA E SILVA

A inter-relação entre as vias miR156/*SBP* e o fitormônio giberelina no controle da transição de fase vegetativo-reprodutivo em tomateiro

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Fábio Tebaldi Silveira Nogueira

Piracicaba

2016

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Silva, Geraldo Felipe Ferreira e
A inter-relação entre as vias miR156/*SBP* e o fitormônio giberelina no controle da transição de fase vegetativo-reprodutivo em tomateiro / Geraldo Felipe Ferreira e Silva; orientador Fábio Tebaldi Silveira Nogueira. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.
88 p. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Cruzamentos 2. Desenvolvimento vegetal 3. Floração 4. Genes reguladores 5. Genética do desenvolvimento 6. Genética fisiológica 7. Hormônios vegetais 8. Maturação vegetal 9. Mutação genética 10. Plantas transgênicas I. Título

CDU 575.16 : (577.218 + 577.175.1)

AGRADECIMENTOS

A FAPESP pela concessão da bolsa de Doutorado no Brasil, pela concessão da bolsa BEPE no período que estive em Columbus nos EUA e pelo financiamento do projeto de pesquisa do meu orientador que sustentou essa tese.

A CAPES e CNPq pela concessão da bolsa nos primeiros meses de doutorado.

Ao programa de pós-graduação Biologia na agricultura e meio ambiente (CENA/USP) pela oportunidade de doutoramento. Ao ex-secretário Fábio Oliveira e o atual secretário Gilson Costa do programa de pós-graduação por toda ajuda com os assuntos burocráticos e sempre se mostrarem disponivéis a ajudar.

Ao meu orientador professor Fábio Tebaldi Silveira Nogueira por todo o aprendizado científico e principalmente por confiar e me dar liberdade nas tomadas de decisões cruciais ao longo do desenvolvimento da minha Tese. A liberdade das decisões vem acompanhada com o peso das consequências, algo essencial a se aprender na academia.

Ao professor Lázaro Eustáquio Pereira Peres por várias contribuições ao longo do trabalho, uso da casa de vegetação, e principalmente por ter sugerido a realização do cruzamento entre as plantas transgênicas 156OE e o mutante *Lanceolate*.

Ao professor Erich Grotewold pela orientação no período que estive em Ohio nos EUA. Mesmo em pouco tempo pude aprender bastante no seu grupo de pesquisa sobre interação entre proteínas e enviazamento de resultados. Este último mudou muito a minha forma de analisar os experimentos.

A minha família. Meus pais José Maurício Ferreira e Marília M. M. Ferreira e Silva. Meu irmão e minha cunhada José Maurício Ferreira Filho e Paula Gentile. Obrigado por todo apoio, compreensão e valorização da minha carreira acadêmica. A minha, por enquanto, namorada Marcela Morato Notini. Muito obrigado pelo seu amor, companheirismo e principalmente paciência. Ter você ao meu lado na vida pessoal e acadêmica faz tudo ser mais simples e fácil.

A professora Helaine Carrer pela disponibilidade de uso da casa de vegetação e os equipamentos relacionados as análises de expressão gênica.

A professora Isabel Lopez-Diaz pela parceria estabelecida para quantificação hormonal na Universidade de Valencia na Espanha.

Ao professor Daniel Scherer de Moura que sempre se mostrou disponível a ajudar nas mais diferentes situações.

Aos membros do laboratório GMDV (Genética Molecular do Desenvolvimento Vegetal) Airton Carvalho Júnior, João Paulo Côrrea e Antoine Gady por toda a convivência e ajuda durante o meu doutorado. Ao doutorando Carlos Hernán Barrera Rojas pela ajuda na condução dos experimentos envolvendo *Arabidopsis thaliana*.

Aos membros do laboratório do professor Erich Grotewold em Columbus-Ohio em toda a sua diversidade de nacionalidades. Danielle Izilda Rodrigues da Silva, Hai-Dong Yu, Nan Jiang, Fan Yang, Eric Maina, Wilberforce Ouma, Fábio Andrés Gomez-Acosta, Fábio Andrés Gomes-Cano, Mariel Cruz e Azam Abdollahzadeh. Agradecimento especial a Wilber por todas as discussões sobre ciência.

Aos membros do LBP (Laboratório de Bioquímica de Proteinas) Juan Carlos Guerrero Abad e Tábata Bergonci. Agradecimento especial para Keini Dressano (ex-membro) pela ajuda inicial no delineamento dos experimentos envolvendo interação entre proteínas.

A Marcela Morato Notini, novamente, por toda as suas sugestões no texto dessa tese.

Ao grande amigo Paulo Henrique Ceciliato que mesmo estando muito longe ainda contribui com belas discussões sobre ciência.

Agradecimento especial ao grande amigo Eder Marques da Silva por ter participado ativamente no meu doutorado. A sua ajuda e versatilidade para resolver problemas foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço também por todas as discussões científicas sobre os nossos dados e por sempre me cobrar os resultados.

A minha estagiária Pollyanna Castilho que em menos de um ano no laboratório apresentou grande amadurecimento científico. Você foi extremamente importante e dedicada na condução de vários experimentos principalmente o relativo à aplicação de GA_3 e PBZ.

Ao amigo Frederico Almeida de Jesus pela grande ajuda na realização dos principais cruzamentos dessa tese e vários outros experimentos detalhistas como a análise da morfologia dos meristemas. A sua alegria ao ver ou discutir um resultado aliado ao seu vasto conhecimento sempre foi algo muito estimulante cientificamente.

Ao grande amigo Mateus Henrique Vicente por estar sempre pronto a ajudar seja no que for. A sua curiosidade científica, conhecimento sobre desenvolvimento de plantas e perfeccionismo foi muito importante para esse trabalho. Um agradecimento especial pela ajuda com as análises estatísticas, realmente sou muito grato por toda a sua contribuição nesse trabalho.

Aos amigos Rafael Reis e Maurícia Nardi por serem a minha família em Piracicaba.

Ao amigo Guilherme Hosaka, companheiro de república pelos momentos de descontração.

A Danielle Izilda Rodrigues da Silva por ter me recebido no começo em Ohio e ter feito essa transição muito mais fácil do que imaginava.

Aos amigos que fiz em Columbus, Danielle Izilda, Tami Coursey, Eric Maina e Gilbert Lwokya

Sit down before fact as a little child, be prepared to give up every preconceived notion, follow humbly wherever and to whatever abysses nature leads, or you shall learn nothing.”

Thomas Henry Huxley

RESUMO

SILVA, G. F. F. e. **A inter-relação entre a via miR156/*SBP* e o fitormônio giberelina no controle da transição de fase vegetativo-reprodutivo em tomateiro.** 2016. 88 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

O florescimento é um processo chave no desenvolvimento vegetal. A mudança de identidade do meristema apical de vegetativo para reprodutivo desencadeia reprogramação genética com efeitos em todo o corpo vegetal. *Arabidopsis thaliana* é conhecida como o principal modelo de estudo para esse processo apresentando até o momento cinco principais vias genéticas regulatórias. Tais vias apresentam redundância, sendo complexa a eliminação total da transição de fase nessa espécie. A via AGE, regulada pela idade da planta, tem como principais reguladores o mir156 e seus alvos diretos, os fatores de transcrição da família *SPL*/*SBP (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-like*). Uma segunda via é controlada pelo fitohormônio giberelina (GA), o qual atua de maneira oposta em *Arabidopsis thaliana* (arabidopsis) e *Solanum lycopersicum* L. (tomateiro). Em tomateiro, diferentemente de arabidopsis, o cruzamento entre mutantes com conteúdo alterado de GA e plantas transgênicas superexpressando o miR156 (156OE; SILVA et al., 2014) demonstraram efeito sinérgico no atraso do tempo de florescimento. A aplicação de GA_3 em plantas 156OE apresenta efeito similar aos cruzamentos citados sobre a transição do meristema apical. Em um dos cruzamentos entre mutantes da via GA e plantas 156OE, foi possível obter plantas apresentando completo bloqueio da transição de fase vegetativo-reprodutivo. A oferta extra do florígeno SINGLE FLOWER TRUSS (SFT) via enxertia não foi suficiente para restaurar a transição de fase nessas plantas, sugerindo que vias associadas à GA e *AGE* regulam alvos em comum, os quais podem ser independentes da regulação por SFT. Além disso, a regulação transcricional, e possivelmente pós-transcricional de alguns genes *SBPs* por diferentes vias associadas à GA, sugere uma complexa inter-relação entre as vias GA e *AGE* em tomateiro durante o florescimento. A ação combinada das vias GA e *AGE* foi capaz de inibir completamente o florescimento em tomateiro, regulação oposta ao verificado na planta modelo *Arabidopsis thaliana*. O efeito inibitório de GA sobre o florescimento é também visualizado em plantas lenhosas,

sugerindo que as descobertas científicas realizadas em tomateiro podem ser expandidas para essas espécies, nas quais a experimentação é lenta e laboriosa.

Palavras-Chave: Fatores de transcrição TCP, Meristema, *procera, lateral supressor, Lanceolate.*

ABSTRACT

SILVA, G. F. F. e. **The interplay between GA (Gibberellin) and Age (miR156 node) pathways controlling tomato flowering.** 2016. 88 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

The flowering process is a major developmental event during the plant life cicle. The meristem identity switches from vegetative to reproductive, triggering substantial genetic modifications that affect the whole plant body. *Arabidopsis thaliana* is a major model for flowering with five different pathways controlling this process. These pathways are redundant, making complex the complete elimination of phase change in this species. One of the pathways is termed AGE since it is regulated by the time of development. The miR156 and its direct target *SBP (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-like)* are the main regulators of the AGE pathway. A second pathway is controlled by the phytohormone gibberellin (GA), which acts in opposite ways when comparing *Arabidopsis thaliana* and tomato. In tomato, unlike Arabidopsis, the cross between mutants with altered contents of GA and transgenic plants overexpressing the miR156 (156OE; SILVA et al, 2014) showed synergistic effect in delayed flowering time. Treatments of GA_3 in plants 156OE lead to similar effects visualized on the crosses above related to meristem transition. Among the crosses between GA mutants and 156OE plants, one double mutant could completely abolish the phase change in tomato. An extra offer of the florigen (SINGLE FLOWER TRUSS or SFT*)* by grafting experiments was unable to restore the flowering process in this double mutant. It suggests, pathways associated to GA and AGE regulate common downstream targets, which could be independent of SFT regulation. Moreover, the transcriptional regulation, and possible the post-transcriptionally regulation of some *SBP* targets by different pathways associated to GA, suggest a complex network between GA and AGE during the flowering in tomato. The combined action of GA and AGE pathways can complete impaired the flowering in tomato, this interaction is opposed to the model *Arabidopsis thaliana*. The negative effect of GA over the time of flowering is presented in wood plants, suggesting the scientific discoveries in tomato could be expanded to these species, which experiments are slow and laborious.

Key words: TCP transcription factors, Meristem, *procera, lateral supressor, Lanceolate.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Via de biossíntese de GA 22
Figura 2. Padrão de desenvolvimento meristemático de plântulas MT e 156OE.. 33
Figura 3. Iniciação dos primórdios foliares em plantas MT e 156OE..... 35
Figura 4. Expressão comparativa entre miR156 e seus genes-alvo..... 37
Figura 5. Genótipos avaliados quanto ao tempo de florescimento. 38
Figura 6. Quantificação por cromatografia gasosa acoplada à espectometria de massa (GC-MS) das formas bioativas de GA, GA_1 e GA_4.. 41
Figura 7. Análise de expressão relativa via qPCR nos genótipos MT, *ls-1, pro, La-1/+* e 156OE comparando ápices vegetais no quarto e 10º dia após germinação. 44
Figura 8. Análise de expressão relativa via qPCR em ápices no quatro e 10º dia após germinação comparando os genótipos MT, *ls-1, pro, La-1/+* e 156OE.. 48
Figura 9. Caracterização dos duplos transgênico-mutante 156OE*pro* e 156OE*ls*.. 50
Figura 10. Comparação morfológica dos frutos representativos dos mutantes e transgênicos simples, dos duplos e do controle MT..... 53
Figura 11. Tratamento com GA_3 e Paclobutrazol em plantulas MT e 156OE por 10 dias desde o início da germinação..... 55
Figura 12. Clonagem de *SlySBP3*, *SlyGAI* e *LA*. 57
Figura 13. Vetores para duplo hibrido. 57
Figura 14. Duplo híbrido em levedura (Cepa *pJ694-a*) testando interação entre SlySBP3 com SlyGAI e LANCEOLATE..... 59
Figura 15. Comparação entre estrutura da inflorescência..... 61
Figura 16. Ápice das plantas 20 dias após a germinação 63
Figura 17. Mutação *La-1/+* nos *backgrounds* MT e LA0335. 66
Figura 18. Cruzamento entre plantas transgênicas 156OE e mutante *soj8* no *background* Col-0.. 67
Figura 19. Efeito de oferta extra de proteína SFT no florescimento 70
Figura 20. Modelo preliminar proposto de regulação do florescimento em tomateiro.. 71

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
2. REVISÃO DA LITERATURA 17
2.1 Micro Tomateiro (MT) como modelo para estudos funcionais em plantas 17
2.2 Vias genéticas controlando o tempo de florescimento 17
2.3 Tomateiro como modelo alternativo para o florescimento 19
2.4 Controle do florescimento pelas vias GA (giberelina) e *AGE* (miR156/*SBP*) 20
2.5 Via de biossíntese de GA 21
2.6 Efeitos antagônicos de GA no controle do florescimento 22
2.7 Mutantes em tomateiro com efeitos discretos sob o florescimento 24
2.8 Redes regulatórias de miRNAs no desenvolvimento de plantas 25
3. MATERIAL E MÉTODOS 27
3.1 Cultivo de plantas de tomateiro e arabidopsis 27
3.2 Materiais vegetais e cruzamentos 27
3.3 Avaliação da transição do meristema apical de tomateiro e contagem de primórdios foliares iniciados 28
3.4 Avaliação do tempo de florescimento 28
3.5 Quantificação hormonal GA_1 e GA_4 28
3.6 Avaliação do acúmulo de transcritos via qPCR 28
3.6.1 Análise de expressão gênica em ápice vegetativo de plântulas de tomateiro MT quatro e 10 dias após a germinação 29
3.6.2 Análise de expressão gênica das folhas I, III, V e do primórdio de inflorescência de MT 29
3.6.3 Folha III (MT, 156OE, *La-1/+* e 156OE*La*) 30
3.7 Tratamento de plântulas MT e 156OE com GA_3 e paclobutrazol (PBZ) 30
3.8 Construções para Y2H e BiFC 30
3.9 Duplo híbrido em Levedura 30
3.10 Experimentos de enxertias 31
3.11 Análises estatísticas 31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 33
4.1. Transição do meristema apical vegetativo-reprodutivo em plantas Micro-Tom (MT) e plantas superexpressando o microRNA156 33
4.2 A expressão do microRNA156 e seus alvos é regulada durante o desenvolvimento de tomateiro cv. MT 36
4.3 Mutantes associados a via de GA em tomateiro apresentam alteração no tempo de florescimento 37
4.4 O atraso no florescimento dos mutantes *ls-1, pro* e *La-1/+* é relacionado ao maior acúmulo de formas bioativas de GA 39

4.5 miR156 e genes SlySBPs apresentam padrões distintos de expressão durante a transição do meristema apical em diferentes genótipos 43

4.6 Interações genéticas entre as vias *AGE* e GA 49

4.7 O tratamento com Giberelina (GA_3) acentua o atraso no florescimento em plantas 53

4.8 Interações entre proteínas das vias *AGE* e GA no controle do florescimento em tomateiro 56

4.9 Circuito regulatório envolvendo dois microRNAs (miR156 e miR319), e seus respectivos alvos, controlam o período de florescimento em tomateiro 59

4.10 Interação genética entre as vias GA e *AGE* no acesso LA0335 de tomateiro 64

4.11 Interação genética entre as vias miR156/*SPL/SBP* e miR319/*TCP4* no controle do florescimento em *Arabidopsis thaliana* 66

4.12 As vias miR156/*SPL*/*SBP* e miR319/*LA* regulam conjuntamente o gene *SFT* em tomateiro 68

5. Conclusões 73

6. Perspectivas 75

REFERÊNCIAS 77

ANEXO 87

Anexo A – Tabela de iniciadores (primers) 88

1. INTRODUÇÃO

O florescimento é a mudança mais marcante que ocorre durante o desenvolvimento vegetal. A mudança da identidade meristemática desencadeia uma substancial reprogramação alterando vias genéticas praticamente na planta inteira. *Arabidopsis thaliana*, principal modelo para o desenvolvimento floral, possui pelo menos cinco diferentes rotas genéticas controlando esse processo (WANG; CZECH; WEIGEL, 2009). Dentre estas, uma responde ao fotoperíodo e outra a vernalização, fenômenos esses muitas vezes específicos para espécies de clima temperado. O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), uma cultura tropical, emergiu como um modelo alternativo para vários aspectos do desenvolvimento, incluindo o florescimento (LIFSCHITZ et al., 2006). Para as duas vias citadas acima (fotoperíodo e vernalização), esta espécie é considerada insensível ou pouco responsiva em ambas as situações (LOZANO et al., 2009).

Outra rota regulatória do florescimento em *Arabidopsis thaliana* é controlada pelo hormônio giberelina (GA), sendo consequentemente denominada via GA de regulação (WILSON; HECKMAN; SOMERVILLE, 1992). Nessa espécie, assim como em *Petunia hybrida* (GARGUL; MIBUS; SEREK, 2013) e *Nicotiana tabacum* (GALLEGO-GIRALDO et al., 2007), GA atua promovendo o florescimento. Interessantemente, tomateiro apresenta um comportamento oposto, no qual a giberelina atua inibindo esse processo (GARCIA-HURTADO et al*.,* 2012). É importante ressaltar que, com exceção de *S. lycopersicum*, o efeito negativo da giberelina sobre o florescimento foi descrito apenas em espécies de plantas lenhosas como *Citrus spp* (GOLDBERG-MOELLER et al., 2012), *Mangifera indicus* (WILKIE; SEDGLEY; OLESEN, 2008), macieira (*Malus domestica*) (HEIDE; PRESTRUD, 2005) e *Vitis vinifera* (BOSS; THOMAS, 2002).

A via regulatória do tempo de florescimento, denominada AGE, foi descrita por Wang; Czech; Weigel (2009) e é diretamente regulada pela idade das plantas. Essa via é regulada principalmente pelo microRNA156 (miR156) e os seus alvos diretos, os fatores de transcrição do tipo *SBP (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-like*) (RHOADES et al., 2002).

MicroRNAs (miRNAs) são uma classe de pequenos RNAs não codantes endógenos (20-22 nt) que desempenham papéis importantes no desenvolvimento vegetal através da regulação negativa dos seus alvos (SCHWAB et al., 2005). A

familía do miR156 regula especificamente os fatores de transcrição SBP (CARDON et al., 1999), os quais atuam em diferentes aspectos do desenvolvimento, como mudança de fase juvenil-adulta e vegetativa-reprodutiva (SCHWAB et al., 2005; YAMAGUCHI et al., 2009; WU et al., 2009), distribuição de antocianina (GOU et al., 2011) e tricomas (YU et al., 2010), bem como no desenvolvimento inicial do ovário (SILVA et al., 2014).

Dessa forma, diferentemente do descrito em arabidopsis, é plausível sugerir que as vias GA e *AGE*, reguladas respectivamente por giberelina e miR156/*SPL/SBP*, apresentam papéis centrais na regulação do florescimento em tomateiro. Alguns avanços no entendimento dos genes e hormônios que controlam o florescimento em *S. lycopersicum* foram alcançados (SHALIT et al., 2009; LIFSCHITZ et al., 2006). No entanto, a elucidação genética das rotas regulatórias, assim como seus papéis específicos e interações, ainda são carentes de informações.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Micro Tomateiro (MT) como modelo para estudos funcionais em plantas

A cultivar miniatura de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) micro-Tom (MT) (MEISSNER et al., 1997) é considerada um modelo para estudo do desenvolvimento de plantas e o seu uso para estudos funcionais vem crescendo a cada dia (WANG et al., 2005; SUN et al., 2006; CARRERA et al., 2012; SILVA et al., 2014; MARTINEZ-BELLO; MORITZ; LOPEZ-DIAZ, 2015; LIU et al., 2016). MT possui características comparáveis a *Arabidopsis thaliana*, como seu pequeno tamanho (15-20 cm, quando cultivado em vasos de 150 mL) e curto ciclo de vida (70-90 dias), sendo adequado para experimentos envolvendo cruzamentos com mutantes (LOMBARDI-CRESTANA et al., 2012; CAMPOS et al., 2009) e produção de plantas transgênicas (WANG et al., 2005; SILVA et al., 2014; MARTINEZ-BELLO; MORITZ; LOPEZ-DIAZ, 2015; ALMEIDA et al., 2015).

Além disso, o cultivar de tomateiro MT possui crescimento determinado devido a presença do alelo *sp* para o gene *SELF - PRUNING* (MARTI et al., 2006). Essa característica simplifica o desenvolvimento da planta visto que o meristema simpodial não será capaz de reiterar o crescimento vegetativo, como ocorre nas cultivares de crescimento indeterminado. Finalmente, MT possui uma série de mutantes relacionados ao desenvolvimento, introgredidos nesse *background* genético (CARVALHO et al., 2011). As mutações já descritas para MT não envolvem modificações nas vias de biossíntese do fitormônio giberelina (GA), demonstrando que essa cultivar é um modelo apropriado para trabalhos avaliando o efeito de GA sobre o tempo de florescimento. O tomateiro pertence à família Solanaceae, a qual compreende muitas culturas importantes para a agricultura como batata, tabaco, pimenta e berinjela. Portanto, o conhecimento gerado no modelo de tomateiro MT pode ser estendido para outras culturas.

2.2 Vias genéticas controlando o tempo de florescimento

Estudos baseados em genética molecular identificaram cinco rotas que co-regulam o tempo de florescimento em *Arabidopsis thaliana*. Dentre essas vias, a

vernalização se refere à acelaração do florescimento devido à exposição a um longo período de baixas temperaturas (MICHAELS; AMASINO, 1999). O fotoperíodo regula o florescimento em resposta ao comprimento do dia e a qualidade da luz percebida (CORBESIER; COUPLAND, 2005). Esta via tem como principal efetor o gene *CONSTANS (CO)* (PUTTERILL et al., 1995). A via regulada por giberelina (GA) demonstra a necessidade desse fitohormônio para o correto padrão de florescimento das plantas (WILSON; HECKMAN; SOMERVILLE, 1992). A via autônoma está associada a reguladores endógenos que são independentes do fotoperíodo e de giberelina (KIM et al., 2009; MICHAELS, 2009). Por fim, a ultima via a ser descrita, denominada *AGE*, tem a idade da planta como fator regulador (WANG; CZECH; WEIGEL, 2009).

Essas cinco diferentes vias apresentam redundâncias regulatórias: na ausência de um determinado gene devido à presença de um alelo mutado, outra via acabando atuando para garantir o sucesso reprodutivo da planta. Assim, para obter plantas de arabidopsis com completa inibição do florescimento é necessário a produção de um triplo mutante acumulando mutações em pelo menos três vias diferentes (REEVS; COUPLAND, 2001). A produção do triplo mutante *co-2 fca-1 ga1-3* (afetando respectivamente as vias fotoperíodo, autônoma e do fitormônio giberelina), levou à formação de uma planta que não floresce em dias curtos ou longos. Esse resultado indicou que as três vias comprometidas por essas mutações são essenciais para o florescimento de arabidopsis nas condições estabelecidas. Interessantemente, o fenótipo essencialmente vegetativo do triplo mutante pôde ser revertido pelo processo de vernalização (REEVS; COUPLAND, 2001).

Em última instância, as cinco diferentes vias confluem para a indução de poucos genes como *APETALA1 (AP1)* e *LEAFY (LFY)*, os quais integram os diferentes estímulos e são responsavéis pela mudança de identidade do meristema (LOHMANN; WEIGEL, 2002). *AP1* (GUSTAFSON-BROWN; SAVIDGE; YANOFSKY, 1994) é um fator de transcrição do tipo MADS-BOX enquanto que *LFY* (WEIGEL et al., 1992) é um fator de transcrição específico de plantas.

Os diferentes estímulos ambientais são percebidos pela planta através das folhas e convertido em um sinal denominado "florígeno", o qual é translocado a longas distâncias até o meristema apical, induzindo a mudança de identidade do meristema. Esse fenômeno foi descrito na decada de 1930 por KNOTT (1934). Corbesier et al. (2007) demonstraram a identidade do gene responsável pelo

florígeno, sendo este denominado *FLOWERING LOCUS T (FT)*, um fator de transcrição pertencente a família *CENTRORADIALIS/TERMINAL FLOWER 1/SELF-PRUNING* (CETS).

O duplo mutante *leafy ft* apresenta alterações no tempo de florescimento e ausência da estrutura típica da inflorescência, uma vez que as mutações ocorrem em dois genes chaves para o processo. Entretanto, apenas essas duas mutações não são suficientes para bloquear completamente a transição floral em *Arabidopsis thaliana* (RUIZ-GARCIA et al., 1997).

2.3 O tomateiro como modelo alternativo para o florescimento

O tomateiro apresenta hábito de crescimento simpodial enquanto que em arabidopsis o crescimento é monopodial. Tais definições referem-se basicamente à forma como as novas gemas são produzidas em relação ao meristema apical (MA). Além disso, as plantas de tomateiro são consideradas perenes ou semi-perenes, enquanto que *Arabidopsis thaliana* é anual. O hábito de crescimento, além de outros fatores, parece influenciar a regulação do tempo de florescimento. Isso pode explicar, pelo menos em parte, algumas diferenças quanto à regulação do florescimento comparando-se tomateiro e arabidopsis.

A superexpressão do gene *CONSTANS (CO)* de *Arabidopsis thaliana*, assim como do gene *CO-like* de tomateiro, não afetam o tempo de florescimento em tomateiro (BEN-NAIM et al., 2006). Interessantemente, um dos genes *CO-like* de tomateiro, ao ser testado em arabidopsis, apresenta forte efeito sobre o florescimento (BEN-NAIM et al., 2006). Isso sugere que o gene *CO-like* de tomateiro é capaz de atuar desde que exista uma via funcional, o que parece não acontecer em tomateiro. De forma semelhante ao descrito para os genes *CO-like,* tomateiro não é influenciado pelo fotoperíodo, sendo assim considerado como uma planta neutra (ATHERTON; HARRIS, 1986).

A submissão de sementes de tomateiro a 4ºC por um determinado período, processo conhecido como vernalização, não afeta o número de folhas produzidas no eixo principal antes da primeira inflorescência. Isso sugere que, de forma semelhante à via do fotoperíodo que tem como um dos efetores o gene *CO*, a via de vernalização possui pouco ou nenhum efeito sob o tempo de florescimento em tomateiro. Entretanto, plântulas de tomateiro com cotilédones completamente

expandidos parecem ter o florescimento acelerado quando expostas a temperaturas entre 8ºC e 12ºC por um curto período de tempo (CALVERT, 1957; WITTWER; TEUBNER, 1957).

Os ortólogos dos genes *LFY* e *FT* em tomateiro são conhecidos como *FALSIFLORA - FA* (MOLINERO-ROSALES et al., 1999) e *SINGLE FLOWER TRUSS - SFT* (MOLINERO-ROSALES et al., 2004), respectivamente. Interessantemente, no duplo mutante *sft fa* houve um completo bloqueio da transição floral com a produção de mais de 100 folhas no eixo principal (MOLINERO-ROSALES et al., 2004).

O modelo sistêmico de indução floral, baseado no florígeno, foi descrito em plantas sensíveis ao fotoperíodo. Esse sistema atua em ultima instância como um sinal móvel transmissível a longas distâncias que, embora ativado por diferentes estímulos em diferentes sistemas florais, é comum em diferentes espécies (LIFSCHITZ et al., 2006). O gene *SFT* de tomateiro é capaz de induzir o florescimento tanto em tomateiro quanto em tabaco (*Nicotiana tabacum*), espécie da familia Solanaceae sensível ao fotoperíodo. A capacidade do *SFT* de compensar a ausência de estímulos ambientais, nesse caso o fotoperíodo indutivo, na indução do florescimento em tabaco reinforça o seu papel universal no controle do florescimento (LIFSCHITZ et al., 2006).

2.4 Controle do florescimento pelas vias GA (giberelina) e *AGE* (miR156/*SBP*)

Na ausência de estímulos pelo fotoperíodo, duas vias desempenham papéis cruciais no florescimento de arabidopsis: uma dependente da biossíntese do hormônio giberelina (WILSON; HECKMAN; SOMERVILLE, 1992) e outra mediada pela via do miR156/*SPLs*/*SBPs* (WANG; CZECH; WEIGEL, 2009).

MicroRNAs atuam regulando pós-transcricionalmente diversos genes no desenvolvimento de plantas (SCHWAB et al., 2005). A via miR156/*SPLs*/*SBPs* percebe o estímulo endógeno temporal controlando tanto a transição de fase vegetativa (juvenil – adulto) quanto a transição para o florescimento (HUIJSER; SCHMID, 2011). A diminuição do miR156 de forma dependente da idade resulta no aumento das proteínas SBPs/SPLs que promovem a transição juvenil para adulto e posteriormente a transição floral através da ativação dos genes *LFY, AP1* e MIR172 (YAMAGUCHI et al., 2009).

GA é essencial para a indução floral em dias curtos, uma vez que plantas mutantes em genes relacionados à biossíntese de GA, como *GA1*, não florescem (WILSON; HECKMAN; SOMERVILLE, 1992). Em condições de dias longos indutivos, o efeito de GA no florescimento é menos pronunciado (WILSON; HECKMAN; SOMERVILLE, 1992).

A percepção do hormônio GA se dá inicialmente através do receptor GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (GID1), que após a sua ligação a GA desencadeia a degradação do regulador transcricional DELLA. Em arabidopsis, a subfamília de proteínas DELLA é constituida por cinco membros (TYLER et al., 2004), sendo a degradação dessas proteínas mediada pelo motivo homônimo de 17 aminoácidos (DILL; JUNG; SUN, 2001). Vários estudos já demonstraram que proteínas DELLA exercem suas funções biológicas através da interação com outros fatores de transcrição (DE LUCAS et al., 2008; YANG et al., 2012; HONG et al., 2012). De forma semelhante, Yu et al. (2012) demonstraram que as proteínas DELLA de arabidopsis interagem com o fator transcricional AtSPL15 (o qual é regulado pós-transcricionalmente pelo miR156) definindo o mecanismo molecular pelo o qual GA interage com a via miR156/*SPL*/*SBP*, afetando assim o florescimento em arabidopsis (YU et al., 2012).

2.5 Via de biossíntese de GA

As giberelinas são diterpenóides tetracíclicos. A sua biossíntese se inicia com o composto geranil-geranil difosfato (GGDP), o qual é convertido em ent-caureno pela ação das enzimas ent-copalil difosfato sintase (CPS) e ent-caureno sintase (KS) (Figura 1). O ent-caureno é então convertido a GA_{12}, a primeira GA da via, pela ação de duas Citocromo P450 monooxygenases. A partir dessa etapa, existem duas vias paralelas. A primeira é conhecida como *non-13-hydroxylation* (levando a produção da forma ativa GA_4) e a segunda conhecida como *early 13- hydroxylation*, a qual produz a forma ativa GA_1 (MAGOME et al., 2013). As enzimas que catalizam as últimas etapas antes da formação das formas ativa são as dioxigenases GA20-oxidases (GA20ox) e GA3-oxidases (GA3ox) (HEDDEN; THOMAS, 2012). As enzimas GA2-oxidases (GA2ox) são responsavéis pela conversão de GA_1 e GA_4 em formas inativas (YAMAGUCHI, 2008) (Figura 1). A superexpressão de *GA20ox* em

tomateiro produziu plantas com florescimento tardio e alto conteúdo de GA_4 (GARCIA-HURTADO et al., 2012).

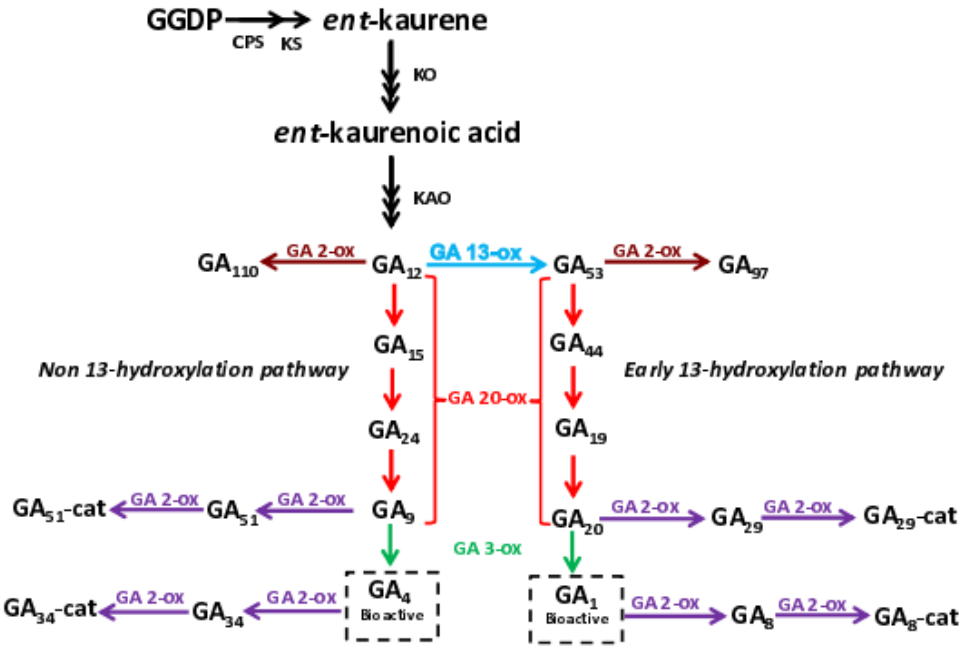

Figura 1 Via de biossíntese de GA (adaptado de MARTINEZ-BELLO; MORITZ; LOPEZ-DIAZ, 2015).

Paclobutrazol (PBZ) é uma molécula que possui um anel heterocíclico contendo um átomo de nitrogênio (N) na sua constituição. O seu efeito inibitório sobre GA é decorrente da sua ação sobre citocromo P450 monooxigenases, inibindo assim uma das etapas iniciais na via de biossíntese de GA (Figura 1) (RADEMACHER, 2000). Aplicação de PBZ tem sido extensivamente adotada em experimentos nos quais se deseja inibir a produção de giberelinas, inclusive em tomateiro (GALLEGO-GIRALDO et al., 2007; CARRERA et al., 2012; GARCIA-HURTADO et al., 2012; NIU et al., 2013; MARTINEZ-BELLO; MORITZ; LOPEZ-DIAZ, 2015; PLAZA-WÜTHRICH et al., 2016).

2.6 Efeitos antagônicos de GA no controle do florescimento

O efeito de GA sob o florescimento é complexo e muitas vezes espécie-específico. Em plantas como *Arabidopsis thaliana* (WILSON; HECKMAN; SOMERVILLE, 1992), *Petunia hybrida* (GARGUL; MIBUS; SEREK, 2013) e *Nicotiana tabacum* (GALLEGO-GIRALDO et al., 2007), usualmente GA promove o florescimento sob condições não indutivas. No entanto, em plantas perenes, GA

atua inibindo a transição do meristema (GOLDBERG-MOELLER et al., 2012; WILKIE; SEDGLEY; OLESEN, 2008; BERTELSEN; TUSTIN; WAAGEPETERSEN, 2002; BOSS; THOMAS, 2002). Embora GA promova o término do desenvolvimento vegetativo em arabidopsis em um primeiro momento (WILSON; HECKMAN; SOMERVILLE, 1992; YU et al., 2012), no estágio seguinte de desenvolvimento essa atua inibindo a formação dos verticilos florais (YAMAGUCHI et al., 2014).

P. hybrida é uma planta perene e de crescimento simpodial, assim como o tomateiro. No entanto, petunia é sensível ao fotoperíodo, sendo seu florescimento induzido por dias longos. A superexpressão de *GA2ox* nesta espécie leva a uma diminuição das formas bioativas de GA, produzindo plantas com florescimento tardio (GARGUL; MIBUS; SEREK, 2013). Semelhantemente, *N. tabacum* apresenta florescimento dependente de giberelina, uma vez que plantas deficientes em GA devido a superexpressão de *GA2ox* ou plantas selvagens tratadas com paclobutrazol (inibidor da biossíntese de GA) apresentam florescimento tardio (GALLEGO-GIRALDO et al., 2007). Esses autores demonstraram uma redução progressiva nos niveis de GA_1 e GA_4 no ápice das plantas ao longo do crescimento vegetativo, alcançando niveis muito baixos durante a transição floral.

De forma oposta ao descrito anteriomente, *Solanum lycopersicum*, assim como as espécies perenes *Mangifera indicus, Citrus spp., Malus domestica e Vitis Vinifera* (WILKIE; SEDGLEY; OLESEN, 2008; GOLDBERG-MOELLER et al., 2012; BERTELSEN; TUSTIN; WAAGEPETERSEN, 2002;BOSS; THOMAS, 2002), tem florescimento inibido por GA. Em *citrus spp*, o tratamento com GA_3 durante a indução floral reduz o número de flores produzidos, demonstrando ter um papel inibitório sobre o florescimento (GOLDBERG-MOELLER et al., 2012).

A concentração de GA nos ramos terminais responsáveis pela produção de flores diminue antes do surgimento da panicula em *M. indicus*. Além disso, a aplicação de GA_3 nos botões florais afeta negativamente o desenvolvimento das flores, sugerindo que GA apresenta efeito inibitório sobre o florescimento nessa espécie (WILKIE; SEDGLEY; OLESEN, 2008).

De forma semelhante às outras espécies citadas, GA inibe a iniciação floral em macieira (*M. domestica*) (BERTELSEN; TUSTIN; WAAGEPETERSEN, 2002). Nessa espécie, a indução do florescimento ocorre principalmente em resposta a baixas temperaturas, não respondendo ao fotoperiodismo.

GA INSENSITIVE (GAI) é uma proteína DELLA que apresenta papel central na resposta a giberelina em plantas. Mutantes de *V. vinifera* para gene ortólogo a *GAI* de arabidopsis são capazes de converter gavinhas em inflorescência, demonstrando que a gavinha de uva é uma inflorescência modificada devido à inibição do seu completo desenvolvimento floral pela ação de GA (BOSS; THOMAS, 2002). Além disso, uma vez que gavinhas e inflorescências são produzidas a partir do meristema lateral e apresentam perfil transcricional semelhantes, sugere-se que ambas as estruturas apresentam semelhanças moleculares (DAZ-RIQUELME; MARTNEZ-ZAPATER; CARMONA, 2014).

2.7 Mutantes em tomateiro com efeitos discretos sob o florescimento

Dentre os diversos mutantes que afetam a via de giberelina, *procera* ou *pro* (BASSEL; MULLEN; BEWLEY, 2008), *lateral supressor* ou *ls* (SCHUMACHER et al., 1999) e *Lanceolate* ou *La* (ORI et al., 2007) destacam-se por já terem sido exaustivamente estudados em diferentes aspectos do desenvolvimento, embora pouco se conheça sobre seus efeitos no controle do florescimento.

LANCEOLATE (*LA*) é um gene crucial para o desenvolvimento foliar, especialmente em plantas que possuem folhas compostas, como tomateiro. A relação entre *LA* e giberelina (GA) já foi estabelecida (YANAI et al., 2011; SHLEIZER-BURKO et al., 2011). Esses autores demonstram que plantas contendo o alelo mutante *La-2*, com ganho de função para o gene *LA*, apresentam maior acúmulo de *Ga20ox*, o qual está relacionado ao aumento de formas ativas de giberelina. Os alelos mutados conhecidos para *LA* se originaram de uma substituição de nucleotídeos no sítio de ligação do microRNA miR319 em um dos membros da família de fatores de transcrição do tipo *Teosinte branched1/Cincinnata/proliferating cell factor* (TCP) (CUBAS et al., 1999). Essas alterações nucleotídicas originaram alelos de ganho de função para o gene *LA*, cujos transcritos são insensíveis à regulação negativa pelo miR319 (ORI et al., 2007). Dessa forma, a via miR319/*LA* em tomateiro controla a biossíntese de GA em alguns tecidos (YANAI et al., 2011).

O gene *LATERAL SUPRESSOR (LS)* é um fator de transcrição da família GRAS (SCHUMACHER et al., 1999). No mutante *lateral supressor (ls)*, a iniciação do meristema axilar é impedida, alterando assim a arquitetura vegetativa da planta (SCHUMACHER et al., 1999). Apesar de o tempo de florescimento

aparententemente não ser afetado em *ls*-1, o número de flores por inflorescência mostra-se reduzido em relação à planta controle no *background* Antimold (SCHUMACHER et al., 1999). Tucker (1976) estimaram o conteúdo de GA nesse mutante e demonstraram maiores concentrações do hormônio em todos os tecidos analisados quando comparado ao controle.

Sabe-se que a maioria das funções do gene *GA INSENSITIVE (GAI*) está relacionada ao seu domínio DELLA. Entretanto, a mutação nesse gene associada ao mutante *procera (pro)* encontra-se num segundo domínio, denominado GRAS*.* Diferentemente do domínio DELLA, GRAS apresenta a atividade de controle transcricional, característico de fatores de transcrição. Uma vez que a mutação *pro* está associada a uma resposta constitutiva de GA, esse mutante apresenta produção de folíolos e recorte da lâmina foliar afetados (BASSEL; MULLEN; BEWLEY, 2008; JASINSKI et al., 2008). Além disso, *pro* apresenta padrão de brotação lateral diferenciado, com praticamente nenhuma brotação lateral nas axilas, e um pequeno atraso no florescimento (CARRERA et al., 2012).

2.8 Redes regulatórias de miRNAs no desenvolvimento de plantas

Além de fitormônios como GA, microRNAs desempenham papel ímpar no desenvolvimento vegetal como demonstrado por Schwab et al. (2005). A via miR156/*SPL/SBP* atua em diversos processos do desenvolvimento vegetal (CHEN et al., 2010) como mudança de fase juvenil-adulta e vegetativa-reprodutiva (SCHWAB et al., 2005; YAMAGUCHI et al., 2009; WU et al., 2009), distribuição de antocianina (GOU et al., 2011) e tricomas (YU et al., 2010), desenvolvimento inicial do ovário (SILVA et al*.,* 2014), dentre outros.

Os fatores de transcrição do tipo *SPL/SBP* apresentam um domínio de ligação ao DNA de 79 resíduos de aminoácidos altamente conservados. Este domínio caracteriza-se por possuir um motivo do tipo *zinc finger*, o qual apresenta dois sítios de ligação *zinc*: um possuindo a seqüência de aminoácidos Cys-Cys-His-Cys e o outro a seqüência Cys-Cys-Cys-His (YAMASAKI et al*.,* 2004). Os genes *SPL/SBP* foram primeiramente caracterizados como reguladores da expressão de genes *MADS-box* no florescimento precoce de *Antirrhinum majus* (KLEIN;SAEDLAR;HUIJSER*,* 1996). Dentre os genes *SPL/SBP* que são regulados pelo microRNA156 é possível distinguir dois grupos baseado no tamanho da proteína produzida e na posição do sitío de regulação para o miR156 (SALINAS et

al., 2011). Os genes *SPL/SBP* pequenos, como *SlySBP3* em tomateiro, apresentam o sítio de reconhecimento para o miR156 na região 3´ UTR. Já genes *SPL/SBP* grandes, como *SlySBP15* em tomateiro, apresentam o sítio de reconhecimento para o miR156 na região codante (SALINAS et al., 2011). Padrão semelhante quanto ao tamanho das proteínas e posição do sítio regulador é conservado em *Arabidopsis thaliana* (RHOADES et al., 2002). Algumas dessas proteínas SPLs/SBPs são capazes de se ligar a proteínas DELLA em arabidopsis (YU et al., 2012), o que permitiu a elucidação do mecanismo pela qual a via GA controla o florescimento nessa espécie. A região C-terminal das proteínas SPLs/SBPs se mostrou necessária à essa interação.

Outra via exaustivamente avaliada no contexto de desenvolvimento foliar, tanto em arabidopsis quanto em tomateiro, é a via miR319/*TCP* (PALATNIK et al., 2003; SCHOMMER et al., 2014; ORI et al., 2007; YANAI et al., 2011). Apesar de tomateiro apresentar folhas compostas, a presença do alelo mutante para o gene *LA* (TCP) o torna insensivel à ação do miR319, levando a formação de plantas com folhas simples (ORI et al., 2007). De forma semelhante ao demonstrado para proteínas DELLA (YU et al., 2012), as proteínas TCPs se ligam a SPLs/SBPs controlando a complexidade foliar em arabidopsis (RUBIO-SOMOZA et al., 2014). É interessante ressaltar que a porção C-terminal das proteínas SPLs/SBPs, essencial à interação com DELLA, é também indispensável à interação física com os TCPs. Recentemente, Burko et al. (2013) demonstraram que a proteína LA é capaz de se ligar ao promotor de alguns genes *AP1/FUL* de tomateiro, demonstrando que essa subfamília de genes *MADS-BOX* possui função no desenvolvimento foliar. Dessa forma, é possível que essa regulação seja conservada durante a transição de fase vegetativa-reprodutiva.

Assim, o objetivo principal desse trabalho foi estudar a contribuição das vias *AGE* e GA no controle do florescimento em tomateiro cv. Micro-Tom (MT), fazendo uso de mutantes e transgênicos pertencentes às duas vias. É importante salientar que, uma vez que tomateiro e diversas espécies lenhosas de interesse econômico compartilham similar mecanismo de controle de florescimento por GA, sendo este divergente da planta modelo *Arabidopsis thaliana*, os mecanismos moleculares descritos em tomateiro podem ser expandidos e gerar avanços relevantes para essas espécies, nas quais os experimentos são mais lentos e laboriosos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo de plantas de tomateiro e arabidopsis

As plantas de tomateiro cv. Micro-Tom, acesso LA0335, plantas transgênicas supreexpressando o miR156 (156OE; SILVA et al., 2014), mutantes *La-1/+ (*ORI et al., 2007), *ls-1* (SCHUMACHER et al.,1999)*,* e *pro* (BASSEL; MULLEN; BEWLEY, 2008) e os demais cruzamentos gerados foram cultivadas como descrito em LOMBARDI – CRESTANA et al. (2012). As plantas de *Arabidopsis thaliana* foram cultivadas em câmara de crescimento (Thermo Scientific) sob regime de dia longo (16 horas luz : 8 horas escuro) e temperatura de 21ºC.

3.2 Materiais vegetais e cruzamentos

Plantas superexpressando o miR156 (156OE; SILVA et al., 2014) foram geradas no *background* MT. Os mutantes *lateral supressor-1* (LOMBARDI-CRESTANA et al., 2012) e *procera* (LOMBARDI-CRESTANA et al., 2012; CARRERA et al., 2012) já haviam sido introgredidos e descritos no *background* MT. A mutação *Lanceolate-1/+* (*La-1/+*) oriunda do acesso LA0335 (TGRC) foi introgredida no *background* MT como descrito em Carvalho et al*.* (2011).

Os cruzamentos entre plantas 156OE e os mutantes *ls* e *pro* foram avançados até a geração F2, na qual as mutações estão em homozigose juntamente com a presença do transgene 156OE. No cruzamento entre plantas 156OE e *La-1/+*, plantas foram avaliadas na geração F1, visto que tanto o alelo mutante quanto o transgene se comportam como dominantes ou semi-dominantes.

Nos cruzamentos envolvendo *Arabidopsis thaliana,* todos os genótipos se encontram no *background* Columbia (*Col-0*). Plantas superexpressando o miR156 (156OE) foram descritas em Schwab et al., (2005), enquanto que o mutante *Supressor of jaw8* (*soj8)* em Palatnik et al*.,* 2007. O mutante *soj8* apresenta mutação no fator de transcrição *AtTCP4* de forma semelhante ao descrito para *Lanceolate* em tomateiro (ORI et al., 2007) De forma semelhante ao realizado em tomateiro, a interação entre as vias genéticas alteradas em *soj8* e 156OE foi avaliada na geração F1 visto que ambos se comportam como dominantes ou semi-dominantes.

3.3 Avaliação da transição do meristema apical de tomateiro e contagem de primórdios foliares iniciados

Plântulas de MT e 156OE foram avaliadas nos 1º, 4º, 7º e 10º dias após a germinação. Para cada genótipo, foram utilizadas 10 repetições por tempo de avaliação. Os meristemas foram classificados em três categorias de acordo com a sua morfologia: vegetativo, transição e reprodutivo (PARK et al., 2012; Fig. 2). O primórdio foliar foi considerado iniciado quando visualizado o estágio primórdio 1 (P1) ou outro mais avançado como descrito em Shleizer-burko et al. (2012). Estabeleceu-se como dia um de desenvolvimento aquele no qual a germinação foi aparente a olho nu, como demonstrado na Figura 2.

3.4 Avaliação do tempo de florescimento

O número de folhas no eixo principal foi mensurado até a formação da primeira inflorescência no eixo principal, evento que determina a transição de identidade do meristema apical (SAMACH;LOTAN, 2007). Foram avaliadas 14 plantas para os genótipos MT, *ls, pro, La-1/+* e 156OE, e cerca de 10 plantas para os duplos mutante-transgênico (MT, *ls ,pro,*156OE, 156OE*pro* e 156OE*ls*).

3.5 Quantificação hormonal de GA_1 e GA_4

As formas bioativas GA_1 e GA_4 foram quantificadas via cromatografia gasosa acoplada à espectometria de massa (GC-MS), de acordo com Martinez-Bello, Moritz e Lopez-Diaz (2015). Para esta análise, amostras dos genótipos MT, *ls, pro, La-1/+* e 156OE foram coletadas no quarto dia após a germinação. Foram avaliadas três amostras biológicas de cada genótipo, sendo essas compostas por um *pool* de ápice vegetativo originado de sete plântulas distintas.

3.6 Avaliação do acúmulo de transcritos via qPCR

A análise do acúmulo de mRNAs e miRNAs maduros foi realizada como descrito em Silva et al*.,* (2014), com algumas modificações. O reagente adotado nesses experimentos foi o Go Taq® qPCR Master Mix (PROMEGA). Os iniciadores específicos estão descritos no Apêndice A. Foram testados três genes como controle

endógenos: *CAC* (Solyc08g006960) e *SAND* (Solyc03g115810) descritos em Exposito-Rodrigues et al., 2008 e *TUBULINA* (Solyc04g081490) utilizado em Mounet et al., 2009. Dentre os três genes, a expressão do gene *CAC* foi a mais constante em cada experimento (dados não mostrados). Desta forma, *CAC* foi adotado como controle endógeno para a análise de expressão relativa.

3.6.1 Análise de expressão gênica em ápice vegetativo de plântulas de tomateiro MT quatro e 10 dias após a germinação

Três amostras biológicas de tecidos oriundos do ápice caulinar provenientes dos genótipos MT, *ls ,pro, La/*+ e 156OE foram coletadas no 4º e 10º dia de desenvolvimento, de acordo com a Figura 2. Cada amostra foi composta pelo *pool* de 7 ápices vegetativos eliminando os dois primórdios foliares mais expandidos, os cotiledônes e a região radicular, garantindo a obtenção exclusiva da região de interesse. Já no 10º dia, como as plantas se encontratavam mais desenvolvidas, foram eliminados os quatro primórdios foliares mais expandidos, os cotiledônes e a parte radicular.

A análise de expressão relativa via qPCR foi realizada de duas formas diferentes: Na primeira, os diferentes genótipos no quarto dia de desenvolvimento foram determinados como referência (valor de expressão igual a 1,0) e os valores de expressão obtidos no 10º dia de desenvolvimento foram comparados aos valores de expressão do quarto dia em cada genótipo separadamente. Já na segunda forma, os valores de expressão obtidos para o genótipo MT foram estabelecidos como padrão (valor de expressão igual a 1,0) e os demais genótipos tiveram sua expressão comparadas aos dados de expressão de MT, analisando separadamente os tempos 4º e 10º dias de desenvolvimento após a germinação.

3.6.2 Análise de expressão gênica das folhas I, III, V e do primórdio de inflorescência de MT

Amostras biológicas de folhas em diferentes estágios de desenvolvimento (I a V) e de primórdio da inflorescência do genótipo MT foram coletadas aos 35 dias de desenvolvimento. Cada amostra foi composta de um pool de tecido oriundo de sete plantas distintas. A análise de expressão relativa foi feita em relação a folha I, cujo valor de expressão é 1,0. A seleção da folha I como parâmetro de comparação foi determinada pois, dentre as amostras avaliadas, essa folha representa o primeiro

orgão vegetativo a ser produzido, além de apresentar a maior expressão do miR156 maduro dentre os tecidos.

3.6.3 Folha III (MT, 156OE, *La-1/+* e 156OE*La*)

Para cada genótipo foram coletadas três amostras biológicas, sendo cada uma composta pelo *pool* da folha III oriundo de três plantas distintas aos 35 dias de desenvolvimento. A análise de expressão relativa foi feita em relação a MT (valor de expressão igual a 1,0).

3.7 Tratamento de plântulas MT e 156OE com GA_3 e paclobutrazol (PBZ)

25 mL de solução foram aplicadas diariamente às plântulas de MT e 156OE do primeiro ao décimo dia após germinação (Figura 2). Os três tratamentos consistiram em água destilada, 10^{-5} M de GA_3 e 10^{-7} M de PBZ (CARRERA et al., 2012). Todas as soluções foram preparadas com adição de Tween-80 0,1% e Etanol 0,1%. Apenas água foi adicionada no caso do controle (mock). Ao final do experimento foram avaliadas 29 plantas para cada tratamento e genótipo.

3.8 Construções para Y2H e BiFC

Os genes *SlySBP3* (Solyc10g009080), *SlyGAI* (Solyc11g011260) e *LANCEOLATE (*Solyc07g062680) foram amplificados a partir de cDNA de tomateiro MT utilizando a enzima *Platinum taq DNA polymerase high fidelity* (Life technologies) e clonados no vetor de entrada pENTR D-Topo (Life technologies). A confirmação da clonagem foi feita via PCR e sequenciamento. Em sequencia, foram realizadas recombinações via LR clonase (Life technologies) para transferir os genes para os vetores de destino. Os vetores utilizados foram pDEST22 e pDEST32 para Y2H (Life technologies). Para BiFC foram adotados os vetores nEYFP e cEYFP (MARTIN et al., 2009). Os três genes foram clonados nos quatro vetores destinos citados.

3.9 Duplo híbrido em Levedura

As interações entre as proteínas SlySBP3, SlyGAI e LANCEOLATE foram testadas na cepa de levedura *pJ694-a* (JAMES; HALLADAY; CRAIG, 1996) avaliando pelo menos cinco colônias em cada interação. Após transformação com os dois vetores pDEST22 e pDEST32 contendo os genes de interesse, as leveduras foram submetidas a crescimento em três tipos de meios seletivos : -WL (ausência de

Triptofano e Leucina). -WLH (ausência de Triptofano, Leucina e Histidina). -WLHA (ausência de Triptofano, Leucina, Histidina e Adenina). O crescimento em -WL aponta apenas para a presença de ambos vetores. O crescimento em -WLH sugere interação fraca entre as proteínas testadas. O crescimento em -WLHA indica interação forte entre as proteínas testadas (JAMES; HALLADAY; CRAIG, 1996).

3.10 Experimentos de enxertias

Foram utilizadas oito repetições por cada combinação enxertada. As plantas utilizadas como cavalo apresentavam 30 dias após semeadura, enquanto as plantas usadas como cavaleiro, cerca de 20 dias após semeadura. Após a realização da enxertia um pequeno saco plástico foi mantido envolvendo a região próxima ao enxerto por sete dias com o intuito de aumentar a umidade na região enxertada. A avaliação binária (sim ou não) quanto ao florescimento foi realizada 60 dias após a enxertia.

3.11 Análises estatísticas

As amostras que apresentaram distribuição normal foram analisadas pelo Test-T Student´s $p<0,01$ no programa Assistat versão 7.7 para Windows. Para os dados não paramétricos foi usado o teste de Wilcoxon $p< 0.05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Transição do meristema apical vegetativo para reprodutivo em plantas Micro-Tom (MT) e plantas superexpressando o microRNA156

A via genética regulada pelo microRNA miR156 e *SPLs*/*SBPs* controla o período de transição da fase vegetativa para reprodutiva em diversas espécies vegetais (SCHWAB et al., 2005; XIE; WU; XIONG, 2006; CHUCK et al., 2007). Para determinar com detalhes o controle desta via genética no tempo de florescimento de tomateiro, inicialmente foi avaliada a morfologia do meristema apical de plantas MT e plantas superexpressando o miR156 (156OE; SILVA et al., 2014). Essa análise foi realizada nos dias 1º , 4º, 7º e 10º de desenvolvimento após a germinação. O padrão de análise para o tempo de desenvolvimento inicial foi estabelecido determinando como o primeiro dia aquele em que a germinação das plântulas foi visualizada a olho nu (Figura 2).

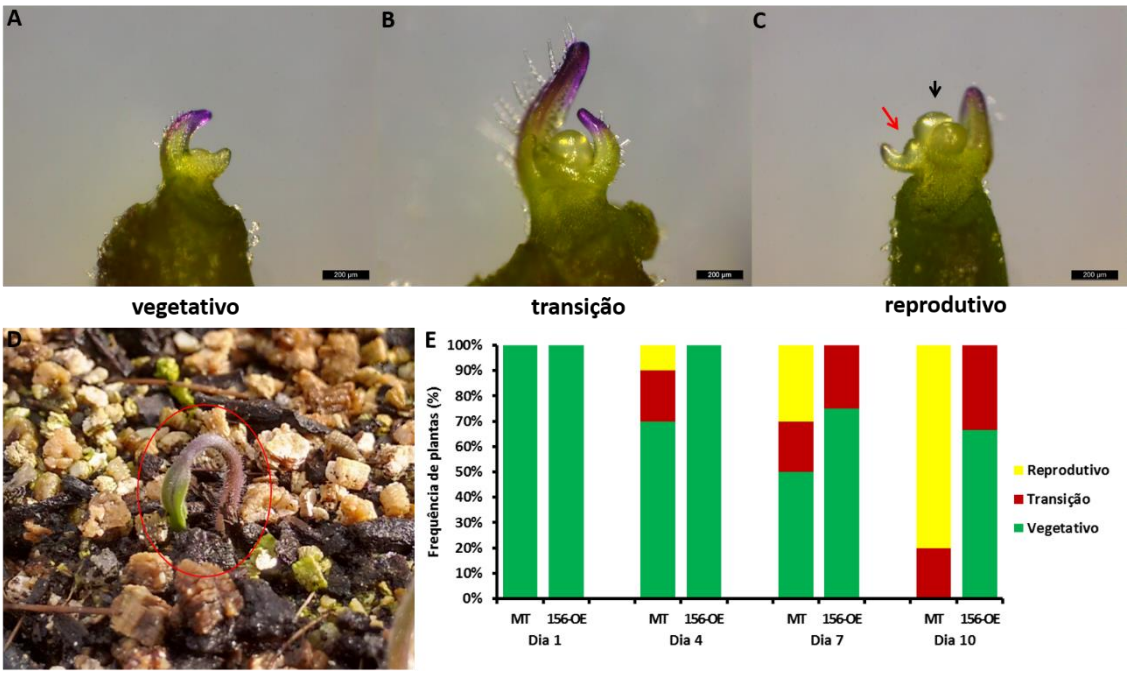

Figura 2. Padrão de desenvolvimento meristemático de plântulas MT e 156OE. **A-C**) meristemas representativos dos estágios de desenvolvimento avaliados. A seta vermelha aponta para o meristema simpodial e a seta preta mostra o meristema de inflorescência, marco da transição de fase. **D**) imagem representativa do primeiro dia de desenvolvimento. **E**) Frequência do estado meristemático de ápices de plântutas MT e 156OE ao longo do desenvolvimento do 1º ao décimo dia após germinação. Foram avaliadas 10 plântulas para cada genótipo em cada tempo de desenvolvimento. Em A, B e C, a barra preta representa 200µm.

Baseando-se na morfologia do meristema apical (Figuras 2A-C) foi possível observar que no quarto dia após germinação, algumas plantas MT já apresentavam meristema em transição e uma única planta apresentava características reprodutivas. Diferentemente, todas as plantas 156OE apresentavam-se no estágio vegetativo (Figura 2E). No sétimo dia após germinação, cerca de metade das plantas MT já se encontravam no estágio de transição ou reprodutivo enquanto apenas uma pequena porção de plantas 156OE (20%) experimentava a transição de fase (Figura 2E). No décimo dia após germinação, todas as plantas MT já haviam realizado transição, enquanto que 70% das plantas 156OE ainda se encontravam vegetativas (Figura 2E).

Os dados demonstram atraso na transição de fase do meristema apical caulinar das plantas 156OE quando comparadas à MT. A diferença no tempo de transição do meristema apical entre os genótipos MT e 156OE sugere que o atraso no florescimento e o maior número de folhas visualizados em plantas 156OE (SILVA et al., 2014) ocorre devido a manutenção prolongada do estado vegetativo do meristema apical em plantas 156OE quando comparado às plantas MT.

O número de primórdios foliares iniciados e o aparente grau de expansão foliar, macroscopicamente visualizado, foram avaliados em plantas 156OE e MT nos tempos de desenvolvimento anteriormente descritos (Figura 3A-H).

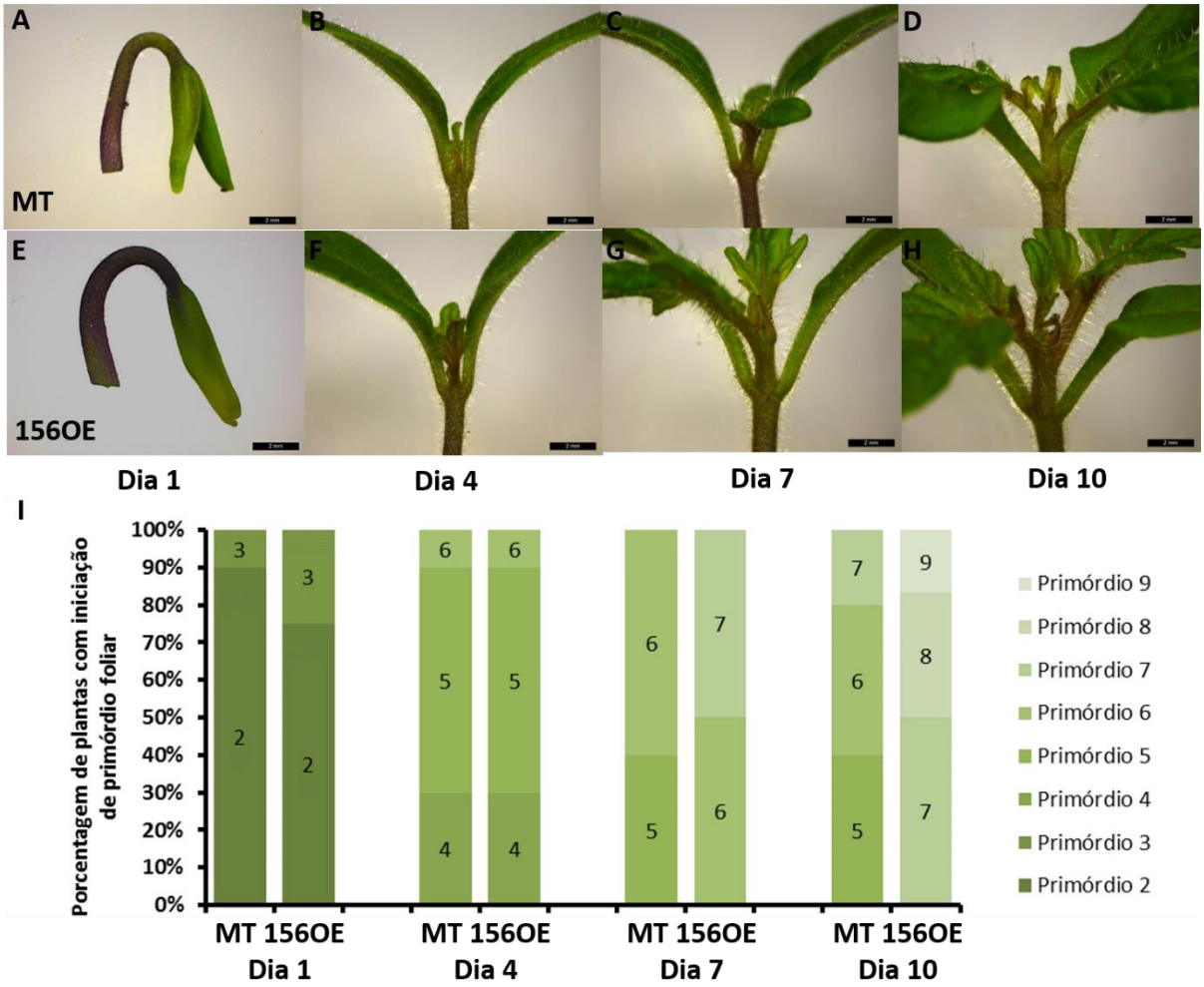

Figura 3. Iniciação dos primórdios foliares em plantas MT e 156OE. **A**-**D**) plântulas de MT nos 1º , 4º, 7º e 10º dia após germinação, respectivamente. **E**-**H**) plântulas 156OE nos 1º , 4º, 7º e 10º dia após germinação dias, respectivamente. **I**) frequência de iniciação dos diferentes primórdios ao longo de 10 dias de desenvolvimento. Foram avaliadas 10 plântulas para cada genótipo em cada tempo de desenvolvimento.

Até o quarto dia após a germinação não é possível distinguir o genótipo MT do genótipo 156OE quanto ao número de primórdios iniciados (Figuras 3A, B, E, F, I). Apesar do número de primórdios iniciados serem o mesmo, é possível perceber que o grau de expansão foliar nas plantas 156OE é maior do que em MT (Figuras 2A, B, E, F). A partir do sétimo dia após germinação, plantas de MT e 156OE são facilmente distinguíveis. Enquanto aproximadamente metade das plantas MT avaliadas apresentam meristema em transição ou reprodutivo, plantas 156OE apresentam maior número de primórdios foliares devido à manutenção do estado vegetativo de seu meristema apical (Figuras 2C, G, I).

No décimo dia, plantas 156OE apresentam sete, oito ou nove primórdios foliares iniciados, enquanto plantas MT encontram-se em sua totalidade em estado reprodutivo e produziram no máximo sete primórdios (Figuras 2D, H, I). P*lastochron* é o índice que mensura a taxa de produção foliar, levando em consideração o tempo despendido entre a iniciação de dois primórdios consecutivos. Baseado nos dados descritos, pode-se concluir que, ao menos nos dias iniciais de desenvolvimento, plantas superexpressando miR156 em tomateiro não apresentam menor *plastochron* em relação a WT, diferentemente do verificado em plantas superexpressando o mesmo precursor em *Arabidopsis thaliana* (SCHWAB et al., 2005). Em *A. thaliana*, de crescimento monopodial, o encurtamento do *plastochron* é responsável pelo maior número de folhas produzidas em plantas transgênicas com aumento dos níveis do miR156 quando comparadas ao WT. Nessa espécie, a superexpressão do miR156 elevou a taxa de produção de folhas de 1,4 para 2,2 folhas por dia, de acordo com Schwab et al. (2005). Em tomateiro, essa taxa não se mostrou alterada no inicio do desenvolvimento vegetativo, visto que no quarto dia não é possível distinguir plântulas MT e 156OE baseado no número de primórdios foliares iniciados. Assim, pode-se concluir que a via miR156/*SPL/SBP* afetou de forma distinta a formação de folhas nas espécies analisadas. Enquanto na espécie monopodial arabidopsis a taxa de iniciação foliar foi aumentada, na espécie simpodial tomateiro a duração do estado vegetativo do meristema foi prolongada.

4.2 A expressão do microRNA156 e seus alvos é regulada durante o desenvolvimento de tomateiro cv. MT

Com o intuito de avaliar se o padrão de expressão do miR156 e seus alvos é regulado pela idade dos tecidos vegetais em tomateiro, avaliou-se a expressão do miR156 maduro, *SlySBP15* e *SlySBP3* em plantas MT com 35 dias de desenvolvimento (Figura 4 C e D). Foram analisados quatro tecidos em diferentes estágios de desenvolvimento: folha I, folha III, folha V e primórdio da inflorescência, como demonstrado na Figura 4 B.

Os níveis de transcritos do miR156 maduro diminuem a partir da folha V e também no primórdio da inflorescência. Em contra partida, o nível de expressão tanto de *SlySBP3* quanto de *SlySBP15* aumenta dos tecidos vegetativos para o

reprodutivo, demonstrando uma correlação negativa entre acúmulo do miR156 e dos seus dois alvos *SBPs* avaliados.

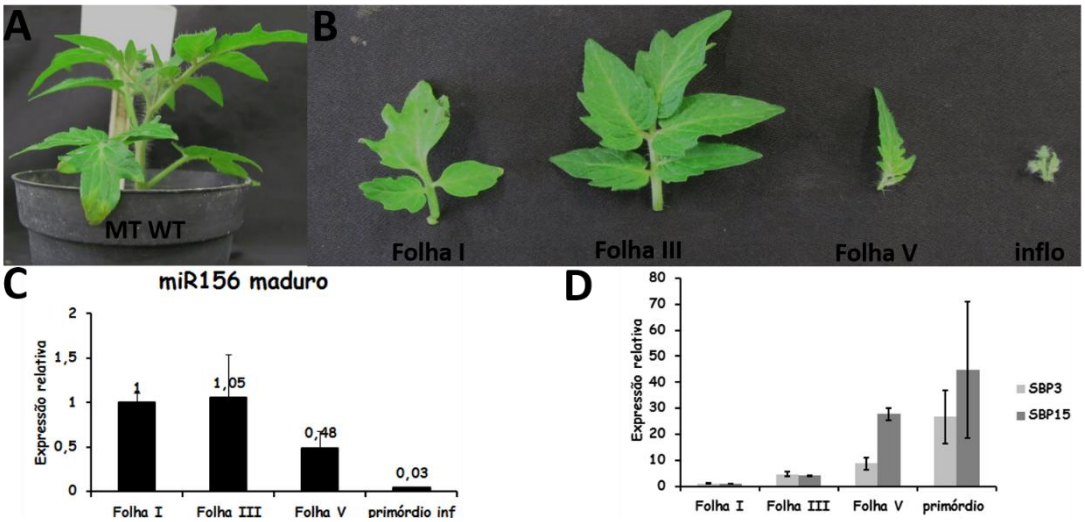

Figura 4. Expressão comparativa entre miR156 e seus genes-alvo. A) Planta MT com 35 dias de desenvolvimento. B) Tecidos avaliados para MT. C) Padrão de expressão do miR156 em MT entre os diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento. D) Padrão de expressão de *SlySBP3* e *SlySBP15* em MT entre os diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento. As barras verticais representam a médio e o erro padrão entre três amostras biológicas. Cada amostra foi composta pelo *pool* de tecidos advindos de sete plantas.

Os dados sugerem que a via miR156/*SPL/SBP* em tomateiro é regulada diferencialmente em tecidos jovens e maduros, incluindo tecidos reprodutivos, como descrito em arabidopsis (SCHWARZ et al., 2008). Interessantemente, os níveis de transcritos das *SlySBP3* e *SlySBP15* aumentam na folha V, a qual é , em média, a última folha a ser produzida na cultivar MT antes do aparecimento do primeiro primórdio visível de inflorescência (VICENTE et al., 2015). É possível que o aumento de expressão dessas *SlySBPs*, devido principalmente a redução de acúmulo de transcritos do miR156, seja o sinal desencadeador nos tecidos foliares para induzir a competência das plantas de tomateiro para florescerem.

4.3 Mutantes associados à via de GA em tomateiro apresentam alteração no tempo de florescimento

Foi demonstrado em arabidopsis que a via genética miR156/*SPL/SBP* interage com a via de sinalização do fitormônio giberelina para controlar o período de florescimento naquela espécie. Interessantemente, enquanto giberelina promove

o florescimento em arabidopsis, este fitormônio atrasa o florescimento em tomateiro (GARCIA-HURTADO et al., 2012). Portanto, fez-se necessária a análise de como e se a via miR156/*SPL*/*SBP* interage com a via de sinalização de giberelina em tomateiro. Para tal, foi inicialmente estimado o tempo de florescimento entre diferentes genótipos que possuem alterações nos níveis de giberelina ou na resposta de sinalização a esse fitormônio (SCHUMACHER et al., 1999; BASSEL; MULLEN; BEWLEY, 2008; YANAI et al., 2011).

Em tomateiro, o tempo de florescimento é medido pela contagem do número de folhas no eixo principal da planta após visualização do primeiro botão floral (SAMACH; LOTAN, 2007). Foi, portanto, mensurado o número de folhas produzidos no eixo principal antes da produção da primeira inflorescência em plantas MT, 156OE e os mutantes *procera* (*pro*), *lateral supressor* (*ls-1*) e *Lanceolate* (*La-1/+*) (Figura 5).

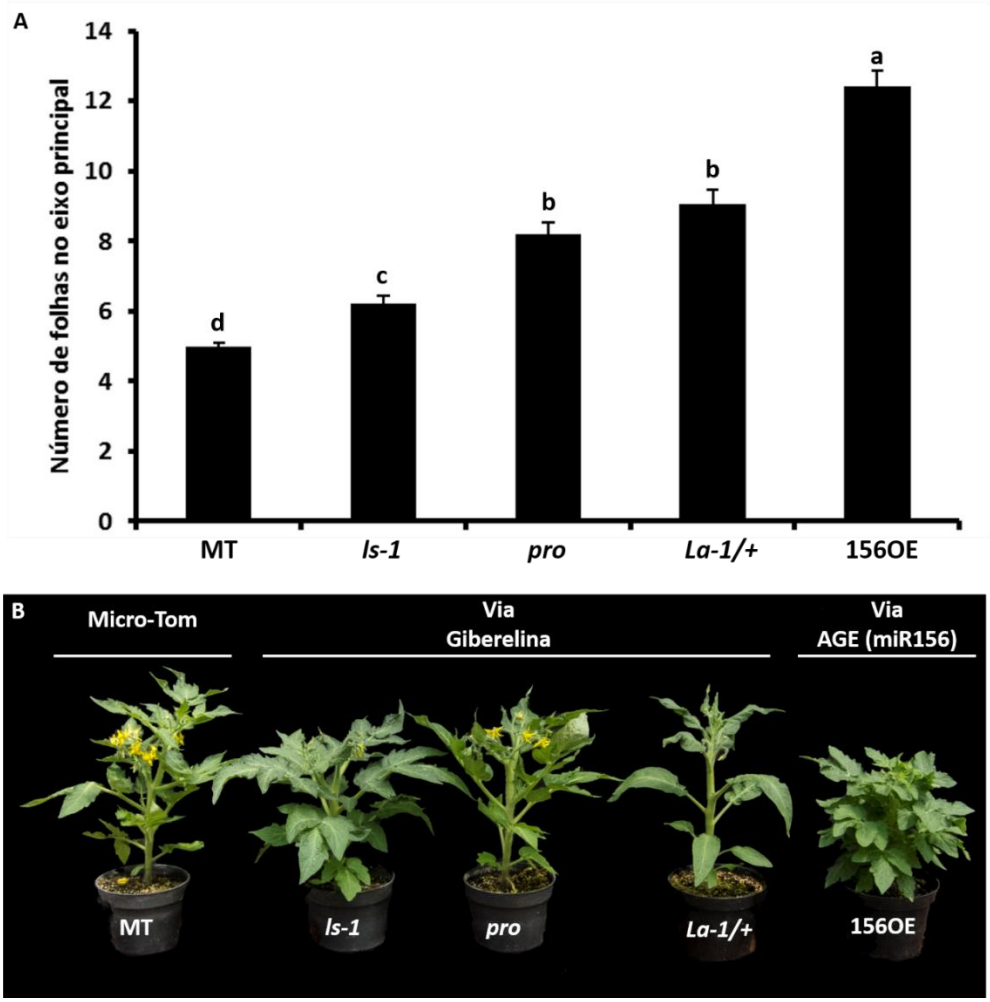

Figura 5. Genótipos avaliados quanto ao tempo de florescimento. **A**) Número de folhas no eixo principal (n = 14 plantas). As barras representam a média e o erro padrão. MT (Micro Tom), *ls-1*

(*lateral supressor), pro (procera), La/+ (*Planta em heterozigose para a o alelo mutante *La-1*), 156OE (superexpressão do miR156). Letras diferentes representam diferença estatística pelo test-T Student´s (p<0.01). **B**) Plantas representativas dos cinco genótipos 60 dias após a semeadura.

Na Figura 5A é possível visualizar um aumento progressivo no número de folhas nos genótipos MT, *ls-1, pro*, *La-1/+* e 156OE, respectivamente. Em 156OE é possível perceber um aumento substancial no número de folhas, como demonstrado anteriormente na análise do desenvolvimento do meristema. Consequentemente, esse aumento leva a uma maior permanência no estágio vegetativo, acarretando em maior atraso no florescimento nos transgênicos quando comparado às plantas MT (SILVA et al*.,* 2014).

O mutante *ls-1* apresentou número de folhas significativamente maior que MT, suportando a idéia de que o gene *LATERAL SUPRESSOR* está associado não somente a formação de meristema axilar (SCHUMACHER et al., 1999), mas também ao controle do florescimento em tomateiro (Figura 5A). No mutante *pro* foi visualizado aumento no número de folhas, como descrito para o genótipo em Carrera et al*.* (2012). A análise estatistica discriminou *pro* em um grupo diferente de *ls-1* sugerindo um moderado atraso no florescimento (Figura 5A). De forma semelhante à *pro*, o mutante *La-1/+* apresentou um maior número de folhas quando comparado à MT, sugerindo que *La-1/+* apresenta atraso moderado no florescimento (Figura 5A).

Burko et al*.* (2013) demonstraram que plantas transgênicas de tomateiro *p35S::miR319* (cultivar M82) apresentam fenótipo de florescimento precoce. Neste mesmo trabalho não foi explorado o tempo de florescimento no mutante *Lanceolate*, o que torna o nosso dado inédito quanto à associação do aumento da expressão de *LA* com o florescimento tardio (Figura 5A). Conjuntamente, a contagem de número de folhas no eixo principal dos cinco genótipos avaliados sugere que mutações em genes diferentes, inicialmente não associados, podem levar a fenótipos semelhantes quanto à alteração no tempo de florescimento, com diferentes nivéis de severidade.

4.4 O atraso no florescimento dos mutantes *ls-1, pro* e *La-1/+* é relacionado ao maior acúmulo de formas bioativas de GA

Como mencionado anteriormente, os mutantes *ls-1, pro* e *La-1/+* possuem fenótipos associados a alterações nos níveis e/ou resposta ao fitormônio giberelina

(SCHUMACHER et al., 1999; BASSEL; MULLEN; BEWLEY, 2008; YANAI et al., 2011). Portanto, decidiu-se quantificar os níveis de formas bioativas de GA em ápices vegetativos de todos os genótipos em estudo. Baseado na caracterização prévia do período de transição vegetativo-reprodutivo do meristema apical (Figura 2), foi concluído que aos quatro dias após a germinação todos os genótipos em estudo ainda se encontram majoritariamente no estágio vegetativo.

Dessa forma, realizou-se a quantificação via cromatografia gasosa acoplada à espectometria de massa (GC-MS) de formas bioativas de giberelinas neste estágio de desenvolvimento do ápice vegetativo. Essa mensuração nos permitiu diferenciar, dentre os cinco genótipos, quais apresentaram alteração no acúmulo de formas bioativas de GA (GA_1 e GA_4). Visto que GA controla uma das principais vias de regulação do tempo de florescimento (WILSON; HECKMAN; SOMERVILLE, 1992), torna-se essencial determinar o padrão de acúmulo dessas moléculas. A figura 1 demonstra as principais etapas na via de biossíntese de giberelinas (SERRANI et al., 2007; MARTINEZ-BELLO; MORITZ; LOPEZ-DIAZ, 2015), evidenciando as formas bioativas GA_1 e GA_4.

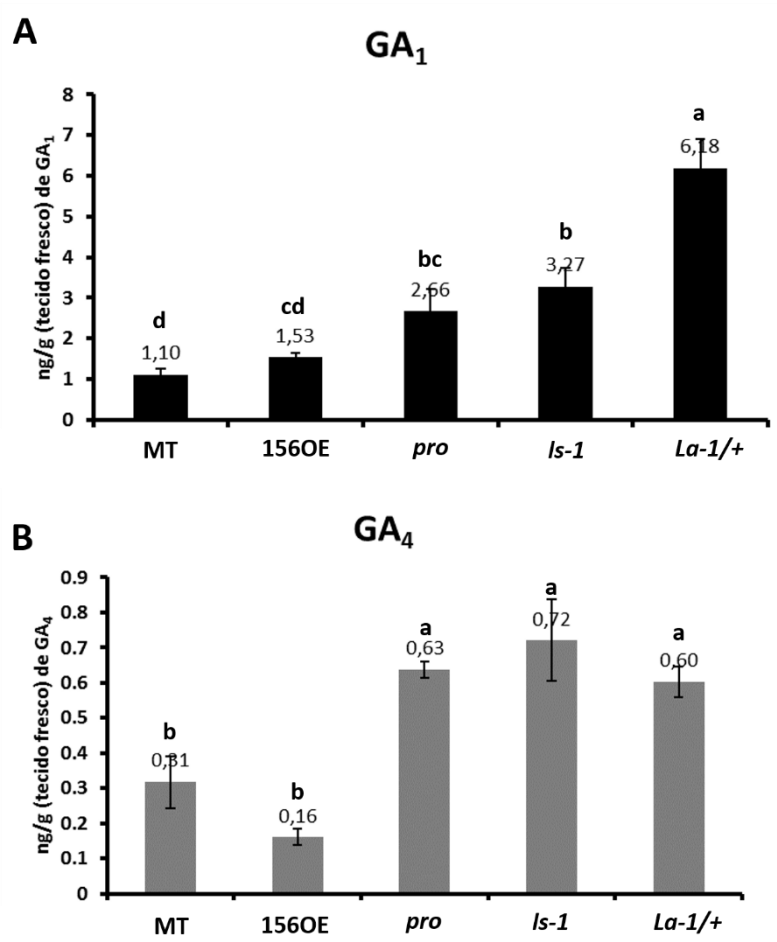

Figura 6. Quantificação por cromatografia gasosa acoplada à espectometria de massa (GC-MS) das formas bioativas de GA, GA_1 e GA_4 em plântulas com 4 dias após a germinação. **A**) Quantidade de GA_1 mensurada a partir de nanogramas/ grama de tecido fresco. B) Quantidade de GA_4 mensurada a partir de nanogramas/ grama de tecido fresco. As barras verticais representam a média e o erro padrão calculado entre três amostras biológicas para cada um dos cinco genótipos. Em (A) e (B): letras diferentes representam diferença estatística pelo test-T Student´s $p<0.01$.

Os niveis de GA_1 em MT, 156OE e *pro* não foram distintos pelo método estatístico adotado (Figura 6A). Já os mutantes *ls-1,* e *La-1/+* exibiram incremento no acúmulo de GA_1 na ordem de três e seis vezes, respectivamente, quando comparado ao MT (Figura 6A). Esse resultado sugere que as plantas 156OE e *pro* não apresentam alteração no acúmulo de GA_1, sugerindo que o atraso no florescimento visualizado nesses genótipos (Figura 5) não envolve alteração na produção dessa forma bioativa de giberelina. Yanai et al.,(2011) demonstraram que o mutante *La/+* apresenta aumento no acúmulo dos transcritos de *Ga20ox*, o que leva a maior produção de formas bioativas de GA. No entanto, nesse trabalho não foi feita qualquer menção à concentração do hormônio.

Conjuntamente, nossos dados e os previamente publicados suportam a idéia que LANCEOLATE controla os níveis transcricionais de genes *GA20ox* (YANAI et al., 2011) e o acúmulo da forma bioativa GA_1 (Figura 6A). Tucker (1976) sugere que o mutante *ls* no *background* Craigella de tomateiro apresenta maior acúmulo de GA, apesar de não ter sido realizada discriminação entre formas bioativas do hormônio. Dados mostrados na Figura 6A corroboram com o acúmulo verificado por esse autor, além de indicar que o comportamento do mutante quanto ao aumento do nível de GA não é *background* dependente, visto que o mesmo padrão de aumento foi visualizado nos *backgrounds* Craigella e Micro-Tom. Com o intuito de avaliar se o gene *LATERAL SUPRESSOR* é capaz de alterar a transcrição de genes relacionados à biossíntese de GA, análises de expressão via qPCR de genes *GA20ox* e *GA2ox* estão sendo conduzidas nos ápices do mutante *ls-1*.

O nível de acúmulo de GA_4 não diferiu em ápices vegetativos de plantas 156OE quando comparado a MT (Figura 6B). Yu et al. (2012) demonstraram que plantas 156OE em *Arabidopsis thaliana* não alteram o conteúdo de GA_4 quando comparada às plantas WT, sugerindo que a superexpressão do miR156 não afeta a produção de GA_4 *em A. thaliana* e tomateiro.

De forma oposta, os mutantes *ls-1, pro* e *La-1/+* apresentaram aumento no acúmulo na ordem de duas vezes quando comparado ao controle (Figura 6B). Assim, foi possível definir dois grupos: i) plantas MT e 156OE sem alteração no conteúdo de GA_4 e ii) plantas mutantes *La-1/+, ls-1* e *pro* com aumento significativo de GA_4 (Figura 6B). Embora a relação direta do mutante *procera* com GA tenha sido descrito em *backgrounds* diferentes (BASSEL; MULLEN; BEWLEY, 2008; JASINSKI et al., 2008), incluindo MT (CARRERA et al., 2012), nenhum desses autores demonstrou a alteração na produção de giberelina. De forma inédita, a quantificação de GA_4 permitiu elucidar que *pro* não afeta apenas a resposta a GA, mas também a sua produção, o que sugere a existência de um mecanismo de retroalimentação positivo entre as vias de biossíntese e resposta a GA em tomateiro.

Conjuntamente, as análises dos níveis de GA_1 e GA_4 sugerem que os mutantes com atraso no tempo de florescimento, *ls-1, pro* e *La-1/+,* apresentam maior acúmulo de GA quando comparado as plântulas MT e 156OE. Essa diferença suporta a idéia que as vias genéticas reguladas pelos genes *LATERAL SUPRESSOR*, *GAI* (*pro* é um alelo mutante para o gene *GAI*) e *LANCEOLATE* atrasam a transição de fase vegetativa-reprodutiva em decorrência de aumento nos

níveis endógenos de GA e provável alteração na resposta molecular a GA. De forma oposta, plantas 156OE não apresentaram variação significativa quanto ao acúmulo de formas bioativas de GA. Esse dado suporta a hipótese de que a via miR156/*SPL/SBP* não altera a produção desse fitormônio no ápice vegetativo de plântulas de tomateiro no quarto dias de desenvolvimento, antes da transição do meristema apical vegetativo para reprodutivo. Possivelmente, as vias associadas à GA e a via miR156/*SPL/SBP* interagem durante a transição do meristema apical vegetativo para reprodutivo em tomateiro.

4.5 miR156 e genes SlySBPs apresentam padrões distintos de expressão durante a transição do meristema apical em diferentes genótipos

Com o intuito de avaliar se existe interação molecular entre as vias reguladas pelos genes *GAI (pro* é um alelo mutante para o gene *GAI*), *LATERAL SUPRESSOR* e *LANCEOLATE* e o miR156 e *SlySBPs*, avaliou-se a expressão do miR156 maduro e dois genes *SlySBPs* relacionados à transição de fases vegetativa-reprodutiva em diferentes genótipos (PARK et al., 2012). Baseado no tempo de desenvolvimento estabelecido em dias após germinação e transição do meristema apical (Figuras 2 e 3) decidiu-se adotar dois tempos de avaliação de acordo com a mudança de fase visualizada em plântulas MT. No 10º dia de desenvolvimento, 100% das plantas MT encontram-se em transição ou já atingiram o estado reprodutivo (Figura 2). Assim, em MT, esse tempo de desenvolvimento proporciona uma amostra no estágio reprodutivo.

Dada essa definição e levando-se em conta a necessidade de avaliar a expressão dos genes de interesse antes e depois da transição do meristema apical, adotaram-se os tempos quarto e 10º dia após a germinação para coleta dos ápices vegetativos.

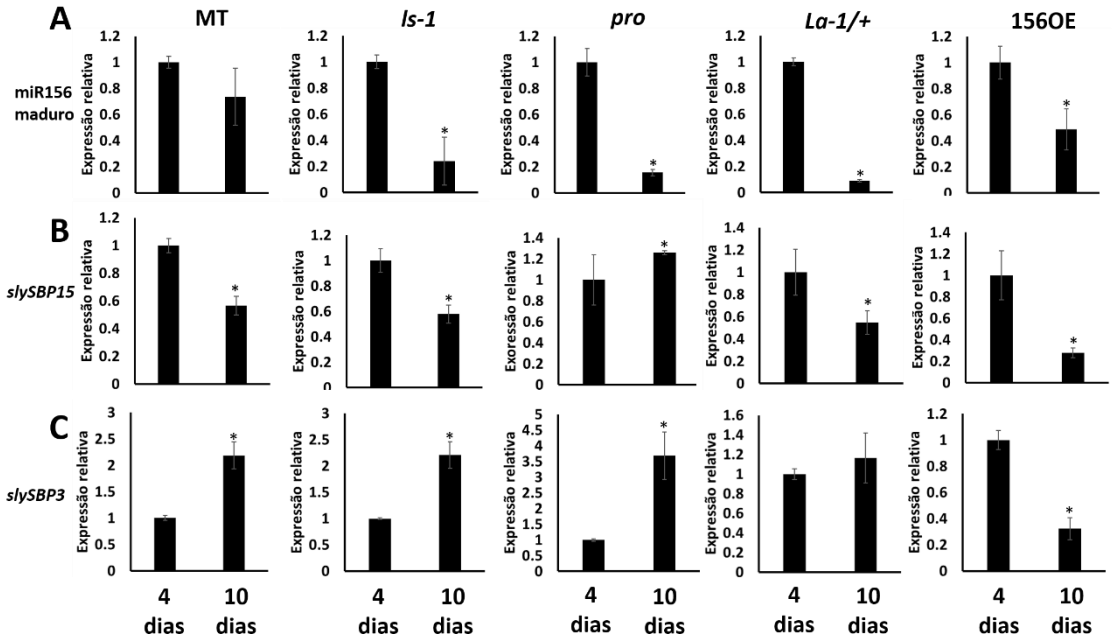

Figura 7. Análise de expressão relativa via qPCR nos genótipos MT, *ls-1, pro, La-1/+* e 156OE comparando ápices vegetais no quarto e 10º dia após germinação. Os dados representam a média e o erro padrão de três amostras biológicas. A) Padrão de expressão do miR156 maduro comparando quarto e 10º dia nos cinco genótipos. B) Padrão de expressão de *SlySBP15* comparando quarto e 10º dia nos cinco genótipos. C) Padrão de expressão de *SlySBP3* comparando quarto e 10º dia nos cinco genótipos. Asterísco nos gráficos representa diferença estatística pelo teste Wilcoxon $p<0.05$.

Em todos os genótipos avaliados observa-se redução estatisticamente significativa no acúmulo de transcritos do miR156 maduro no 10º dia após a germinação, comparado ao quarto dia (Figura 7A). Os mutantes *ls-1* e *pro* apresentam redução em torno de cinco vezes, enquanto que no mutante *La-1/+* essa redução é de 12,5 vezes. No transgênico 156OE, a diferença entre quarto e décimo dia é menor, sugerindo que a superexpressão do miR156 presente nesse transgênico atenua a diminuição nativa da expressão do miR156 aos 10 dias de desenvolvimento, estágio em que o meristema já fez a transição de vegetativo para reprodutivo.

Os genes *SlySBP3* e *SlySBP15* são candidatos na regulação da fase de transição juvenil-adulto, visto que seus ortólogos em arabidopsis são responsáveis por controlar o período de florescimento (YAMAGUCHI et al., 2009; WU et al., 2009). Portanto, foram avaliados os níveis de transcritos dos genes *SlySBP3* e *SlySBP15* nos ápices vegetais dos genótipos estudados.

Os genes *AtSPL9* e *AtSPL15* atuam dinamicamente antes, durante e depois da transição do meristema apical em *Arabidopsis thaliana* (HYUN et al., 2015). *AtSPL15* desempenha papel central durante a transição, tendo o acúmulo do seu transcrito aumentado até a transição do meristema, com uma sucessiva queda na sua expressão. Já *AtSPL9* parece desempenhar papel secundário no processo, sendo expressa nos flancos do meristema, principalmente após a transição (Hyun *et al*., 2015). Nessa espécie, os genes *AtSPL9* e *AtSPL15* são os paralógos mais próximos dentro da família SPLs/SBPs (CARDON et al., 1999). Interessantemente, em tomateiro existe apenas um gene SBP ortólogo a *AtSPL9* e *AtSPL15*, denominado *SlySBP15* (SALINAS et al., 2011).

A expressão de *SlySBP15* em MT diminui no 10º dia de desenvolvimento quando comparado ao quarto dia de desenvolvimento (Figura 7B), sugerindo que no 10º dia de desenvolvimento a transição do meristema apical já ocorreu. Assim, o padrão de expressão de *SlySBP15* é similar ao padrão de expressão de seu ortólogo em arabidopsis, tal como demonstrado em Hyun et al., (2015). Análises de expressão do gene *SlySBP15* via hibridização *in situ* em ápices de plântulas de quatro e 10 dias de desenvolvimento estão sendo realizados com o intuito de determinar o padrão espaço-temporal de expressão deste gene em tomateiro.

A expressão do gene *SlySBP15* diminuiu pela metade entre os tempos quarto e décimo dia de desenvolvimento nos genótipos MT, *ls-1 e La-1/*+ (Figura 7B). Ápices de plantas transgênicas 156OE apresentam maior diferença no acúmulo de *SlySBP15* nesse intervalo, provavelmente devido a expressão ectópica do miR156, o que leva a degração dos transcritos do gene *SlySBP15*. Este resultado sugere novamente que a superexpressão do miR156 modifica a dinâmica natural de expressão das *SPLs/SBPs* ao longo do desenvolvimento de tomateiro, assim como já foi demonstrado durante o desenvolvimento dos ovários (SILVA et al*.,* 2014).

Interessantemente, os ápices vegetativos do mutante *pro* apresentam padrão oposto aos demais genótipos com aumento no acúmulo de transcritos de *SlySBP15* no 10º dia de desenvolvimento (Figura 7B). O mutante *procera* possui mutação pontual no gene que codifica para a proteína DELLA de tomateiro, o que leva a não repressão da resposta a GA (BASSEL; MULLEN; BEWLEY, 2008; JASINSKI et al., 2008). Uma vez que *pro* apresenta mutação no domínio GRAS, responsável pela atividade como fator transcricional na proteína DELLA, este mutante parece exercer atividade transcricional ectópica visto que os transcritos de

SlySBP15 aumentaram seu acúmulo comparando quarto e décimo dia de desenvolvimento, diferentemente dos demais genótipos. Yu et al., (2012) relatam que em plantas transgênicas de arabidopsis *ProRGA:: Rgad17,* com alteração no domínio DELLA*,* não ocorre a indução da expressão de *AtSPL3* ao longo do desenvolvimento, como visualizado nas plantas selvagens.

É possível que as mudanças de expressão verificadas em *pro* reflitam um mecanismo de retroalimentação, devido à resposta diferenciada a GA que o mutante possui ou à atividade de regulação transcricional diferenciada que a proteína pro mutada possa estar exercendo. É importante ressaltar que, uma vez que o mutante *procera* não é *knockout* a modificação do aminoácido valina para ácido glutâmico dentro do domínio GRAS (BASSEL; MULLEN; BEWLEY, 2008) pode estar produzindo uma atividade de controle transcricional diferente do alelo selvagem. Tal questão não foi explorada até o momento por nenhum dos trabalhos envolvendo o alelo *pro* em tomateiro.

O transgênico 156OE apresenta maior diferença no acúmulo de *SlySBP15* entre quatro e 10 dias sugerindo uma combinação de regulação transcricional endógena conjuntamente com a regulação pós-transcricional advinda da expressão ectópica do miR156 (Figura 7B).

A proteína AtSPL3 de *Arabidopsis thaliana*, apresenta grande importância durante a transição de fase vegetativa-reprodutiva visto que é capaz de se ligar aos promotores dos genes *AP1 e LFY* induzindo assim a transição do meristema apical (YAMAGUCHI et al., 2009). Dada essa função crucial decidiu-se avaliar o padrão de expressão do ortólogo *SlySBP3* durante a transição do meristema apical em tomateiro no quarto e décimo dia após a germinação.

O acúmulo dos transcritos do gene *SlySBP3* nos mutantes *ls-1* e *pro* apresentaram um padrão semelhante ao verificado em MT, aumentando o acúmulo de seus transcritos após a transição do meristema (Figura 7C). Acúmulo semelhante não foi demonstrado para o mutante *La-1/*+, sugerindo que o atraso no florescimento nesse genótipo pode estar relacionado com a manutenção da expressão de *SlySBP3*, diferentemente do visualizado para os outros genótipos (Figura 7C). Interessantemente, as plantas 156OE apresentaram padrão oposto em relação aos demais genótipos, com diminuição do acúmulo de *SlySBP3* no 10º dia de desenvolvimento, sugerindo que a alteração em específico da expressão dessa *SBP* contribui para o atraso no florescimento visualizado nesse genótipo. Visto que *La-1/*+

e 156OE são os genótipos que apresentam maior atraso no florescimento (Figura 5), é possível concluir que o controle transcricional do gene *SlySBP3* ao longo do desenvolvimento afeta a transição meristemática em tomateiro.

A comparação do padrão de expressão dos transcritos supracitados também pode ser feita levando-se em consideração apenas um tempo de desenvolvimento e comparando os cinco genótipos. Essa análise permite visualizar o comportamento entre os diferentes genótipos em uma mesma etapa de desenvolvimento, revelando detalhes diferentes da primeira análise.

A expressão do miR156 maduro no quarto dia de desenvolvimento aumenta nos ápices vegetativos dos mutantes *ls-1* e *La-1/+* quanto comparado a MT (Figura 8A), o que pode ser relacionado com o atraso no florescimento visualizado nesses mutantes. O aumento da expressão do miR156 maduro em quatro vezes para *ls-1* e seis vezes para *La-1/+* é compatível com o número de folhas produzidos por esses genótipos no eixo principal (seis e oito, respectivamente) (Figura 5A). O mutante *procera* parece não induzir alterações no padrão de expressão do miR156 maduro no quarto dia de desenvolvimento (Figura 8A). Comparando-se os cinco genótipos no quarto dia, as plantas 156OE apresentam o maior acúmulo do miR156 maduro, sendo estatisticamente diferenciado dos demais genótipos (Figura 8A).

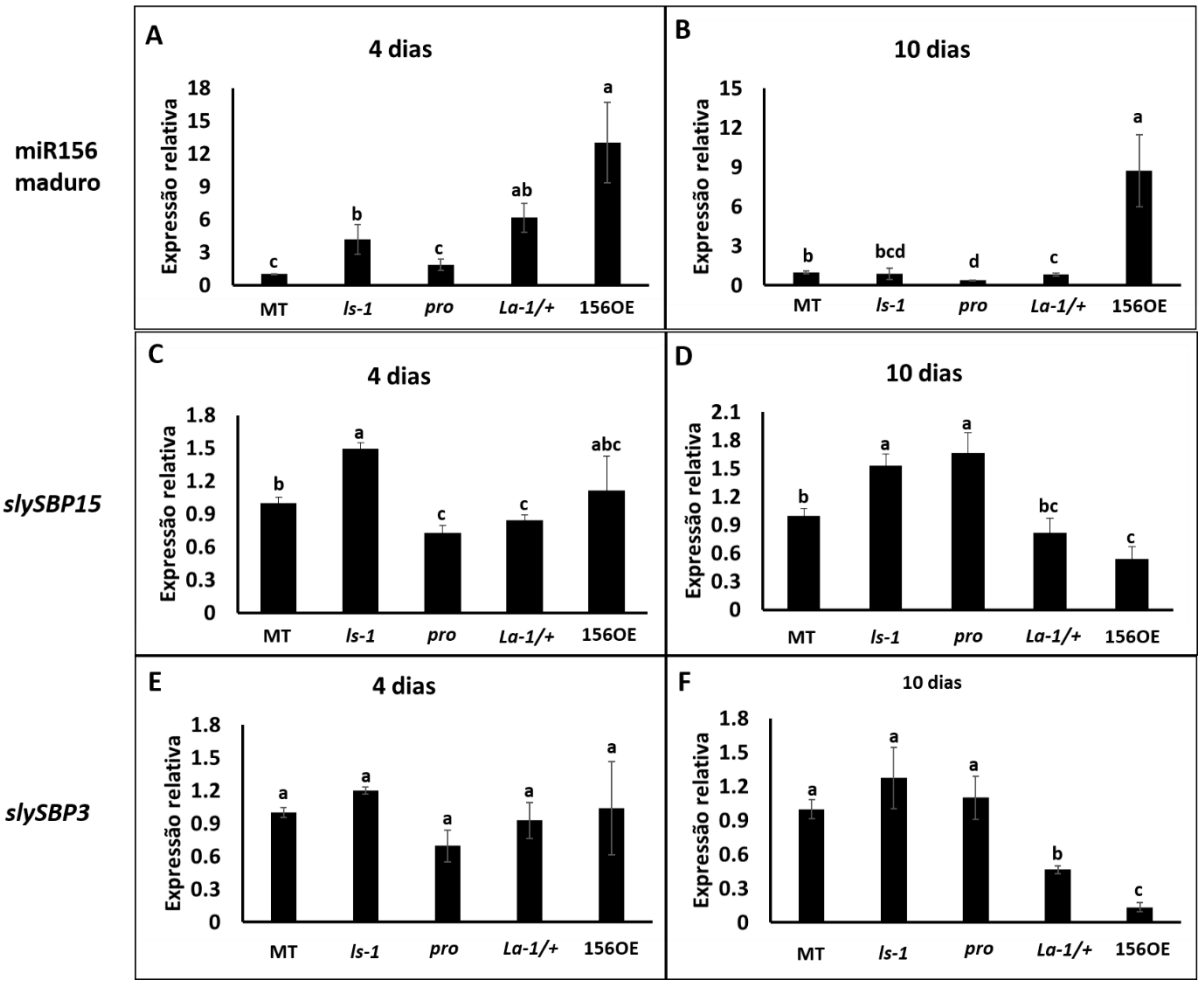

Figura 8. Análise de expressão relativa via qPCR em ápices no quatro e 10º dia após germinação comparando os genótipos MT, *ls-1, pro, La-1/+* e 156OE. **A**) Acúmulo de transcritos do miR156 maduro no quarto dia de desenvolvimento. **B**) Acúmulo de transcritos do miR156 maduro no 10º dia de desenvolvimento. **C**) Acúmulo de transcritos de *SlySBP15* no quarto dia de desenvolvimento. **D**) Acúmulo de transcritos de *SlySBP15* no 10º dia de desenvolvimento. **E**) Acúmulo de transcritos de *SlySBP3* no quarto dia de desenvolvimento. F) Acúmulo de transcritos de *SlySBP3* no 10º dia de desenvolvimento. Os dados representam a média e o erro padrão entre três amostras biológicas. Cada amostra foi composta de sete ápices em cada um dos dois tempos de desenvolvimento adotados. Letras diferentes nos gráficos representam diferenças estatísticas pelo test- t Student´s ou Wilcoxon $p<0.05$.

Já no 10º dia de desenvolvimento, o acúmulo de transcritos do miR156 maduro é reduzido nos mutantes *pro* e *La-1/+*, quando comparado ao MT (Figura 8B). Tal redução pode ser um efeito indireto das mutações e estar temporalmente relacionado à formação dos verticilos florais. O acúmulo dos transcritos do miR156 no mutante *ls* o agrupa, estatisticamente, tanto com MT como *pro* e *La-1/+*. A manutenção de altos níveis de transcritos do miR156 maduro em ápices das plantas

156OE no 10º dia de desenvolvimento pode explicar a produção extensiva de primórdios foliares nestas plantas, mantendo o meristema apical ainda no estágio vegetativo (Figura 3I).

O padrão de expressão de *SlySBP15* pode ser considerado semelhante entre os cinco genótipos no quarto dia de desenvolvimento, visto que o acúmulo de *SlySBP15* nas plantas 156OE não foi distinguível estatisticamente dos demais genótipos (Figura 8C). No 10º dia após a germinação, ocorre um pequeno aumento na expressão de *SlySBP15* nos ápices de plantas mutantes *ls-1 e pro*. Já o mutante *La-1/+* e o transgênico 156OE apresentam redução do acúmulo de *SlySBP15*, o que pode ser relacionado com o maior número de folhas produzidas no eixo principal (Figura 8D). A expressão de *SlySBP3* não apresentou diferença estatística entre os cinco genótipos no quarto dia de desenvolvimento (Figura 8E). Já no 10º dia de desenvolvimento ocorre uma diminuição nos genótipos *La-1/+* e 156OE em relação aos demais genótipos (Figura 8F), o que sugere que *SlySBP3* atua na indução da transição do meristema apical.

Entretanto, os dados de expressão apresentados até o momento são inconclusivos no sentido de demonstrar se há interação molecular entre as vias associadas à GA e à via miR156/*SPL*/*SBP*. Acredita-se que essa interação ocorra de forma indireta, com as vias convergindo paralelamente em genes-alvo em comum. Além disso, é possível que essas vias interagam ao nível de interações proteína: proteína. Ambas hipóteses estão sendo avaliadas no momento.

4.6 Interações genéticas entre as vias *AGE* e GA

As análises de expressão descritas anteriormente, embora preliminares, sugerem que a via *AGE*, representada pelo miR156 e seus alvos, e vias associadas a GA podem interagir para controlar o tempo de florescimento em tomateiro. Além disso, evidências sugerem que a via *AGE* e proteínas DELLA podem interagir para controlar o tempo de florescimento em arabidopsis (YU et al., 2012). Assim, decidiu-se realizar o cruzamento entre os mutantes associados à via GA com plantas transgênicas 156OE a fim de entender como duplas pertubações envolvendo as duas vias poderiam alterar o tempo de florescimento em tomateiro.

Inicialmente, foi avaliado o número de folhas produzidas no eixo principal após o aparecimento do primeiro primórdio de inflorescência visível. Nesta análise, o

mutante *ls-1* não diferiu estatisticamente de MT quanto ao número de folhas (Figura 9A). As plantas 156OE apresentaram em média 12 folhas antes do florescimento, sendo significativamente diferentes de MT, *ls-1* e *pro* (Figura 9A). As plantas duplo transgênico-mutante 156OE*ls* apresentaram aproximadamente 20 folhas (Figura 9 A e B), estatisticamente diferentes de todos os genótipos simples sugerindo interação entre a via *AGE* e a via regulada por *LS* no controle do tempo de florescimento. Este dado sugere efeito sinérgico no atraso do florescimento produzindo um maior número de folhas no eixo principal antes da primeira inflorescência. Assim, pode-se especular que, para o tempo de florescimento, a dupla perturbação (superexpressão do miR156, e consequente silenciamento de SPLs/SBPs - 156OE, somada à redução dos transcritos de *LATERAL SUPRESSOR,* devido a presença do alelo *ls-1*) apresenta um efeito sinérgico. Provavelmente, a dupla alteração citada acima deve modificar genes-chaves no controle do florescimento como *SFT*, *FA e MC* (MOLINERO-ROSALES et al., 1999; 2004; LIFSCHITZ et al., 2006). A expressão de tais genes está sendo avaliada.

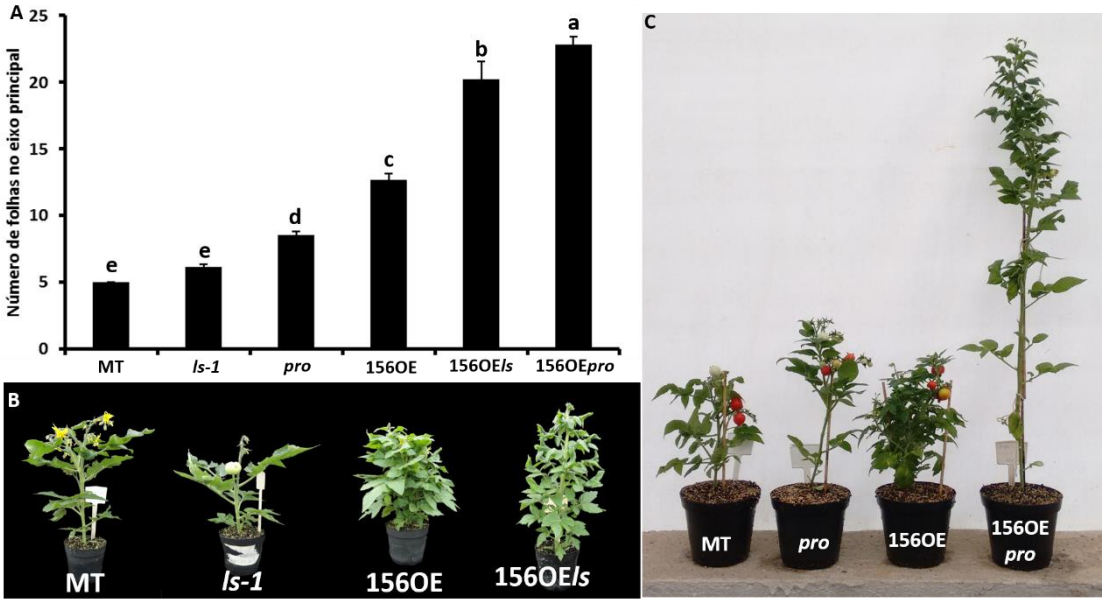

Figura 9. Caracterização dos duplos transgênico-mutante 156OE*pro* e 156OE*ls*. **A**) Número de folhas no eixo principal antes da formação da primeira inflorescência (n = 10). Letras diferentes representam diferença estatística pelo test-T Student´s $p<0.01$). **B**) Plantas da geração F2 do cruzamento entre *ls-1* e 156OE. **C**) Plantas da geração F2 do cruzamento entre *pro* e 156OE.

Ao analisar o número de folhas no eixo principal antes da transição foi possível perceber um aumento significativo dessa variável no duplo 156OE*pro* comparado a *pro* e 156OE (Figura 9 A e C). O aumento do número de folhas (>20) sugere efeito sinérgico entre as vias afetadas no controle da transição floral. Interessantemente, apesar do porte pequeno característico do *background* MT, plantas 156OE*pro* apresentaram um porte muito grande, evidenciando que a desregulação de vias reguladas pelo miR156 e pela proteína DELLA têm forte impacto no desenvolvimento de tomateiro.

A avaliação deste duplo sugere que a presença de ambas as perturbações, a superexpressão do miR156 -156OE e a resposta constitutiva a GA - *pro*, alteram sinergicamente o tempo de florescimento. Algumas SPLs/SBPs atuam na indução do florescimento via ativação de genes *MADS* e de outro microRNA, o miR172 (YU et al., 2012). No duplo produzido é possível que esteja ocorrendo pelo menos três diferentes regulações das *SPLs*: (i) pós-transcricionalmente, via o miR156; (ii) aqueles transcritos de SPLs que geraram proteínas ainda estão interagindo fisicamente (proteína – proteína) com DELLA, e (iii) alteração da regulação da transcrição de algumas *SPLs* pela proteína DELLA mutante (PRO), o que pode ser preliminarmente evidenciado nos dados de expressão gênica nos ápices vegetativos e reprodutivos do mutante *pro* (Figura 7B).

A via miR156/*SPL*/*SBP* regula tanto o desenvolvimento de frutos SILVA et al., 2014) quanto o tempo de florescimento (SCHWAB et al., 2005; WANG; CZECH; WEIGEL, 2009). O mutante *procera* ocasionalmente apresenta indeterminação no fruto, de forma semelhante ao visualizado em plantas 156OE (CARRERA et al., 2012). Baseado nessas informações, é plausível especular que o duplo transgênico-mutante apresenta interação entre essas vias relacionadas ao desenvolvimento do ovário. Os frutos do mutante *lateral supressor* (SCHUMACHER et al., 1999) (Figura 10C) não apresentam claras diferenças quando comparados ao controle MT (Figura 10A). O mutante *procera* (CARRERA et al., 2012) no *background* MT eventualmente apresenta um pequeno grau de indeterminação nos frutos, como pode ser visualizado na Figura 10B. Interessantemente, ambas as mutações, quando combinadas à superexpressão do miR156 (SILVA et al., 2014), apresentam efeito aditivo quanto ao nível de indeterminação verificado nos frutos (Figura 10E e F). Esses dados sugerem que as vias reguladas pelos genes *LS* e *GAI* interagem com a via *AGE* não somente na formação da competência para florescimento, mas também

durante a formação dos verticilos florais em tomateiro, principalmente o carpelo. Essa interação pode convergir no controle de resposta a GA via genes como o *LEAFY* e *AP1*, os quais são os principais responsáveis pela identidade dos órgãos florais (WEIGEL et al., 1992; GUSTAFSON-BROWN; SAVIDGE; YANOFSKY, 1994). Além disso, já foi demonstrado que níveis elevados de GA impedem a formação correta dos órgãos florais em arabidopsis (YAMAGUCHI et al., 2014). A convergência de altos níveis de formas bioativas de GA nos mutantes *ls-1* e *pro* e a desregulação de genes de identidade floral nas plantas 156OE pode ter contribuído para o alto grau de indeterminação e má formação dos frutos nos duplos 156OE*ls* e 156OE*pro* (Figura 10).

O gene *GOBLET* é um fator de transcrição da família NAC, ortólogo a *CUC1* e *2* de *Arabidopsis thaliana* (BERGER et al., 2009). Este gene está relacionado ao controle dos limites entre órgãos, além de mostrar-se induzido em ovários 156OE (SILVA et al., 2014). É possível que as plantas 156OE*ls e* 156OE*pro* apresentem aumento ainda maior do nível de expressão do *GOBLET* quando comparado aos mutantes simples, visto que o aumento na indeterminação dos frutos nos duplos é acompanhado da redução do número de flores por inflorescência. Em algumas plantas 156OE*pro* esse número foi reduzido para apenas duas flores por inflorescência. A possível desregulação do gene *GOBLET* nesses materiais pode levar a uma separação imprecisa dos primordios florais, o que está possivelmente relacionado a um menor número de flores com alta indeterminação (Figura 10F).

Rossmann et al., (2015) demonstraram que *LATERAL SUPRESSOR* e *GOBLET* atuam conjuntamente na formação de meristemas ectópicos na base dos folíolos de tomateiro. É possível especular que tal interação também pode estar vinculada à formação da inflorescência nos duplos 156OE*ls* e 156OE*pro.* Para responder a esse questionamento, experimentos de análise de expressão do gene *GOBLET* via qPCR estão sendo conduzidos nos primórdios de inflorescência (Figura 4B) dos genótipos MT, *ls* e *pro*.

Figura 10. Comparação morfológica dos frutos representativos dos mutantes e transgênicos simples, dos duplos e do controle MT. **A**) MT, **B**) *procera*, **C**) *lateral suppressor -1*, **D**) 156OE, **E**) 156OE*pro* e **F**) 156OE*ls.*

4.7 O tratamento com Giberelina (GA_3) acentua o atraso no florescimento em plantas 156OE

As interações entre 156OE*pro* e 156OE*ls* demonstraram efeito sinérgico entre os mutantes e o transgene, aumentando o número de folhas produzidos no eixo principal e, consequentemente, atrasando o tempo de florescimento (Figura 9). Visto que ambos mutantes apresentaram maior acúmulo de formas bioativas de giberelinas (Figura 6), especulou-se se a aplicação de GA_3 seria capaz de produzir efeitos similares à combinação de 156OE com os mutantes supracitados.

Na figura 2 descrita anteriormente demonstrou-se que ao 10º dia após germinação plantas MT não mais apresentam características vegetativas. Decidiu-se então que as aplicações do tratamento com giberelina e PBZ aos genótipos MT e 156OE seriam feitas via irrigação. A aplicação foi realizada individualmente em cada planta, desde o seu primeiro dia de desenvolvimento (Figura 2D) até o 10º dia de desenvolvimento. Após os 10 dias de tratamento, as plantas foram novamente irrigadas apenas com água. Cerca de 100 dias após o inicio do desenvolvimento, as plantas foram avaliadas quanto ao número de folhas produzidas no eixo principal

antes da primeira inflorescência, bem como quanto à morfologia dos frutos produzidos. As figuras 11 A e B mostram plantas MT e 156OE submetidas aos três diferentes tratamentos (GA_3, PBZ e mock). O tratamento mock possuia apenas a base da solução sem adição de giberelina ou do seu inibidor. Visualmente, o tratamento com GA_3 induziu formação de plantas com maior porte em MT e 156OE (Figura 11A e B). Já o tratamento com PBZ produziu plantas com porte pequeno, sendo menores que as plantas do tratamento controle (mock) (Figura 11A e B)

Interessantemente, o número de folhas produzidos no eixo principal foi maior no tratamento com GA_3 tanto para MT como para 156OE (Figura 11C e D). Esse dado suporta a ideia de que o tratamento exógeno com giberelinas pode mimetizar o efeito sinérgico visualizado nos duplos 156OE*pro* e 156OE*ls* (Figura 9) quanto ao número de folhas produzidas no eixo principal. O tratamento com PBZ não induziu alteração na formação do número de folhas em MT, apesar de gerar redução significativa nesse parâmetro em 156OE (Figura 11C e D).

Ao visualizar as plantas tratadas com PBZ (Figura 11 A e B), é possível perceber que elas são menores quando comparadas ao controle mock. Além de controlar o tempo de florescimento, GA é conhecida por atuar no elongamento dos entrenós das plantas (McCOMB, 1967; CARRERA et al., 2012). Nossos dados demonstram que, apesar do tratamento com PBZ não induzir variações significativas no número de folhas em MT e 156OE, o menor porte visualizado em plantas de ambos os genótipos tratadas com PBZ (Figura 11A e B) pode estar relacionado à alteração no tamanho do entrenó nesses materiais.

Mesmo a aplicação de GA3 sendo feita no inicio do desenvolvimento vegetal, aos primeiros 10 dias de desenvolvimento, foi possível perceber efeito desse hormônio na morfologia dos frutos produzidos em plantas 156OE. Silva et al*.,* (2014) descreveram que as plantas 156OE apresentam um maior grau de indeterminação nos seus ovários e consequente produção de frutos com estruturas indeterminadas. O tratamento com GA_3 parece intensificar a indeterminação nos frutos apenas das plantas 156OE (Figura 11E). O tratamento com GA_3 diretamente sobre os ovários de MT (CARRERA et al., 2012) levam a indeterminação nos frutos de forma semelhante ao que visualizamos no nosso tratamento para 156OE. É importante ressaltar duas grandes diferenças entre esses experimentos: (i) no presente trabalho a aplicação foi realizada via irrigação durante apenas os 10 primeiros dias de desenvolvimento; (ii) neste trabalho plantas MT que sofreram o mesmo tratamento com GA_3

apresentaram frutos com morfologia semelhante ao WT. Isso nos leva a crer que as plantas 156OE devem apresentar uma maior sensibilidade a GA_3, visto que apenas esse genótipo foi capaz de apresentar aumento da indeterminação via aplicação hormonal no inicio do desenvolvimento. O tratamento com PBZ parece não alterar a morfologia dos frutos tanto para plantas MT como para plantas 156OE (Figura 11E).

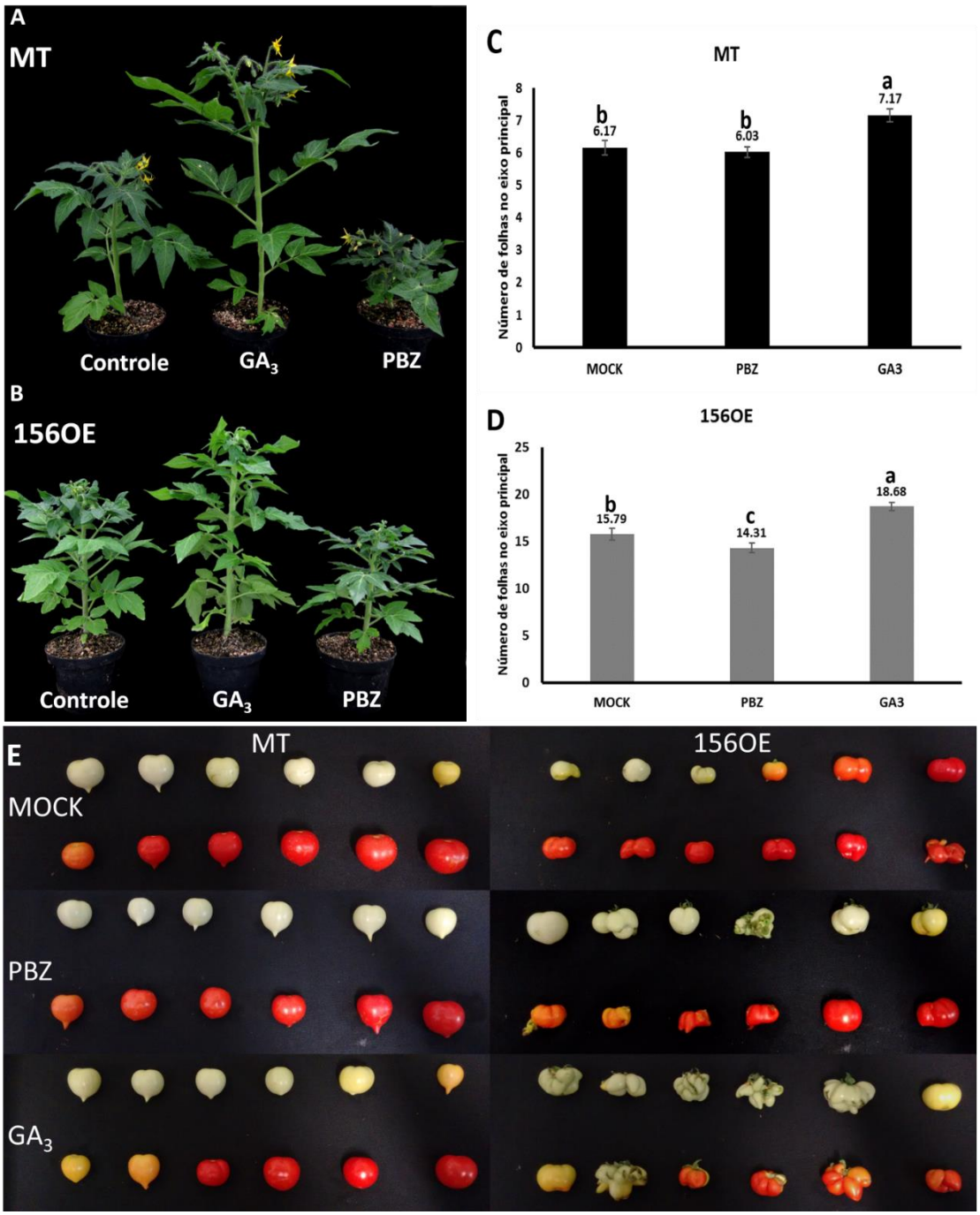

Figura 11. Tratamento com GA_3 e Paclobutrazol em plantulas MT e 156OE por 10 dias desde o início da germinação. **A**) Plantas MT representativas dos três tratamentos. **B**) Plantas 156OE representativas dos três tratamentos. **C**) Número de folhas produzidas no eixo principal por plantas MT. **D**) Número de folhas produzidas no eixo principal por plantas 156OE. **E**) Morfologia dos frutos

tanto MT como 156OE nos três diferentes tratamentos. Foram avaliadas 29 plantas em cada genótipo para cada tratamento.

4.8 Interações entre proteínas das vias *AGE* e GA no controle do florescimento em tomateiro

Algumas proteínas DELLA de arabidopsis são capazes de se ligar a proteínas SBPs, como AtSPL15, regulando o tempo de florescimento (YU et al., 2012). Interessantemente, a mesma proteína AtSPL15 é capaz de se ligar ao fator de transcrição AtTCP4 regulando o desenvolvimento foliar em arabidopsis (RUBIO-SOMOZA et al., 2014). Uma vez que AtTCP4 é ortólogo a LANCEOLATE em tomateiro (PARAPUNOVA et al., 2014) e que plantas apresentando mutações para esse gene (*La-1/*+) apresentam alterações quanto ao tempo de florescimento (Figura 5) é possível especular que a mesma interação seja conservada em tomateiro e possa atuar no controle do florescimento.

Com o intuito de avaliar a interação física entre a única DELLA presente em tomateiro e algumas SPLs/SBPs estão sendo realizados experimentos para avaliar a ligação entre proteínas. Para esse experimento estão sendo utilizadas duas metodologias distintas: duplo hibrido (Y2H) (VIDAL; LEGRAIN, 1999) e ensaio de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC) (WALTER et al., 2004). A elucidação das interações entre SPLs/SBPs e DELLA é essencial, visto que essas seriam prováveis pontos de convergência entre as vias *AGE* e GA, controlando a transição de fase vegetativa-reprodutiva. Além disso, a interação entre algumas SPLs/SBPs e o fator de transcrição LANCEOLATE pode sugerir novas regulações entre as vias *AGE* e GA no controle do florescimento em tomateiro.

A construção dos vetores para Y2H e BiFC, assim como os ensaios de duplo hibrido, foram realizados durante o estágio BEPE – FAPESP no laboratório do professor Erich Grotewold (*Center for Applied Plant Science* – Ohio State University – Columbus -Ohio- EUA).

Inicialmente foi realizada a amplificação a partir de cDNA de tomateiro dos genes *SlySBP3*, *SlySBP15*, *Sly*GAI e *LANCEOLATE* (Figura 12 A). Em seguida os mesmos foram clonados no vetor de entrada pENTR D-Topo (Figura 12 B).

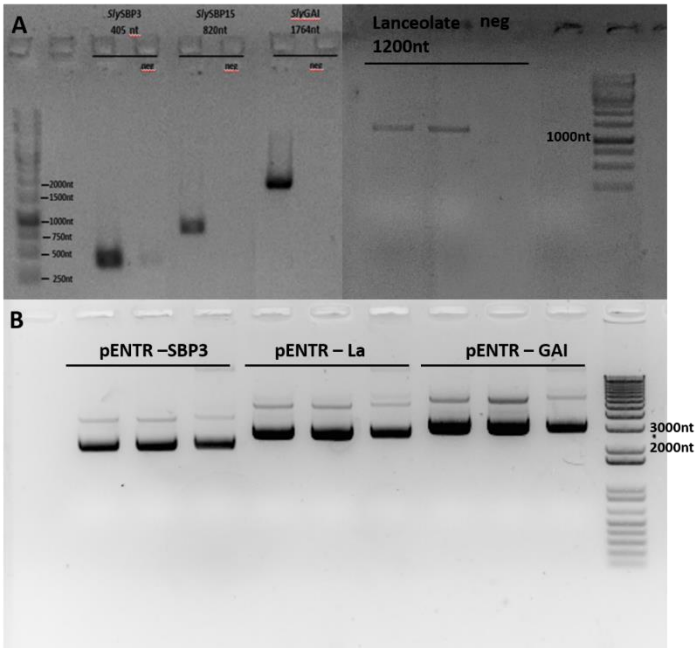

Figura 12. Clonagem de *SlySBP3*, *SlyGAI* e *LA*. A) Amplificação apartir de cDNA dos genes *SlySBP3, SlySBP15, SlyGAI* e *LA*. B) *SlySBP3*, *Lanceolate* e *SlyGAI* clonados no vetor de entrada pENTR D-TOPO.

Os vetores pENTR contendo os genes *SlySBP3*, *SlyGAI* e *LA* foram sequenciados e a integridade total dos genes foi confirmada. Na sequência, os mesmos foram recombinados nos vetores destino pDEST22 e pDEST32. Foram realizadas PCRs com primers específico para cada gene confirmando os clones (Figura 13 A e B). Posteriormente, dois clones de cada construção foram sequenciados usando primers específicos de cada gene e primers anelando no vetor. Essa análise foi confirmatória para todas as construções citadas.

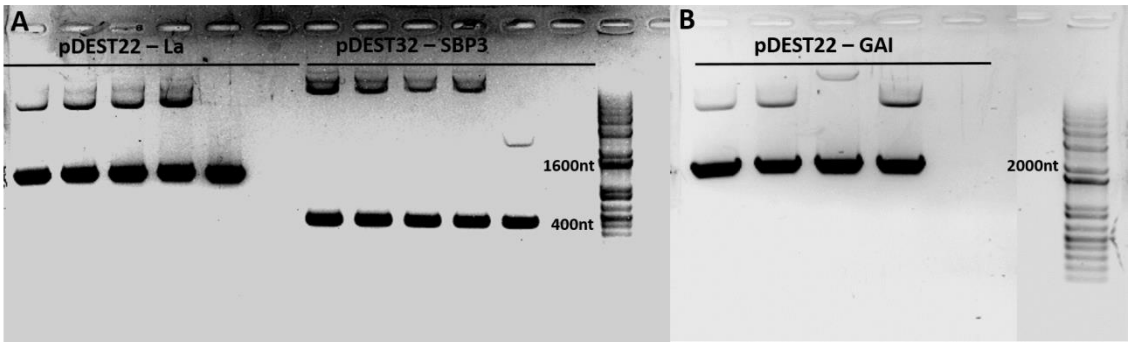

Figura 13. Vetores para duplo hibrido. A) Confirmação via PCR com primers especificos para *LA* e *SlySBP3*. B) Confirmação via PCR com primers especificos para *SlyGAI*.

Para o ensaio de duplo híbrido foi adotado como controle positivo o homôdimero formado pelo fator de transcrição do tipo bHLH denominado R (KONG et al., 2012) (Figura 14A). Previamente à análise da interação envolvendo SlySBP3 realizou-se um teste essencial de auto-ativação, no qual o gene *SlySBP3* foi inserido no vetor pBD e o vetor pAD foi usado vazio, sem inserção de qualquer gene. Esse ensaio mostra se a proteína SlySBP3 apresenta alguma região capaz de desencadear a via de produção de Histidina na ausência de interação entre duas proteínas. Como visualizado na Figura 14B, a combinação pBD (SlySBP3) e pAD (vetor vazio) cresce no meio seletivo para triptofona e leucina, mas não é capaz de crescer nos meios com três e quatro seleções, demonstrando que SlySBP3 não realiza auto ativação do sistema. Em seguida, foi testada a capacidade de SlySBP3 se ligar a SlyGAI (Figura 14C) e a LANCEOLATE (Figura 14D). Em ambas as situações, a levedura foi capaz de crescer apenas no meio com duas seleções sugerindo que as proteínas em questão não interagem.

Yu et al., (2012) e Rubio-Somoza et al., (2014) demonstraram em arabidopsis que tanto para a interação DELLA-SPL/SBP como TCP-SPL/SBP, é essencial que a proteína SPL/SBP possua a porção C-terminal após o domínio SBP. SlySBP3 é definida como uma proteína SBP pequena (SALINAS et al., 2011), a qual não possui esse domínio C-terminal. Assim, os dados sugerem que em tomateiro, de forma semelhante ao que acontece em *Arabidopsis thaliana*, a região C-terminal das SBPs parece ser essencial para a interação com proteínas DELLA e TCPs. A realização do experimento testando a interação SlySBP15 com SlyGAI e LA já se encontra em andamento e irá responder quanto à conservação ou não dessas interações.

Para a realização dos experimentos supracitados estão sendo realizadas clonagens dos genes de interesse nos vetores nEYFP e cEYFP para BiFC (MARTIN et al., 2009) e pDEST22 e pDEST32 para duplo hibrido em levedura (Y2H).

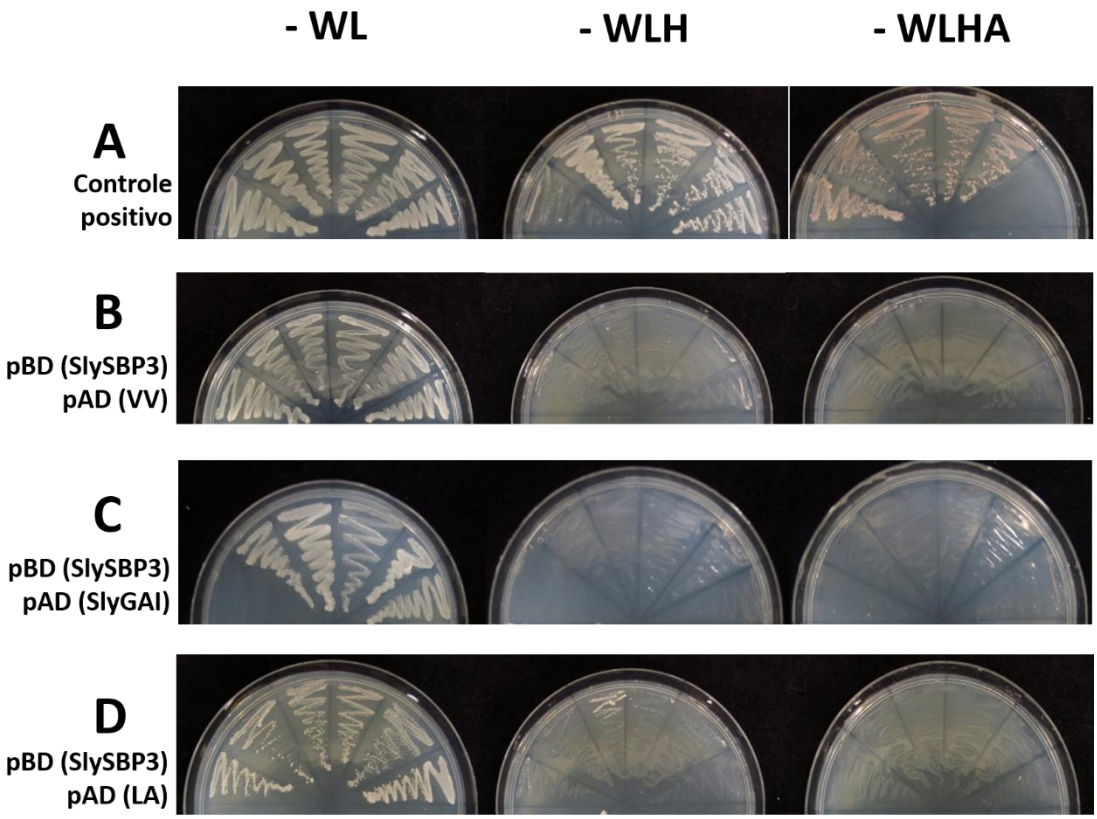

Figura 14. Duplo híbrido em levedura (Cepa *pJ694-a*) testando interação entre SlySBP3 com SlyGAI e LANCEOLATE. A) Controle positivo tanto para interação fraca (-WLH) quanto forte (-WLHA). B) Teste de autoativação para SlySBP3. C) Teste de interação entre SlySBP3 e SlyGAI. D) Teste de interação entre SlySBP3 e LANCEOLATE. -WL (ausência de Triptofano e Leucina). -WLH (ausência de Triptofano, Leucina e Histidina). -WLHA (ausência de Triptofano, Leucina, Histidina e Adenina). pAD (activation domain) = pDEST22 e pBD (Binding Domain) = pDEST32.

4.9 Circuito regulatório envolvendo dois microRNAs (miR156 e miR319), e seus respectivos alvos, controlam o período de florescimento em tomateiro

Como mencionado anteriormente, Rubio-Somoza et al., (2014) demonstraram que a proteína AtSPL9 é capaz de se ligar a proteína TCP4 e atuar em conjunto para regular a complexidade foliar de plantas de arabidopsis. Fatores de transcrição da família TCP são regulados negativamente pelo miR319, incluindo o gene *TCP4* (PALATNIK et al., 2003). Similarmente, o gene *LA* em tomateiro é regulado negativamente pelo miR319 sendo esta regulação fundamental para o controle da complexidade foliar em tomateiro (ORI et al., 2007). Além disso, plantas mutantes *La-1/+* apresentaram maior acúmulo de formas bioativas de GA e atraso no florescimento (Figuras 5 e 6). Interessantemente, o mutante de ganho de função

para o gene *TCP4* em arabidopsis, denominado *supressor of jaw8* ou *soj8* (PALATNIK et al., 2007), apresenta florescimento precoce, enquanto que plantas superexpressando o miR319 apresentam atraso no florescimento (PALATNIK et al., 2003). Embora não há trabalhos até o momento explorando o efeito da via miR319/*TCP4* no controle da transição de fase vegetativa-reprodutiva, nós decidimos explorar a interação entre a via miR319/*LA* e miR156/*SPL/SBP* em relação ao controle do tempo de florescimento.

O número de flores por inflorescência é significativamente menor tanto em plantas 156OE quanto em plantas *La-1/+* quando comparados a plantas MT (Figura 15A). Dentre as 78 inflorescências oriundas de nove plantas *La-1/+*, 51% apresentaram ao menos uma estrutura vegetativa em substituição a uma das flores da inflorescência (Figura 15D), o que não ocorre em plantas MT (Figura 15B). É interessante ressaltar que, eventualmente, ocorre a formação de ramo vegetativo dentro da inflorescência em substituição a uma das flores que deveriam ser produzidas nas plantas 156OE (Figura 15C).

A ocorrência de estruturas vegetativas em aproximadamente 50% das inflorescências de *La-1/+* e a eventual presença de ramos vegetativos dentro da inflorescência de 156OE sugerem que ambas desregulações (alelo *Lanceolate* insensivel ao miR319 (*La-1*) e superexpressão do miR156 com consequente silenciamento das *SPLs/SBPs*) afetam a identidade da estrutura da inflorescência revertendo parcialmente a identidade vegetativa. Plantas 156OE apresentam diminuição no acúmulo dos transcritos do gene *FALSIFLORA*, ortológo ao gene LFY de arabidopsis, em ovários (SILVA et al., 2014). Essa desregulação demonstra que a indeterminação do desenvolvimento do fruto e a reversão parcial de identidade, com produção de estruturas vegetativas ectópicas dentro do fruto, estão relacionadas à desregulação do gene *FA* (MOLINERO-ROSALES et al., 1999). É provável que a produção de estruturas vegetativas dentro da inflorescência do mutante *La-1/+* também seja relacionada à desregulação de *FA*.

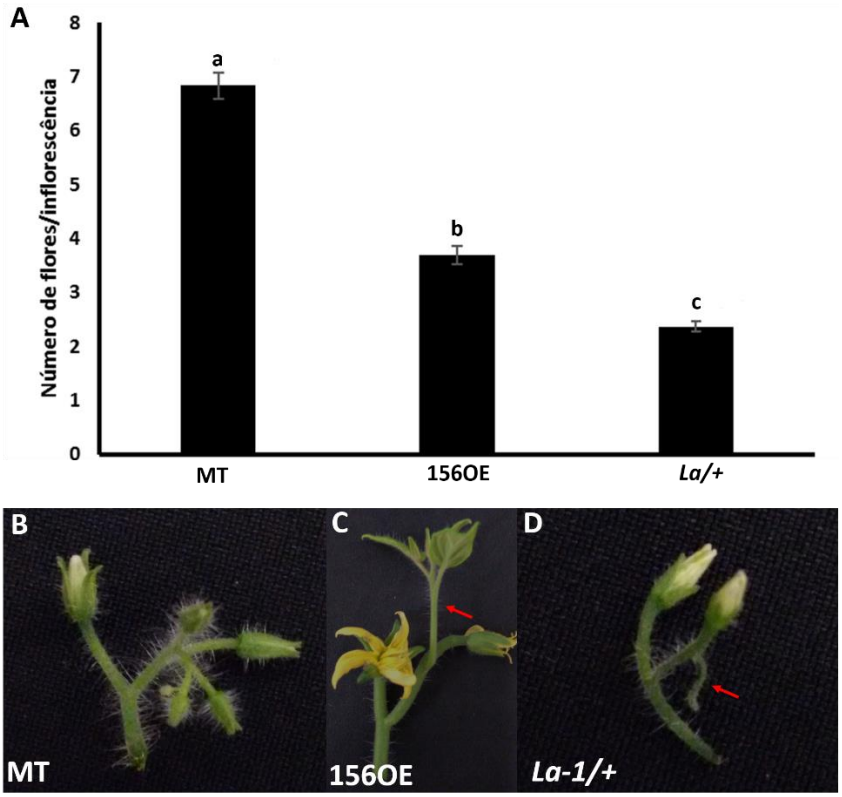

Figura 15. Comparação entre estruturas da inflorescência. **A**) Número de flores produzidos por inflorescência (N=22). Letras diferentes representam diferença estatística pelo test-T Student´s p<0.01. **B**) Inflorescência de plantas MT, **C**) Inflorescência de plantas 156OE, **D**) Inflorescência de plantas *La-1/+*. As setas vermelhas indicam estruturas vegetativas produzidas dentro da inflorescência.

Interessantemente, no duplo 156OE*La* não há produção de flores (Figura 16G). De fato, mais de 100 dias após a semeadura, as plantas 156OE*La* não apresentaram sinal de transição de fase vegetativa para reprodutiva. Provavelmente, a presença das duas modificações regulatórias aboliu completamente a transição para o florescimento, demonstrando o efeito aditivo e convergente das vias miR156/*SPL/SBP* e miR319/*LA* no controle da transição de fase vegetativa-reprodutiva em tomateiro. A interação entre as vias miR156/*SPL/SBP* e miR319/*LA* controlando transição de fase é inédita em tomateiro, assim como para outras espécies.

Molinero rosales et al. (2004) demonstraram que ao produzir em tomateiro um duplo mutante de perda de função para os genes *SINGLE FLOWER TRUSS – SFT* (LIFSCHITZ et al., 2006) e *FALSIFLORA - FA* (MOLINERO-ROSALES et al., 1999), este não apresentou nenhum sinal de transição floral, mesmo após produzir mais de 100 folhas no eixo principal. Assim, o fenótipo encontrado no duplo mutante *sft fa*

sugere que estes genes têm efeito sinérgico, participando em rotas paralelas necessárias para o controle do florescimento em tomateiro. De forma semelhante ao descrito acima, o duplo 156OE*La* possivelmente altera genes que em ultima instância regulam *SFT* e *FA* como efetores da transição para o florescimento.

Já em *Arabidopsis thaliana*, o duplo mutante *leafy ft*, que apresenta mutações em genes ortólogos a *FA* e *SFT*, mostra alterações no tempo de florescimento e ausência de estruturas florais na inflorescência, apesar da transição floral não ser completamente eliminada (RUIZ-GARCIA et al. 1997). Esta comparação demonstra que em tomateiro, diferentemente de arabidopsis, as vias (*AGE* e GA) apresentam papéis mais essenciais neste processo, possivelmente devido a ausência de redundância com outras vias genéticas, como a de fotoperíodo e vernalização.

Vinte dias após a germinação, plantas MT e *La-1/*+ já apresentam pequenos botões florais produzidos a partir do meristema apical caulinar (Figura 16 A e C). Nessa fase, plântulas 156OE apresentam meristema floral com a formação das sépalas da primeira flor da inflorescência (Figura 16B). Já as plantas (duplo mutante-transgênica) 156OE*La* apresentam meristemas com características vegetativas (Figura 16D). Aos 40 dias de desenvolvimento, já foi possível visualizar flores em antese em MT e *La-1/*+ e botões florais em plantas 156OE (Figura 16E). Entretanto, nenhum sinal de transição para estado reprodutivo foi verificado no duplo 156OE*La*. Ao se verificar que aos 100 dias após a germinação nenhum sinal aparente de transição floral era visualizado em plantas 156OE*La*, decidiu-se avaliar em detalhes o estado do meristema apical caulinar nesse genótipo. A Figura 16F mostra o ápice da planta após 100 dias de germinação. O círculo vermelho representa a região onde deveria estar localizado o meristema apical. Ao observar em um maior aumento (Figura 16G), é possivel perceber que não existe uma estrutura meristemática tipíca, mas sim uma estrutura indeterminada sem aparente identidade reprodutiva. É interessante ressaltar que nesta região ocorre uma grande presença de tricomas, sendo essa uma estrutura característica de tecidos diferenciados (HÜLSKAMP, 2004).

A fim de avaliar o efeito temporal sob a manutenção do estado vegetativo desse meristema apical atípico, foram produzidas estacas a partir de ramos laterais do duplo 156OE*La* e avançadas três gerações. Assim, o material tratava-se de um ramo lateral de terceira ordem. Nessas plantas foi raramente visualizada a produção

de uma estrutura semelhante à inflorescência, mas com identidade provavelmente vegetativa (Figura 16H).

Os dados de quantificação hormonal (Figura 6) demonstram que plantas *La-1/+* apresentam acúmulo de GA_1 seis vezes maior que MT e duas a três vezes maiores que os demais mutantes (*ls-1* e *pro*). Esse maior conteúdo de GA_1 associado com a superexpressão do miR156 pode ser um dos motivos pelo qual o duplo 156OE*La* não apresenta uma típica transição de fase do meristema apical caulinar.

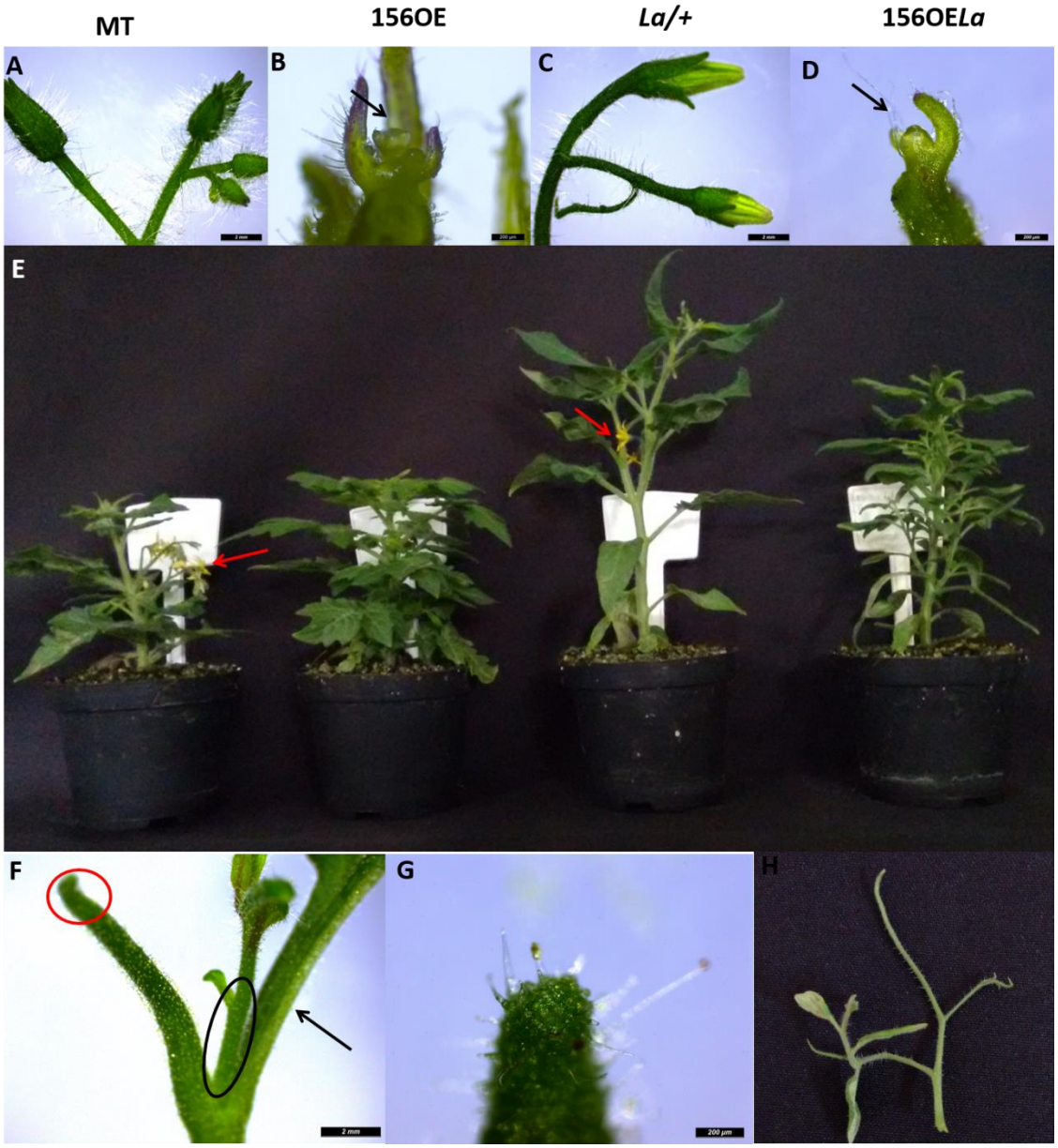

Figura 16. Ápice das plantas 20 dias após a germinação **A**) MT, **B**) 156OE, C) *La-1/+* e **D**) 156OE*La*. E) Plantas representativas dos quatro genótipos 40 dias após germinação. **F**) Região apical da planta 156OE*La* 100 dias após a germinação. A seta preta representa a última folha produzida, a elipse preta o ramo axilar produzido e o círculo vermelho o ápice. **G**) Detalhe do ápice mostrado em F com

maior aumento. **H**) Estrutura de inflorescência vegetativa que raramente é visualizada em plantas 156OE*La*. A barra preta representa 2 mm em A, C, F e 200µm em B, D, G.

4.10 Interação genética entre as vias GA e *AGE* no acesso LA0335 de tomateiro

Após concluir que a dupla perturbação oriunda da superexpressão do miR156 somada à presença do alelo *La-1* insensível ao miR319 leva a completa obstrução da transição do meristema apical de vegetativo para reprodutivo (Figura 16), decidiu-se avaliar essa mesma interação em outro *background* genético de tomateiro. Essa análise visa entender se esta interação poderia ser de alguma forma dependente de *background*. O alelo mutado para o gene *LANCEOLATE* é originário do acesso LA0335 (TGRC – *Tomato Genetics Resource Center*) e descrito como oriundo de uma cultivar primitiva, não apresentando qualquer caracterização molecular. A introgressão desse acesso em MT foi realizada pelo grupo do prof. Lázaro Peres (ESALQ/USP).

Uma vez que não há informações disponiveis a respeito da identidade molecular desse alelo oriundo do acesso LA0335, nosso grupo de pesquisa realizou o sequenciamento da região codante referente ao gene *LANCEOLATE* em plantas homozigotas para a mutação. Assim, foi possível concluir que a mutação nesse gene se dá por uma substituição nucleotídica na posição 17 na região de ligação para o miR319 (Dados ainda não publicados produzidos por outro membro do nosso grupo de pesquisa). Mutação na mesma posição, porém advinda de origem diferente, já havia sido descrita por Ori et al*.,* (2007), o que nos levou a denominar o alelo mutado como *La-1.*

Posteriormente, realizou-se a caracterização molecular do acesso LA0335 para o locus *SELF PRUNING* (SP; PNUELI et al*.,* 1998) a fim de definir molecularmente se essa cultivar de tomateiro seria determinada ou indeterminada. Essa descrição é muito importante, pois possibilita a distinção de dois grandes grupos de cultivares de tomateiro. Uma vez que MT é uma cultivar determinada (*spsp*) é interessante avaliar a mesma interação em um *background* indeterminado, a fim de eliminar a possibilidade dos fenótipos observados no duplo 156OE*La* serem *background* dependente. A morfologia foliar do mutante *La-1/+* é mantida nos dois *backgrounds*, como visualizado na Figura 17A.

Em seguida, a discriminação do alelo mutado *sp* e do selvagem *SP* em LA0335 foi realizada via PCR e digestão (PNUELI et al*.,* 1998). Como demonstrado na Figura 17B, esse acesso possui o alelo selvagem *SP*, apresentando, portanto, crescimento indeterminado (Figura 17B). Assim, foi realizado o cruzamento entre plantas 156OE (SILVA et al*.,* 2014) no background MT e plantas *La-1/*+ no background LA0035. Este cruzamento pôde ser avaliado diretamente na F1 visto que a mutação *La-1* e o transgene 156OE comportam-se como semi-dominante e dominante, respectivamente.

É interessante ressaltar que na progênie F1 do cruzamento acima descrito as mutações características do *background* MT, *self pruning – sp e dwarf – d*, (CAMPOS et al., 2010), se encontrarão em heterozigose, possibilitando assim a avaliação em um *background* híbrido sem o efeito das principais mutações que caracterizam MT.

A figura 17C mostra plantas controle (WT), 156OE e *La-1/*+ no *background* MT e no acesso LA0335. Aos 40 dias após a germinação, é notória a diferença do porte das plantas nos dois *backgrounds*. Nessa idade foi possível visualizar o inicio de botões florais nas plantas WT e *La-1/+.* Entretanto, nenhum botão floral aparente foi observado em 156OE e no duplo 156OE*La.* Essas plantas serão avaliadas novamente aos 100 dias de desenvolvimento, e a estrutura do ápice vegetal será analisada em detalhes.

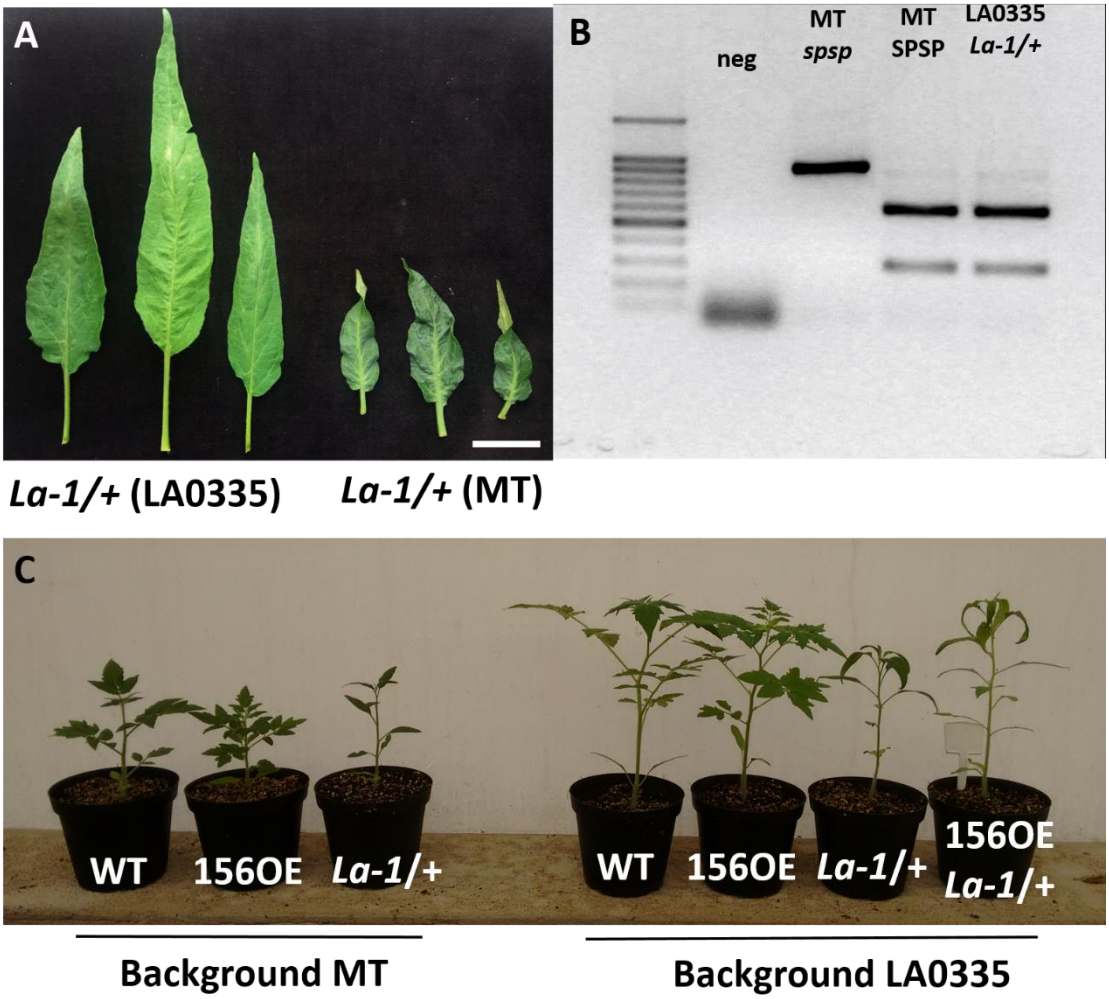

Figura 17. Mutação *La-1/+* nos *backgrounds* MT e LA0335. **A**) Fenótipo lanceolado característico da mutação *Lanceolate* em ambos *backgrounds*. **B**) Triagem molecular utilizando marcador CAPS demonstrando que o *background* LA0335 é *SPSP*. **C**) Comparação morfológica entre controle (WT), 156OE e *La-1/+* em ambos *backgrounds* com 40 dias após a semeadura

4.11 Interação genética entre as vias miR156/*SPL*/*SBP* e miR319/*TCP4* no controle do florescimento em *Arabidopsis thaliana*

Em *Arabidopsis thaliana*, a superexpressão de miR156 leva ao florescimento tardio, como descrito em Schwab et al., (2005). Nessa espécie, o mutante *soj8* apresenta mutação no sítio de reconhecimento do miR319 no gene *TCP4* (PALATNIK et al.,2003) tornando-o insensível à regulação por esse miRNA. Embora *TCP4* e *LANCEOLATE* sejam ortólogos (PARAPUNOVA et al.,2014), Schommer et al*.,* (2014) descreveram *soj8* como uma planta de florescimento precoce, sendo esse fenótipo oposto ao verificado para o mutante *La-1/+* em tomateiro.

Com o intuito de avaliar a interação genética entre as vias miR156/*SPL/SBP* e miR319/*TCP4* no tempo de florescimento em arabidopsis*,* foi realizado um experimento preliminar cruzando plantas superexpressando o miR156 (156OE) e o mutante *soj8* (Figura 18)*.* Ao avaliar plantas F1 foi possível perceber que nessa espécie o duplo é capaz de realizar a transição de fase vegetativa para reprodutiva, diferentemente do visualizado para tomateiro (Figura 16). Além disso, no mesmo período de desenvolvimento, plantas 156OE ainda se encontravam no estágio vegetativo, enquanto plantas WT (Col-0) e o duplo 156OE*soj8* já haviam realizado a transição vegetativo-reprodutivo (Figura 18). Este resultado preliminar sugere que a expressão ectópica de *TCP4* no *background* 156OE foi suficiente para promover o florescimento. Entretanto, novo experimento está sendo conduzido com um maior número de plantas genótipos WT (Col-0), *soj8*, 156OE e 156OE*soj8*, com o intuito de definir precisamente o tempo de florescimento para todos os genótipos envolvidos.

Plantas 156OE de arabidopsis e tomateiro apresentam atraso no florescimento (SCHWAB et al.,2005; SILVA et al., 2014). Já mutantes contendo as versões insensíveis ao miR319 dos fatores de transcrição TCP apresentam efeito contrário nas duas espécies, inibindo e promovendo o florescimento em tomateiro e arabidopsis, respectivamente. Assim, é possível concluir que os resultados opostos encontrados entre arabidopsis e tomateiro no controle do florescimento sugerem que a via miR319/TCP tenha papel antagônico nas duas espécies.

Figura 18. Cruzamento entre plantas transgênicas 156OE e mutante *soj8* no *background* Col-0. Note que o duplo superexpressando o miR156 e apresentando o alelo mutado insensível ao miR319 para *TCP4* (mutação semelhante ao alelo *La-1/+* em tomateiro) floresce antes das plantas 156OE e similar ao WT- Col-0.

4.12 As vias miR156/*SPL*/*SBP* e miR319/*LA* regulam conjuntamente o gene *SFT* em tomateiro

A regulação da transição do meristema apical de vegetativo para reprodutivo possui como etapa limitante a indução de genes chaves para a mudança de identidade como *SFT, FA* e *MC* (MOLINERO-ROSALES et al., 2004). Dentre esses genes *SFT* se destaca por ser um sinal móvel universal capaz de induzir o florescimento (LIFSCHITZ et al., 2006). A proteína SFT é translocada das folhas ao meristema apical via floema, funcionando como um gatilho para a transição de meristema vegetativo para reprodutivo (LIFSCHITZ et al., 2006). Baseado nisso, avaliou-se o nivel de expressão de *SFT* nas folhas de tomateiro MT, 156OE, *La-1/*+ e no duplo 156OE*La* (Figura 19A).

Folhas de plantas 156OE apresentam redução no nível de expressão de *SFT*, como previamente observado em tomateiro (ZHANG et al., 2011). Interessantemente, o mutante *La-1/*+ apresenta redução no acúmulo de transcritos de *SFT* de forma semelhante ao observado em plantas156OE (Figura 19A). Ao avaliar o duplo 156OE*La* é possível perceber que a interação entre o transgene e a mutação diminui o acúmulo de SFT nessas plantas, que se mostra menor que o verificado em MT, *La-1/*+ e 156OE. (Figura 19A). Portanto, é possível levantar a hipótese que uma das causas da não transição do meristema apical nas plantas 156OE*La* seja a pouca oferta de *SFT* em suas folhas, sendo esta incapaz de desencadear a transição meristemática.

Assim, em colaboração com o grupo do professor Lázaro Peres (ESALQ-USP), decidiu-se gerar uma planta transgênica, a qual expressa o gene *SFT* sob o controle do promotor CaMV35S no *background* MT. O fenótipo das plantas *p35S::SFT* geradas é demonstrado na Figura 19B. Nelas observa-se um menor número de folhas antes da primeira inflorescência e redução da complexidade foliar, concomitantemente com a diminuição do número de folíolos formados. Fenótipos semelhantes foram descritos anteriormente em outra cultivar da espécie por Lifschitz et al., (2006).

Em sequencia, avaliou-se por meio de enxertias (LIFSCHITZ et al., 2006) se a oferta extra de SFT em plantas *p35S::SFT* poderia reverter o fenótipo de não florescimento do duplo mutante-transgênico 156OE*La*. Para tal, plantas *p35S::SFT*

e MT foram utilizadas como *rootstock* (cavalo) e plantas 156OE e 156OE*La* foram utilizadas como *scion* (cavaleiro). É importante ressaltar que plantas de MT foram usadas como cavalo por apresentarem maior acúmulo de transcritos *SFT* quando comparadas a plantas de 156OE e 156OE*La*. Além das acima descritas, estão sendo realizadas novas enxertias utilizando MT e *La-1/*+ como cavaleiros nos cavalos *p35S::SFT* e MT.

Na enxertia combinando MT (cavalo) e 156OE (cavaleiro) (MT:156OE) é possivel observar que botões florais foram produzidos no ápice da planta (Figura 19C). Já a enxertia *p35S::SFT*:156OE induziu florescimento no ápice da planta com flores em antese (Figura 19E). Ao realizar a enxertia MT:156OE*La* nenhum sinal de florescimento foi observado, mesmo após 60 dias da realização da enxertia. Ao analisar o ápice vegetativo dessas plantas foi possivel perceber que o meristema ainda apresentava caracteristicas vegetativas (Figura 19D). De forma semelhante, quando plantas 156OE*La* foram usadas como cavaleiro em cavalo *p35S::SFT* não foi possível observar qualquer transição do meristema apical vegetativo para reprodutivo (Figura 19F). Assim, pode-se concluir que a ausência da transição de fase do meristema apical das plantas 156OE*La* deve-se não apenas à baixa oferta de *SFT*. Acredita-se que genes chaves para a indução da transição do meristema apical como *FALSIFLORA* (ortólogo a *LEAFY*) E *MACROCALYX* (ortólogo a *AP1*) estejam desregulados. Análise de expressão desses genes nos genótipos MT, *La-1/*+, 156OE e 156OE*La* está sendo conduzida via qPCR.

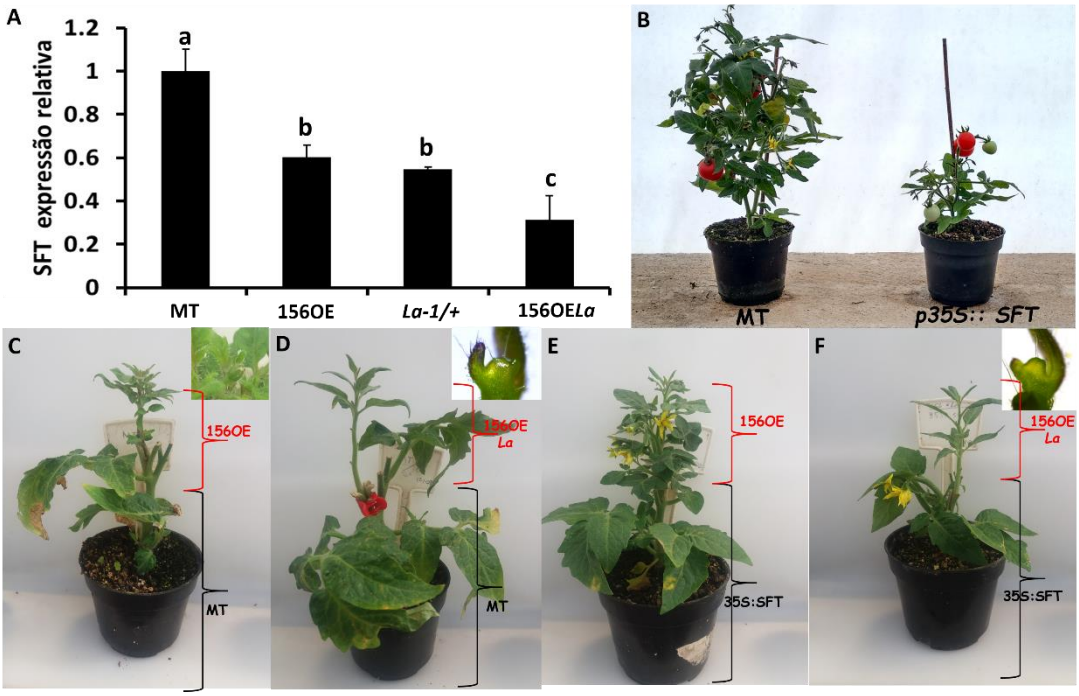

Figura 19. Efeito do estímulo para florescimento via *SFT*. **A**) Expressão relativa de SFT da 3ª folha do eixo principal em plantas com 35 dias de desenvolvimento. O gráfico representa os valores médios e o erro padrão entre três amostras biológicas. Cada amostra representa o pool da terceira folha de três plantas diferentes. Letras diferentes representam diferenças estatítiscas pelo teste de Wilcoxon $p<0.05$. **B**) Comparação morfológica entre plantas MT e transgênico p35S::SFT gerado no background MT. **C**) Enxertia utilizando plantas MT (cavalo) e 156OE (cavaleiro). No canto superior da imagem é possivel visualizar o ápice da planta com a produção de botões florais. **D**) Enxertia utilizando plantas MT (cavalo) e 156OELa (cavaleiro). No canto superior da imagem é possivel visualizar o meristema apical ainda com característica vegetativa. **E**) Enxertia utilizando plantas p35S::SFT (cavalo) e 156OE (cavaleiro). Note a presença de flores já em antese. **F**) Enxertia utilizando plantas p35S::SFT (cavalo) e 156OELa (cavaleiro). No canto superior da imagem é possivel visualizar o meristema apical ainda com característica vegetativa. Todas as combinações de enxertias foram realizadas oito vezes.

Os dados apresentados nesse trabalho permitiram a proposta de um modelo para o controle do florescimento em tomateiro, o qual possui semelhanças e divergências em relação ao proposto para arabidopsis. No modelo, setas contínuas indicam regulações previamente estabelecidas e discutidas nesse trabalho enquanto setas tracejadas representam regulações propostas ainda sobre investigação (Figura 20). Ressalta-se que: i) os genes *LA e LS* afetam positivamente a produção de GA (Figura 6), ii) plantas mutantes carregando o alelo *La-1/+* apresentam acúmulo dos transcritos de *SlySBP3* e *SFT* alterados negativamente (Figuras 7, 8 e 19); iii) o nível de expressão do gene *SlySBP15* se mostrou alterado nas plantas mutantes *pro,* as quais apresentam alelo mutado para o gene *GAI (DELLA).*

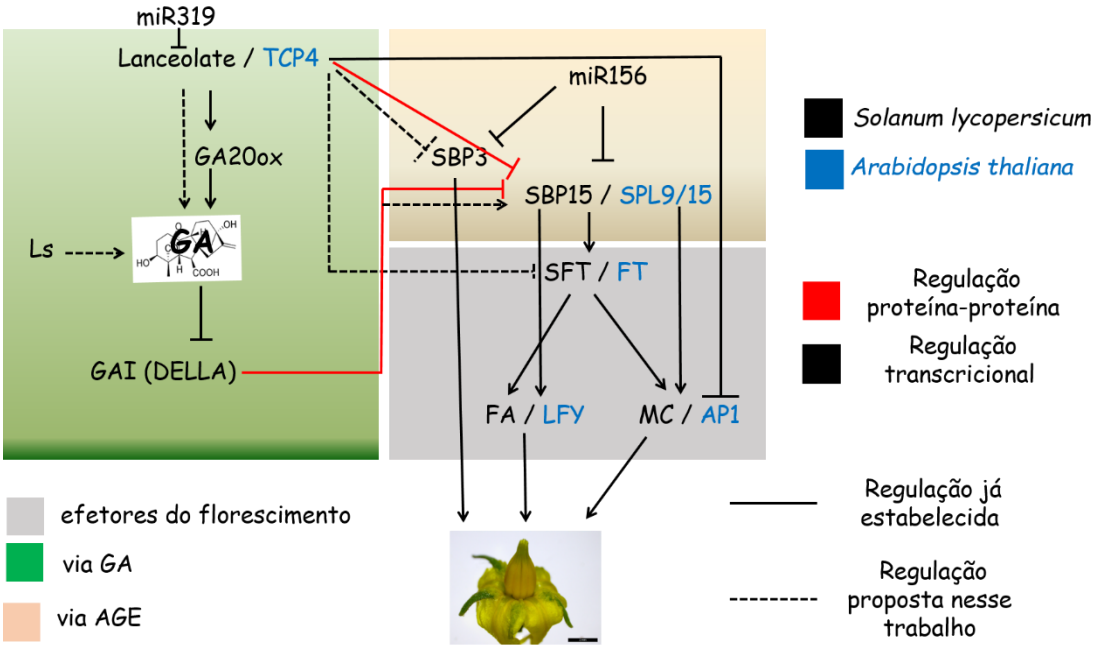

Figura 20. Modelo preliminar proposto de regulação do florescimento em tomateiro. Relações já conhecidas, novas interpretações e regulações descritas no presente trabalho apresentam-se sumarizadas.

5. Conclusões

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que:

- Diferentes mutantes em tomateiro com maior acúmulo endógeno de GA (*ls-1, pro e La-1/+)* apresentam atraso, com diferentes intensidades, no florescimento.

- No mutante *procera*, o acúmulo dos transcritos do gene *SlySBP15* é afetado positivamente de forma temporal. Essa regulação pode ser um ponto de interação entre a via *AGE* e GA no controle do florescimento.

- A inibição da transcrição do gene *SlySBP3* durante a transição do meristema apical no mutante *La-1/+* reflete interação entre as vias miR156/*SPL/SBP* e miR319/*TCP* no controle do florescimento.

- Os duplos transgênico-mutantes 156OE*pro e* 156OE*ls* apresentam efeito sinérgico no atraso do florescimento e na indeterminação dos frutos em tomateiro MT.

- O tratamento hormonal com GA_3 em plantas 156OE teve efeito similar ao visualizado nos duplos 156OE*pro e* 156OE*ls* quanto ao tempo de florescimento.

- A proteína SlySBP3 não é capaz de se ligar às proteínas GAI ou LANCEOLATE em experimentos utilizando duplo hibrido em levedura.

- O mutante *La-1/+* e o transgênico 156OE apresentam redução no número de flores por inflorescência, com formação de estruturas vegetativas substituindo algumas flores da inflorescência.

- A dupla perturbação (superexpressão do miR156 e a presença do alelo mutante *La-1*) bloqueia completamente a transição do meristema apical vegetativo – reprodutivo.

- A presença do alelo *La-1* reprime a expressão do gene *SFT* de forma semelhante a 156OE. O duplo transgênico-mutante 156OE*La* apresenta efeito aditivo na repressão de *SFT.*

- O aumento da oferta de SFT via enxertias utilizando plantas superexpressando o gene *SFT* não foi suficiente para desencadear a transição vegetativo-reprodutivo nas plantas 156OE*La.*

6. Perspectivas

Alguns experimentos se encontram em andamento com o intuito de gerar dados suficientes para uma publicação de alta qualidade.

1) Análise de expressão via qPCR nos mesmo tempos já definidos (quatro e 10 dias) nos genótipos em estudo para avaliar os seguintes genes: *SlySBP10, SlySBP8b, Lanceolate, Lateral supressor, GAI, FA, MC, SFT* e miR319;

2) Análise de expressão via qPCR do gene *GOBLET* nos tecidos primórdios de inflorescência comparando os genótipos MT, *ls* e *pro;*

3) Clonagem do gene *SlySBP15* nos vetores pDEST22 e pDEST32 para testar a interação entre as proteínas SlySBP15/GAI e SlySBP15/LA;

4) Geração do duplo transgênico entre as plantas 156OE e plantas superexpressando GA20ox (GARCIA-HURTADO et al., 2012) para avaliar o efeito no tempo de florescimento.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.; AZEVEDO, M. D.; SPICHER, L.; GLAUSER, G.; VOM DORP, K.; GUYER, L.; CARRANZA, A.; ASIS, R.; SOUZA, A.; BUCKERIDGE, M.; DEMARCO, D.; BRES, C.; ROTHAN, C.; PERES, L. E. P.; HORTENSTEINER, S.; KESSLER, F.; DORMANN, P.; CARRARI, F.; ROSSI, M. Down-regulation of tomato PHYTOL KINASE strongly impairs tocopherol biosynthesis and affects prenyllipid metabolism in an organ-specific manner. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 67, p. 919–934, 2015.

ATHERTON, J. G.; HARRIS, G. P. Flowering. In: ATHERTON, J. G.; RUDICH, J. (Ed.). **The tomato crop.** London: Chapman and Hall, 1986. p. 167–200.

BASSEL, G. W.; MULLEN, R. T.; BEWLEY, J. D. Procera is a putative DELLA mutant in tomato (*Solanum lycopersicum*): Effects on the seed and vegetative plant. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 3, p. 585–593, 2008.

BEN-NAIM, O.; ESHED, R.; PARNIS, A.; TEPER-BAMNOLKER, P.; SHALIT, A.; COUPLAND, G.; SAMACH, A. The CCAAT binding factor can mediate interactions between CONSTANS-like proteins and DNA. **Plant Journal,** Oxford, v. 462–476. 2006.

BENNETT, T.; LEYSER, O. Something on the side: axillary meristems and plant development. **Plant Molecular Biology**, Dordrech, v. 60, n. 6, p. 843–854, 2006.

BERGER, Y.; HARPAZ-SAAD, S.; BRAND, A.; MELNIK, H.; SIRDING, N.; ALVAREZ, J. P.; ZINDER, M.; SAMACH, A.; ESHED, Y.; ORI, N. The NAC-domain transcription factor GOBLET specifies leaflet boundaries in compound tomato leaves. **Development**, Cambridge, v. 136, n. 5, p. 823–832, 2009.

BERTELSEN, M. G.; TUSTIN, D. S.; WAAGEPETERSEN, R. P. Effects of GA3 and GA4+7 on early bud development of apple. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 77, p. 83–90, 2002.

BOSS, P. K.; THOMAS, M. R. Association of dwarfism and floral induction with a grape “green revolution” mutation. **Nature**, London, v. 416, n. 6883, p. 847–850, 2002.

BURKO, Y.; SHLEIZER-BURKO, S.; YANAI, O.; SHWARTZ, I.; ZELNIK, I. D.; JACOB-HIRSCH, J.; KELA I.; ESHED-WILLIAMS, L.; ORI, N. A role for APETALA1/fruitfull transcription factors in tomato leaf development. **The Plant Cell**, Rockville, v. 25, n. 6, p. 2070–2083, 2013.

CALVERT, A. Effect of the early environment on development of flowering in the tomato. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 32, p. 9–17, 1957.

CAMPOS, M. L.; CARVALHO, R. F.; BENEDITO, V. A.; PERES, L. E. P. Small and remarkable. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 5, n. 3, p. 267–270, 2010.

CAMPOS, M. L.; DE ALMEIDA, M.; ROSSI, M. L.; MARTINELLI, A. P.; LITHOLDO JUNIOR, C. G.; FIGUEIRA, A.; RAMPELOTTI-FERREIRA, F. T.; VENDRAMIM, J. D.; BENEDITO, V. A.; PEREIRA PERES, L. E. Brassinosteroids interact negatively with jasmonates in the formation of anti-herbivory traits in tomato. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 15, p. 4347–4361, 2009.

CARDON, G.; HÖHMANN, S.; KLEIN, J.; NETTESHEIM, K.; SAEDLER, H.; HUIJSER, P. Molecular characterisation of the Arabidopsis SBP-box genes. **Gene**, Amsterdam, v. 237, n. 1, p. 91–104,1999.

CARRERA, E.; RUIZ-RIVERO, O.; PERES, L. E. P.; ATARES, A.; GARCIA-MARTINEZ, J. L. Characterization of the procera Tomato Mutant Shows Novel Functions of the SlDELLA Protein in the Control of Flower Morphology, Cell Division and Expansion, and the Auxin-Signaling Pathway during Fruit-Set and Development. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 160, n. 3, p. 1581–1596, 2012.

CARVALHO, R. F.; CAMPOS, M. L.; PINO, L. E.; CRESTANA, S. L.; ZSÖGÖN, A.; LIMA, J. E.; BENEDITO, V. A.; PERES, L. E. Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: “Micro-Tom” as an effective toolkit for plant development research. **Plant Methods**, London, v. 7, n. 1, p. 18, 2011.

CHEN, X.; ZHANG, Z.; LIU, D.; ZHANG, K.; LI, A.; MAO, L. SQUAMOSA promoter-binding protein-like transcription factors: Star players for plant growth and development. **Journal of Integrative Plant Biology**, Carlton South, Victoria, v. 52, n. 11, p. 946–951, 2010.

CHUCK, G.; CIGAN, A. M.; SAETEURN, K.; HAKE, S. The heterochronic maize mutant Corngrass1 results from overexpression of a tandem microRNA. **Nature Genetics**, New York, v. 39, n. 4, p. 544-549, 2007.

CORBESIER, L.; COUPLAND, G. Photoperiodic flowering of Arabidopsis: integrating genetic and physiological approaches to characterization of the floral stimulus. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 28, p. 54–66, 2005.

CORBESIER, L.; VINCENT, C.; JANG, S.; FORNARA, F.; FAN, Q.; SEARLE, I.; COUPLAND, G. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of Arabidopsis. **Science**, Wahington, DC, v. 316, n. 5827, p. 1030–1033, 2007.

DAZ-RIQUELME, J.; MARTNEZ-ZAPATER, J. M.; CARMONA, M. J. Transcriptional analysis of tendril and inflorescence development in grapevine (*Vitis vinifera* L.). **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 3, e.92339, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0092339.

DE LUCAS, M.; DAVIÈRE, J. M.; RODRÍGUEZ-FALCÓN, M.; PONTIN, M.; IGLESIAS-PEDRAZ, J. M.; LORRAIN, S.; FANKHAUSER, C.; BLÁZQUEZ, M. A.; TITARENKO, E.; PRAT, S. A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. **Nature**, London, v. 451, p. 480–484, 2008.

DILL, A.; JUNG, H. S.; SUN, T. P. The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 98, n. 24, p. 14162–14167, 2001.

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

GALLEGO-GIRALDO, L.; GARCIA-MARTINEZ, J. L.; MORITZ, T.; LOPEZ-DIAZ, I. Flowering in tobacco needs gibberellins but is not promoted by the levels of active GA1 and GA4 in the apical shoot. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 48, n. 4, p. 615–625, 2007.

GARCÍA-HURTADO, N.; CARRERA, E.; RUIZ-RIVERO, O.; LÓPEZ-GRESA, M. P.; HEDDEN, P.; GONG, F.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J. L. The characterization of transgenic tomato over-expressing gibberellin 20-oxidase reveals induction of parthenocarpic fruit growth, higher yield, and alteration of the gibberellin biosynthetic pathway. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, p. 5803–5813, 2012.

GARGUL, J. M.; MIBUS, H.; SEREK, M. Constitutive overexpression of Nicotiana GA2ox leads to compact phenotypes and delayed flowering in *Kalancho blossfeldiana* and *Petunia hybrida*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 115, n. 3, p. 407–418, 2013.

GOLDBERG-MOELLER, R.; SHALOM, L.; SHLIZERMAN, L.; SAMUELS, S.; ZUR, N.; OPHIR, R.; BLUMWALDB, E.; SADKA, A. Effects of gibberellin treatment during flowering induction period on global gene expression and the transcription of flowering-control genes in Citrus buds. **Plant Science**, Shannon, v. 198, p. 46–57, 2013.

GOU, J.-Y.; FELIPPES, F. F.; LIU, C.-J.; WEIGEL, D.; WANG, J.-W. Negative regulation of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis by a miR156-targeted SPL transcription factor. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, n. 4, p. 1512–1522, 2011.

GUSTAFSON-BROWN, C.; SAVIDGE, B.; YANOFSKY, M. F. Regulation of the Arabidopsis floral homeotic gene APETALA1. **Cell**, Cambridge, v. 76, n. 1, p. 131–143, 1994.

HEDDEN, P.; THOMAS, S. G. Gibberellin biosynthesis and its regulation. **Biochemical Journal**, London, v. 444, p. 11–25, 2012.

HEIDE, O. M.; PRESTRUD, A K. Low temperature, but not photoperiod, controls growth cessation and dormancy induction and release in apple and pear. **Tree Physiology**, Victoria, v. 25, n. 1, p. 109–114, 2005.

HONG, G. J.; XUE, X. Y.; MAO, Y. B.; WANG, L. J.; CHEN, X. Y. Arabidopsis MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression. **The Plant Cell**, Rockville, v. 24, p. 2635–2648, 2012.

HUIJSER, P.; SCHMID, M. The control of developmental phase transitions in plants. **Development**, Cambridge, v. 4129, p. 4117–4129, 2011.

HÜLSKAMP, M. Plant trichomes: a model for cell differentiation. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 5, n. 6, p. 471–480, 2004.

HYUN, Y.; RICHTER, R.; VINCENT, C.; MARTINEZ-GALLEGOS, R.; PORRI, A.; COUPLAND, G. Multi-layered Regulation of SPL15 and Cooperation with SOC1 Integrate Endogenous Flowering Pathways at the Arabidopsis Shoot Meristem. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 37, n. 3, p. 254–266, 2015.

JAMES, P.; HALLADAY, J.; CRAIG, E. A. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. **Genetics**, Austin, v. 144, n. 4, p. 1425-1436, 1996.

JASINSKI, S.; TATTERSALL, A.; PIAZZA, P.; HAY, A.; MARTINEZ-GARCIA, J. F.; SCHMITZ, G.; THERES, K.; MCCORMICK, S.; TSIANTIS, M. PROCERA encodes a DELLA protein that mediates control of dissected leaf form in tomato. **Plant Journal,** Oxford, v. 56, n. 4, p. 603–612, 2008.

KIM, D. H.; DOYLE, M. R.; SUNG, S.; AMASINO, R. M. Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 25, p. 277–299, 2009.

KNOTT, J. E. Effect of a localized photoperiod on spinach. **Proceedings of the America Society for Horticultural Science***,* Alexandria, v. 31, p. 152–154, 1934.

KONG, Q.; PATTANAIK, S.; FELLER, A.; WERKMAN, J. R.; CHAI, C. L.; WANG, Y. Q.; GROTEWOLD, E.; YUAN, L. Regulatory switch enforced by basic helix-loop-helix and ACT-domain mediated dimerizations of the maize transcription factor R. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 109, E2091–E2097, 2012.

LIFSCHITZ, E.; EVIATAR, T.; ROZMAN, A.; SHALIT, A.; GOLDSHMIDT, A.; AMSELLEM, Z.; ALVAREZ, J. P.; ESHED, Y. The tomato FT ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 103, n. 16, p. 6398–6403, 2006.

LIU, M.; LIMA GOMES, B.; MILA, I.; PURGATTO, E. O.; PERES, L. E. P.; FRASSE, P.; MAZA, E.; ZOUINE, M.; ROUSTAN, J. P.; BOUZAYEN, M.; PIRRELLO, J. Comprehensive profiling of Ethylene Response Factors expression identifies ripening-associated ERF genes and their link to key regulators of fruit ripening in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Plant Physiology**, Lancaster, v. 170, p. 1732-1744, 2016.

LOHMANN, J. U.; WEIGEL, D. Building beauty: the genetic control of floral patterning. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 2, p. 135–142, 2002.

LOMBARDI-CRESTANA, S.; AZEVEDO, M. D. S.; FERREIRA E SILVA, G. F.; PINO, L. E.; APPEZZATO DA GLORIA, B.; FIGUEIRA, A.; SILVEIRA NOGUEIRA, F. T.; PEREIRA PERES, L. E. The tomato (Solanum lycopersicum cv. Micro-Tom) natural genetic variation Rg1 and the DELLA mutant procera control the competence necessary to form adventitious roots and shoots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, p. 5689–5703, 2012.

LOZANO, R.; GIMÉNEZ, E.; CARA, B.; CAPEL, J.; ANGOSTO, T. Genetic analysis of reproductive development in tomato. **International Journal of Developmental Biology**, Vizcaya, Spain, v. 53, p. 1635-1648, 2009.

MAGOME, H.; NOMURA, T.; HANADA, A.; TAKEDA-KAMIYA, N.; OHNISHI, T.; SHINMAD, Y.; KATSUMATA, T.; KAWAIDE, H.; KAMIYA, Y.; YAMAGUCHI, S. CYP714B1 and CYP714B2 encode gibberellin 13-oxidases that reduce gibberellin activity in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 110, p. 1947–1952, 2013.

MARTÍ, E.; GISBERT, C.; BISHOP, G. J.; DIXON, M. S.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J. L. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 9, p. 2037–2047, 2006.

MARTIN, K.; KOPPERUD, K.; CHAKRABARTY, R.; BANERJEE, R.; BROOKS, R.; GOODIN, M. M. Transient expression in Nicotiana benthamiana fluorescent marker lines provides enhanced definition of protein localization, movement and interactions in planta. **Plant Journal,** Oxford, v. 59, n. 1, p. 150–162, 2009.

MARTINEZ-BELLO, L.; MORITZ, T.; LOPEZ-DIAZ, I. Silencing C19-GA 2-oxidases induces parthenocarpic development and inhibits lateral branching in tomato plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, n. 19, p. 5897–5910, 2015.

McCOMB, A. J. The control by gibberellic acid of stem elongation and flowering in biennial plants of Centaurium minus Moench. **Planta**, Berlin, v. 76, n. 3, p. 242–251, 1967.

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

MICHAELS, S.; AMASINO, R. FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 949–956, 1999.

MICHAELS, S. D. Flowering time regulation produces much fruit. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 12, p. 75–80, 2009.

MOLINERO-ROSALES, N.; JAMILENA, M.; ZURITA, S.; GÓMEZ, P.; CAPEL, J.; LOZANO, R. FALSIFLORA, the tomato orthologue of FLORICAULA and LEAFY,

controls flowering time and floral meristem identity. **Plant Journal,** Oxford, v. 20, n. 6, p. 685–693, 1999.

MOLINERO-ROSALES, N.; LATORRE, A.; JAMILENA, M.; LOZANO, R. Single Flower Truss regulates the transition and maintenance of flowering in tomato. **Planta**, Berlin, v. 218, n. 3, p. 427–434, 2004.

MOUNET, F.; MOING, A.; GARCIA, V.; PETIT, J.; MAUCOURT, M.; DEBORDE, C.; BERNILLON, S.; LEGALL, G.; COLQUHOUN, I.; DEFERNEZ, M.; GIRAUDEL, J. L.; ROLIN, D.; ROTHAN, C.; LEMAIRE-CHAMLEY, M. Gene and metabolite regulatory network analysis of early developing fruit tissues highlight new candidate genes for the control of tomato fruit composition and development. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 149, n. 3, p. 1505–1528, 2009.

NIU, S.; LI, Z.; YUAN, H.; FANG, P.; CHEN, X.; LI, W. Proper gibberellin localization in vascular tissue is required to regulate adventitious root development in tobacco. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, p. 3411–3424, 2013.

ORI, N.; COHEN, A. R.; ETZIONI, A.; BRAND, A.; YANAI, O.; SHLEIZER, S.; MENDA, N.; AMSELLEM, Z.; EFRONI, I.; PEKKER, I.; ALVAREZ, J. P.; BLUM, E.; ZAMIR, D.; ESHED, Y. Regulation of LANCEOLATE by miR319 is required for compound-leaf development in tomato. **Nature Genetics**, New York, v. 39, n. 6, p. 787–791, 2007.

PALATNIK, J. F.; ALLEN, E.; WU, X.; SCHOMMER, C.; SCHWAB, R.; CARRINGTON, J. C.; WEIGEL, D. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. **Nature**, London, v. 425, n. 6955, p. 257–263, 2003.

PALATNIK, J. F.; WOLLMANN, H.; SCHOMMER, C.; SCHWAB, R.; BOISBOUVIER, J.; RODRIGUEZ, R.; WARTHMANN, N.; ALLEN, E.; DEZULIAN, T.; HUSON, D.; CARRINGTON, J. C.; WEIGEL, D. Sequence and Expression Differences Underlie Functional Specialization of Arabidopsis MicroRNAs miR159 and miR319. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 13, n. 1, p. 115–125, 2007.

PARAPUNOVA, V.; BUSSCHER, M.; BUSSCHER-LANGE, J.; LAMMERS, M.; KARLOVA, R.; BOVY, A. G.; ANGENENT, G. C.; DE MAAGD, R. Identification, cloning and characterization of the tomato TCP transcription factor family. **BMC Plant Biology**, London, v. 14, n. 1, p. 157, 2014.

PARK, S. J.; JIANG, K.; SCHATZ, M. C.; LIPPMAN, Z. B. Rate of meristem maturation determines inflorescence architecture in tomato. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 109, n. 2, p. 639–644, 2012.

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

PLAZA-WÜTHRICH, S.; BLOESCH, R.; RINDISBACHER, A.; CANNAROZZI, G.; TADELE, Z. Gibberellin Deficiency Confers Both Lodging and Drought Tolerance in Small Cereals. **Frontiers in Plant Science**, Laussane, v. 7, p. 643, 2016.

PNUELI, L.; CARMEL-GOREN, L.; HAREVEN, D.; GUTFINGER, T.; ALVAREZ, J.; GANAL, M.; ZAMIR, D.; LIFSCHITZ, E. The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1. **Development**, Cambridge, v. 125, n. 11, p. 1979–1989, 1998.

PUTTERILL, J.; ROBSON, F.; LEE, K.; SIMON, R.; COUPLAND, G. The CONSTANS gene of arabidopsis promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. **Cell**, Cambridge, v. 80, n. 6, p. 847–857, 1995.

RADEMACHER, W. Growth retardants: Effects on Gibberellin. **Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, p. 501–531, 2000.

REEVES, P.; COUPLAND, G. Analysis of flowering time control in Arabidopsis by comparison of double and triple mutants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 126, p. 1085–1091, 2001.

RHOADES, M. W.; REINHART, B. J.; LIM, L. P.; BURGE, C. B.; BARTEL, B.; BARTEL, D. P. Prediction of plant microRNA targets. **Cell**, Cambridge, v. 110, n. 4, p. 513–520, 2002.

ROSSMANN, S.; KOHLEN, W.; HASSON, A.; THERES, K. Lateral suppressor and Goblet act in hierarchical order to regulate ectopic meristem formation at the base of tomato leaflets. **Plant Journal,** Oxford, v. 81, p. 837–848, 2015.

RUBIO-SOMOZA, I., ZHOU, C.-M., CONFRARIA, A., MARTINHO, C., VON BORN, P., BAENA-GONZALEZ, E., WANG., J.W., WEIGEL, D. Temporal Control of Leaf Complexity by miRNA-Regulated Licensing of Protein Complexes. **Current Biology**, London, v. 24, n. 22, p. 2714–2719, 2014.

RUIZ-GARCIA, L.; MADUENO, F.; WILKINSON, M.; HAUGHN, G.; SALINAS, J.; MARTINEZ-ZAPATER, J. Different roles of flowering-time genes in the activation of floral initiation genes in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 1921–1934, 1997.

SALINAS, M.; XING, S.; HÖHMANN, S.; BERNDTGEN, R.; HUIJSER, P. Genomic organization, phylogenetic comparison and differential expression of the SBP-box family of transcription factors in tomato. **Planta**, Berlin, v. 235, n. 6, p. 1171–1184, 2012.

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

SCHMITZ, G.; THERES, K. Genetic control of branching in Arabidopsis and tomato. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 2, p. 51–55, 1999.

SCHOMMER, C.; DEBERNARDI, J. M.; BRESSO, E. G.; RODRIGUEZ, R. E.; PALATNIK, J. F. Repression of cell proliferation by miR319-regulated TCP4. **Molecular Plant**, Oxford, v. 7, n. 10, p. 1533–1544, 2014.

SCHUMACHER, K.; SCHMITT, T.; ROSSBERG, M.; SCHMITZ, G.; THERES, K. The Lateral suppressor (Ls) gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 96, n. 1, p. 290–295, 1999.

SCHWAB, R.; PALATNIK, J. F.; RIESTER, M.; SCHOMMER, C.; SCHMID, M.; WEIGEL, D. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 8, n. 4, p. 517–527, 2005.

SERRANI, J. C.; SANJUÁN, R.; RUIZ-RIVERO, O.; FOS, M.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J. L. Gibberellin regulation of fruit set and growth in tomato. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 145, n. 1, p. 246–257, 2007.

SHLEIZER-BURKO, S.; BURKO, Y.; BEN-HERZEL, O.; ORI, N. Dynamic growth program regulated by LANCEOLATE enables flexible leaf patterning. **Development**, Cambridge, v. 138, n. 4, p. 695–704, 2001.

SILVA, G. F.F. e; SILVA, E. M.; AZEVEDO, M. D. S.; GUIVIN, M. A. C.; RAMIRO, D. A.; FIGUEIREDO, C. R.; CARRER, H.; PERES, L. E. P.; NOGUEIRA, F. T. S. MicroRNA156-targeted SPL/SBP box transcription factors regulate tomato ovary and fruit development. **Plant Journal,** Oxford, v. 78, n. 4, p. 604–618, 2014.

SUN, H. J.; UCHII, S.; WATANABE, S.; EZURA, H. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 47, n. 3, p. 426–431, 2006.

TUCKER, D. J. Endogenous growth regulators in relation to side shoot development in the tomato. **New Phytologist**, London, v. 77, p. 561–568, 1976.

TYLER, L.; THOMAS, S. G.; HU, J.; DILL, A.; ALONSO, J. M.; ECKER, J. R. DELLA Proteins and Gibberellin-Regulated Seed Germination and Floral **Development**, Cambridge, v. 135, p. 1008–1019, 2004.

VIDAL, M.; LEGRAIN, P. Yeast forward and reverse 'n'-hybrid systems. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 27, p. 919-929, 1999.

WALTER, M.; CHABAN, C.; SCHUTZE, K.; BATISTIC, O.; WECKERMANN, K.; NAKE, C.; BLAZEVIC, D.; GREFEN, C.; SCHUMACHER, K.; OECKING, C.; HARTER, K.; KUDLA, J. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. **Plant Journal,** Oxford, v. 40, p. 428-438, 2004.

WANG, H.; JONES, B.; LI, Z.; FRASSE, P.; DELALANDE, C.; REGAD, F.; CHAABOUNI, S.; LATCHE, A.; PECH, J. C.; BOUZAYEN, M. The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 10, p. 2676–2692, 2005.

WANG, J. W.; CZECH, B.; WEIGEL, D. miR156-Regulated SPL Transcription Factors Define an Endogenous Flowering Pathway in Arabidopsis thaliana. **Cell**, Cambridge, v. 138, n. 4, p. 738–749, 2009.

WEIGEL, D.; ALVAREZ, J.; SMYTH, D. R.; YANOFSKY, M. F.; MEYEROWITZ, E. M. LEAFY controls floral meristem identity in Arabidopsis. **Cell**, Cambridge, v. 69, n. 5, p. 843–859, 1992.

WILKIE, J. D.; SEDGLEY, M.; OLESEN, T. Regulation of floral initiation in horticultural trees. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 12, p. 3215–3228, 2008.

WILSON, R. N.; HECKMAN, J. W.; SOMERVILLE, C. R. Gibberellin is required for flowering in Arabidopsis thaliana under short days. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 100, p. 403–408, 1992.

WITTWER, S. H.; TEUBNER, F. G. The Effects of Temperature and Nitrogen Nutrition on Flower Formation in the Tomato. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 44, p. 125–129, 1957.

WU, G.; PARK, M. Y.; CONWAY, S. R.; WANG, J. W.; WEIGEL, D.; POETHIG, R. S. The Sequential Action of miR156 and miR172 Regulates Developmental Timing in Arabidopsis. **Cell**, Cambridge, v. 138, n. 4, p. 750–759, 2009.

XIE, K.; WU, C.; XIONG, L. Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 142, n. 1, p. 280-293, 2006.

YAMAGUCHI, S. Gibberellin metabolism and its regulation. **Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 225–251, 2008.

YAMAGUCHI, A.; WU, M. F.; YANG, L.; WU, G.; POETHIG, R. S.; WAGNER, D. The MicroRNA-Regulated SBP-Box Transcription Factor SPL3 Is a Direct Upstream Activator of LEAFY, FRUITFULL, and APETALA1. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 17, n. 2, p. 268–278, 2009.

YAMAGUCHI, N.; WINTER, C. M.; WU, M. F.; KANNO, Y.; YAMAGUCHI, A.; SEO, M.; WAGNER, D. Gibberellin acts positively then negatively to control onset of flower formation in Arabidopsis. **Science**, Washington, v. 344, p. 638–641, 2014.

YANAI, O.; SHANI, E.; RUSS, D.; ORI, N. Gibberellin partly mediates LANCEOLATE activity in tomato. **Plant Journal,** Oxford, v. 68, n. 4, p. 571–582, 2011.

YANG, D. L.; YAO, J.; MEI, C. S.; TONG, X. H.; ZENG, L. J.; LI, Q.; XIAO, L. T.; SUN, T. P.; LI, J.; DENG, X. W.; LEE, C. M.; THOMASHOW, M. F.; YANG, Y.; HE, Z.; HE, S. Y. Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 109: E1192–E1200, 2012.

YU, N.; CAI, W.-J.; WANG, S.; SHAN, C.-M.; WANG, L.-J.; CHEN, X.-Y. Temporal control of trichome distribution by microRNA156-targeted SPL genes in Arabidopsis thaliana. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, n. 7, p. 2322–2335, 2010.

YU, S.; GALVAO, V. C.; ZHANG, Y.-C.; HORRER, D.; ZHANG, T.-Q.; HAO, Y.-H.; WANG, J.-W. Gibberellin Regulates the Arabidopsis Floral Transition through miR156-Targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE Transcription Factors. **The Plant Cell**, Rockville, v. 24, n. 8, p. 3320–3332, 2012.

ZHANG, X.; ZOU, Z.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; HAN, Q.; HU, T.; XU, X.; LIU, H.; LI, H.; YE, Z. Over-expression of sly-miR156a in tomato results in multiple vegetative and reproductive trait alterations and partial phenocopy of the sft mutant. **FEBS Letters***,* Amsterdam, v. 585, n. 2, p. 435-439, 2010.

ANEXO

Anexo A – Tabela de iniciadores (primers).

Primer	Sequência	Acesso	Função	Referência
SFT F	CACCGATATTCCAGCTACCA	Solyc03g063100	qPCR	Presente Trabalho
SFT R	TGTTTGCCGACCTAATTGTC		qPCR	Presente Trabalho
SP F	GGGTTGAAGTTCATGGTGGT	Solyc06g074350	screening *sp*	PNUELI et al., 1998
SP R	AGTGCCTGGAATGTCTGTGA		screening *sp*	PNUELI et al., 1998
F SlySBP3	CACCGAAAATAACAAATGGGAAGGGAA	Solyc10g009080	Clonagem PPI	Presente Trabalho
R SlySBP3	TCAACTTGACCCTTCTCCTGG		Clonagem PPI	Presente Trabalho
F SlySBP15	CACCCACTCTAAGTCTCCTACTGTTGTTGTT	Solyc10g078700	Clonagem PPI	Presente Trabalho
R SlySBP15	TCAAAGAGTCCAGTGCACATTC		Clonagem PPI	Presente Trabalho
F Lanceolate	CACCGCAGAAACGTCAAGATTGGGT	Solyc07g062680	Clonagem PPI	Presente Trabalho
R Lanceolate	TCAATGGCGAGAATCAGAGG		Clonagem PPI	Presente Trabalho
F SlyGAI	CACCAAGAGAGATCGAGATCGAGATCG	Solyc11g011260	Clonagem PPI	Presente Trabalho
R SlyGAI	TTACAACTCGACTTCTCCGGC		Clonagem PPI	Presente Trabalho
Os primers utilizados e não descritos nessa tabela, encontram-se no material suplementar de SILVA et al, 2014)				