

O tomate constricto-alongado: uma nova arquitetura de fruto
induzida pela expressão ectópica de *LANCEOLATE* e alteração de
resposta à auxina em carpelos em formação

Airton de Carvalho Júnior

Botucatu – SP

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

O tomate constricto-alongado: uma nova arquitetura de fruto induzida pela expressão ectópica de *LANCEOLATE* e alteração de resposta à auxina em carpelos em formação

Aluno: Airton de Carvalho Júnior

Orientador: Fábio Tebaldi Silveira Nogueira

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

Botucatu – SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Carvalho Júnior, Airton de.

O tomate constricto-alongado : uma nova arquitetura de fruto induzida pela expressão ectópica de LANCEOLATE e alteração de resposta à auxina em carpelos em formação / Airton de Carvalho Júnior. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fábio Tebaldi Silveira Nogueira

Capes: 20203004

1. Tomate. 2. Lycopersicon esculentum. 3. Genética vegetal. 4. Morfogênese. 5. Auxina. 6. MicroRNAs.

Palavras-chave: Desenvolvimento; Gineceu; Solanum lycopersicum; miR319.

Dedicatória

Dedico a todos que contribuíram afetiva e financeiramente para a conclusão desse trabalho bem como para a minha formação acadêmica e profissional.

Por um Brasil em que fazer Ciência seja mais que uma paixão: seja uma
profissão!

CARVALHO, A. J.

AGRADECIMENTOS

Primeira e prioritariamente a Deus pela oportunidade de cursar o mestrado em Ciências Biológicas (Genética), o que é a realização de um sonho pessoal e profissional.

A minha mãe, Maria Almeida Freire, pelo exemplo moral e pela dedicação incondicional a mim e aos meus irmãos hoje e sempre.

Ao meu pai Airton de Carvalho pelo exemplo de dedicação profissional e superação pessoal (quando as oportunidades não são sequer acessíveis) e pela oportunidade de reconciliação.

Aos meus irmãos Anderson e André por estarmos sempre juntos aprendendo com a trajetória que cada um decidiu seguir e oferecendo suporte mútuo para trilhá-las.

Aos meus irmãos Heloísa e Felipe, que mesmo distantes, têm estado presente nos últimos anos, nos permitindo escrever novos (e melhores) capítulos na história dos *Carvalhos*.

À minha namorada Gabriela por ter me conquistado em tão pouco tempo com seu sorriso, carisma e inteligência. Você tem sido uma das minhas razões de viver nesses últimos três anos e tenho certeza de que continuará sendo por toda uma vida juntos que está por vir. Obrigado por apoiar minhas decisões profissionais, por ampliar meus horizontes e por me ajudar a ser um ser-humano melhor! Te amo *Amora!* Não se esqueça: *Meu coração é regador de Flor.*

Às minhas novas tias de coração: Isabel Maria (*Bel*), Maria Isabel (*Nê*) e Alice Marim! Vocês são muito especiais e exemplos de ser-humano! Obrigado por me adotarem como sobrinho. Amo vocês!

Ao meu orientador Fábio Tebaldi Silveira Nogueira pelo apoio, incentivo e suporte durante o desenvolvimento deste trabalho, mas principalmente, pela confiança depositada no meu potencial acadêmico-profissional. Você é um exemplo do cientista que eu pretendo me tornar.

Ao meu ex-orientador de Bacharelado em Ciências Biológicas, Robson Francisco Carvalho, pelo exemplo de liderança e postura profissional e, principalmente, por me oferecer a primeira oportunidade para iniciar minha carreira acadêmica.

Aos meus amigos do Laboratório GMDV: Eder Silva, Geraldo Silva, Antoine Gady, João Correa, Bianca Ribeiro e Felipe Hermínio. Vocês fizeram todo o trabalho ser muito mais fácil e agradável. Obrigado pela parceria (Eder e Antoine) e pelos conselhos para o melhor desenvolvimento deste trabalho e pela amizade *massa* de vocês, *véio*.

Ao professor Dr. Lázaro Perez, seus alunos e à técnica Cássia por contribuírem com os materiais necessários para o desenvolvimento deste trabalho. Aos amigos: Mateus, Marcela, Heloísa, Maísa e Fred. Obrigado pela ajuda de vocês e pelos momentos de *festar e cafezar*.

Aos meus amigos, ou melhor, irmãos de São Paulo; Bruno, Rodrigo, Juliana e Renato. Por fazerem parte da minha história, pelos *momentos quên: uma lata e quatro copos*. Lembram? Sem o apoio e incentivo de vocês jamais chegaria onde estou hoje.

Aos meus amigos: Cristiane (Larika) e Sérgio (Freadão) pelo companheirismo, amizade e suporte *financeiro-conselheiro (né Freadão?!)* nos anos de Graguação. Se não fosse por esse apoio, talvez não tivesse optado por *este* caminho no Mestrado. Obrigado por fazerem parte da minha história e dos *momentos de articulações!*

Aos meus amigos de Botucatu: Fabiano Parenti, Pedro Sozinho, Ana Prado, Maelson Nascimento, Helder Silva, Adriana de Deus, Elaine Nunes, Elaine Galhardo, Vandinha Souza, Jean Marques e Flávio Codina. Vocês fizeram a diferença nos árduos, mas curtidos anos de Graduação, sem os quais não estaria me tornando Mestre. À amizade de vocês e às memórias das festas, dos luais, das cachoeiras, momentos inesquecíveis, *mesmo para a minha amnésia...*

Aos amigos de casa: Ricardo, Junior, Arnaldo, Valdson, Pedro e Daniel. Obrigado pela amizade, apoio...e por dividirem as contas (*rs*).

À Biologia Integral XLV! Por aprender com todos vocês, pelos momentos, pelas risadas, festas e pelos que me aturaram nos momentos de amnésia pós-acidente. Em especial para; Laura Migliorini, Luana Campos, Thaís Roque, Natália Mendes, Jennifer Tezuka, Suyen Naide, Raísa Melo, Bruna Capoville e Luciana Bérghamo (*in memoriam*).

À FAPESP pelo suporte financeiro para o desenvolvimento deste trabalho oferecido através do processo 2015/07171-0.

A todos que, mesmo não citados, fazem parte da minha história.

ÍNDICE

1.INTRODUÇÃO	12
1.1. Desenvolvimento do gineceu de tomateiro: as fases que determinam o tamanho e forma do fruto.....	12
1.2. O papel da auxina no desenvolvimento do fruto.....	14
1.3. Genes regulatórios do desenvolvimento do carpelo pré-antese.....	15
1.4. Os fatores de transcrição <i>TCPs</i>	17
1.5. O mutante <i>LANCEOLATE (La/+)</i>	18
1.6. miR319a/ <i>LA</i> : uma via regulatória do desenvolvimento vegetal	19
2.2. OBJETIVO	21
2.1. Objetivos específicos.....	21
3. METODOLOGIA	21
3.1. Material vegetal: obtenção dos genótipos, cultivo e coleta.....	21
3.2. Determinação da mutação do mutante <i>La/+</i> introgridido em Micro-Tom.....	23
3.3. Caracterização morfológica e histológica do desenvolvimento do carpelo.....	23
3.4. Hibridização <i>in situ</i> (ISH).....	23
3.4.1. Sondas de hibridização ISH.....	24
3.4.2. Ensaio de hibridização.....	24
3.5. Cruzamento entre plantas mutantes <i>La/+</i> e plantas transgênicas MT <i>pDR5::GUS</i>	25
3.6. Análise quantitativa da expressão gênica por RT-qPCR.....	26
3.6.1. Extração, quantificação e análise da qualidade de RNA total.....	26

3.6.2. Análise quantitativa da expressão gênica por Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR).....	26
3.7. Análises estatísticas.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1. Caracterização do fenótipo reprodutivo do mutante <i>La/+</i>	27
4.1.1. Alterações morfológicas da flor.....	27
4.1.2. Arquitetura constricta-alongada do fruto.....	29
4.1.3. Progressão do fenótipo reprodutivo de plantas <i>La/+</i> : do carpelo ao fruto.....	31
4.1.4. Caracterização do desenvolvimento do carpelo.....	32
4.1.5. Atraso no florescimento.....	34
4.2. Identificação do alelo <i>LANCEOLATE</i>	35
4.3. Regulação do desenvolvimento do carpelo pela via <i>LA/miR319a</i>	37
4.3.1. O padrão de expressão espaço-temporal de <i>LA</i>	37
4.3.1.1. Expressão ectópica de <i>LA</i> no meristema floral (MF) de plantas <i>La/+</i>	37
4.3.1.2. Expressão diferencial de <i>LA</i> no ovário e anteras maduros de plantas <i>La/+</i>	38
4.3.2. Aumento dos níveis de expressão de <i>LA</i> durante o desenvolvimento do carpelo de plantas <i>La/+</i>	40
4.3.3. Expressão do miR319a em ovários de tomateiro.....	42
4.3.3.1. Expressão espaço-temporal do miR319a em ovário e anteras maduros.....	42
4.3.3.2. Regulação temporal de <i>LA</i> pelo miR319a.....	43
4.4. A potencial regulação dos genes <i>SUN</i> e <i>OVATE</i> pela via miR319a/ <i>LA</i>	44
4.5. O aumento de resposta à auxina do mutante <i>La/+</i> determina o padrão de crescimento constricto-alongado do fruto.....	46

4.5.1. O padrão espacial de resposta à auxina nos botões florais de plantas <i>La/+</i>	46
4.5.2. A polarização de resposta à auxina nos carpelos maduros de plantas <i>La/+</i>	47
4.5.3. O acúmulo e a maior responsividade à auxina no carpelo de plantas <i>La/+</i>	49
4. 6. Modelo proposto para o desenvolvimento do fruto de tomateiro.....	52
5. TABELAS SUPLEMENTARES.....	55
6. FIGURAS SUPLEMENTARES.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE TABELAS

TABELAS

Tabela 1. Fases de desenvolvimento: do carpelo ao fruto de tomateiro (<i>Solanum pimpinellifolium</i>).....	13
Tabela 2. Padrão de brotação das plantas do mutante <i>La/+</i>	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura carpelar do tomateiro	14
Figura 2. Comparação fenotípica entre plantas MT e <i>La/+</i>	22
Figura 3. Alterações fenotípicas dos verticilos florais de plantas <i>La/+</i>	28
Figura 4. Modificações da arquitetura do fruto de plantas <i>La/+</i>	30
Figura 5. Padrão de crescimento constricto-alongado do fruto de plantas <i>La/+</i>	31
Figura 6. Progressão fenotípica do mutante <i>La/+</i> : do carpelo ao fruto.....	32
Figura 7. Caracterização histológica do desenvolvimento do carpelo.....	33
Figura 8. O alelo <i>La-1</i> do mutante <i>La/+</i>	36
Figura 9. Expressão ectópica de <i>LA</i> no MF do mutante <i>La/+</i>	37
Figura 10. Expressão diferencial de <i>LA</i> em ovários maduros de plantas <i>La/+</i>	39
Figura 11. Aumento da expressão de <i>LA</i> na morfogênese de ovários de plantas <i>La/+</i>	41
Figura 12. Co-localização do miR319a e <i>LA</i> em ovários maduros.....	42
Figura 13. O padrão de expressão do miR319a.....	43
Figura 14. A superexpressão de <i>SUN</i> durante o desenvolvimento inicial do fruto constricto-alongado do mutante <i>La/+</i>	44

Figura 15. Redução da expressão de OVATE durante o desenvolvimento inicial do fruto constricto-alongado do mutante <i>La/+</i>	45
Figura 16. Localização diferencial de atividade de auxina em botões florais de <i>La/+ pDR5::GUS</i>	46
Figura 17. Polarização basal de resposta à auxina em ovários maduros de <i>La/+ pDR5::GUS</i>	47
Figura 18. Aumento de expressão de <i>ToFZY1</i> no período de maturação do carpelo do mutante <i>La/+</i>	50
Figura 19. Expressão diferencial do gene <i>ARF3</i> durante o desenvolvimento do carpelo do mutante <i>La/+</i>	51
Figura 20. Modelo hipotético das vias regulatórias do desenvolvimento do carpelo do mutante <i>La/+</i>	54
Figura S1. Obtenção da sonda de hibridização <i>LANCEOLATE</i>	55
Figura S2. Eficiência da sonda de hibridização <i>LANCEOLATE</i>	55

RESUMO

Os fatores de transcrição do tipo *Teosinte Branched1/Cycloidea/PCF* (TCP) controlam diferentes aspectos do desenvolvimento vegetal, como morfogênese foliar, simetria floral e padrão de ramificação. Em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), a mutação do gene do tipo TCP *LANCEOLATE* (*LA*) no sítio de reconhecimento do microRNA miR319 promove drástica alteração da arquitetura vegetativa; em vez da característica folha composta de tomateiro, plantas mutantes *La/+* desenvolvem folhas simples de margens não recortadas. Neste estudo, demonstramos que o fruto também apresenta fenótipo alterado: plantas mutantes *La/+* apresentam frutos alongados no eixo proximal-distal e estreitos no eixo meso-lateral. O crescimento diferencial nos eixos de crescimento caracteriza um novo padrão de desenvolvimento do fruto: o constricto-alongado. O carpelo já apresenta essas alterações durante sua morfogênese, as quais são acentuadas progressivamente até a formação do fruto. A caracterização do desenvolvimento do carpelo revela a expressão ectópica de *LA* no meristema floral, indicando que uma alteração espaço-temporal na expressão do gene *LA* no início do desenvolvimento do carpelo determina uma nova arquitetura do ovário e, conseqüentemente, do fruto. A análise de distribuição de auxina no carpelo do mutante indica, ainda, um gradiente basal-apical que pode determinar mais um intrigante fenótipo do fruto de *LA*: a não formação de septos e a formação de uma placenta rudimentar. Adicionalmente, a detecção de uma polarização basal de resposta à auxina no carpelo sugere uma revisão do atual modelo de desenvolvimento do gineceu baseado em arábido e a proposição de um novo modelo de desenvolvimento para o gineceu de tomateiro.

Palavras-chave: desenvolvimento, gineceu, *Solanum lycopersicum*, miR319.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Desenvolvimento do carpelo de tomateiro: as fases que determinam o tamanho e forma do fruto.

O fruto é uma das últimas estruturas a se desenvolver durante o ciclo de vida dos vegetais. No entanto, sua forma e tamanho são determinados previamente em alguns períodos críticos do desenvolvimento; desde o crescimento vegetativo até a formação e determinação das estruturas reprodutivas (Ruan *et al.*, 2012). Apesar de frutos secos e deiscentes representarem a maioria dos frutos das espécies vegetais, os estudos de desenvolvimento de fruto são focados, principalmente, em espécies de frutos carnosos devido a sua importância para a dieta humana. Ênfase tem sido dada, em particular, ao tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) como sistema para análises genéticas e moleculares do desenvolvimento e amadurecimento de frutos carnosos (Giovannoni *et al.*, 2001).

O surgimento do meristema floral (MF) é considerado o início do desenvolvimento do fruto de tomateiro (Tabela 1), pois é o momento em que se inicia o desenvolvimento do carpelo e demais verticilos florais (Xiao *et al.*, 2009). Os primeiros 10 dias de desenvolvimento representam um período crítico que influencia significativamente as dimensões finais do fruto, uma vez que o número de células em divisão e diferenciação vão determinar o tamanho e a forma do carpelo e, conseqüentemente, do fruto maduro (Causier *et al.*, 2010; Palmer *et al.*, 2015). Essa primeira fase é denominada pré-antese (anterior à abertura da flor) e é marcada pela organização das células do MF e delimitação dos limites entre os eixos de crescimento (proximal-distal, meso-lateral e adaxial-abaxial), os quais definem as células que se diferenciam para formar as estruturas carpelares: ovário, estilete, estigma, placenta e óvulos. (Heisler *et al.*, 2001; Nahar *et al.*, 2012). Entre o quinto e sexto dia, ocorre o surgimento dos primórdios carpelares e a formação dos lóculos (Szymkowiak e Sussex, 1992; Brukhin *et al.*, 2003). O carpelo continua se desenvolvendo até o décimo dia, quando se dá a formação dos óvulos, até o estabelecimento da arquitetura final do carpelo, que ocorre por volta do vigésimo dia (Figura 1 - Fig. 1). Ao final desta fase, a formação do carpelo maduro coincide com a antese (abertura da flor), quando ocorre a polinização e fertilização dos óvulos (Gillaspy *et al.*, 1993). Inicia-se, então, a fase pós-antese, período de intensa divisão celular seguido por uma rápida fase de expansão celular que culmina em extensivo aumento no tamanho do fruto (Terao *et al.*, 2013). O último estágio do desenvolvimento do fruto é o amadurecimento, no qual ocorre uma série de modificações

bioquímicas e fisiológicas responsáveis pelas características do fruto maduro (van der Knaap *et al.*, 2014).

Tabela 1. Fases de desenvolvimento: do carpelo ao fruto de tomateiro (*Solanum pimpinellifolium*). Adaptado de Xiao *et al.*, 2009.

Fases	Estágios de desenvolvimento	Eventos celulares	Dias pós-formação do MF
1	Inflorescência e formação do MF	Determinação do número e tamanho das células do MF	0
2	Organização do MF	Identidade celular e delimitação dos eixos de crescimento	1
3	Primórdio carpelar	Proliferação e expansão celular	5-6
4*	Crescimento do carpelo	Diferenciação tecidual	6-10
	Maturação do carpelo	-----	10
	Crescimento do carpelo	Diferenciação tecidual	11-18
5	Antese	-----	19
6	Fertilização e embriogênese	Proliferação	20-25
7	Crescimento do fruto	Extensão	25-39

*: a morfogênese do carpelo compreende o período de 2-10 dias pós formação do MF referente ao intervalo das fases 1-4 do desenvolvimento do fruto. MF: meristema floral.

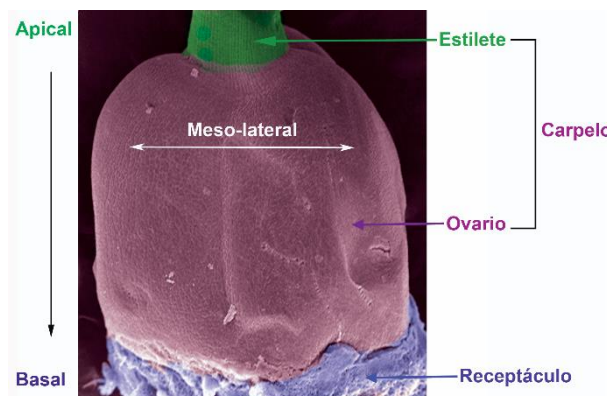


Figura 1. Estrutura carpelar do tomateiro. Microscopia eletrônica de varredura (*false colored*) do gineceu (mostrando estilete, ovário e receptáculo) de tomateiro cv. Micro-Tom (MT). Fonte: Laboratório GMDV.

1.2. O papel da auxina no desenvolvimento do fruto

A participação da auxina no desenvolvimento do carpelo é determinante para o estabelecimento da sua arquitetura, bem como para a formação dos tecidos internos do ovário: a placenta e os óvulos (Robert *et al.*, 2015). Nessa fase inicial do desenvolvimento do fruto, similarmente ao que ocorre na morfogênese foliar, o carpelo cresce a partir de um pico de síntese de auxina no MF controlado pelo posicionamento das proteínas *PIN* (*PIN FORMED PROTEINS*) (Van Mourik *et al.*, 2012). A localização da auxina no MF é fundamental para a delimitação das regiões de surgimento dos primórdios carpelares, as quais coincidem com áreas com menos auxina (Yu e Huang, 2016). Um desarranjo desse posicionamento pode levar a alterações da morfologia da flor, como acontece com o mutante *pin-1* em *arabidopsis* (Vernoux *et al.*, 2000). O crescimento dos verticilos florais é então regulado por importantes fatores transcricionais que controlam o desenvolvimento floral, como *LEAFY* e *APETALA 1*, os quais são induzidos positivamente pela auxina no MF (Winter *et al.*, 2015). O papel da auxina nas etapas subsequentes do desenvolvimento do carpelo ainda não é bem conhecido.

Após o desenvolvimento do carpelo durante o período pré-antese da flor, período considerado a fase inicial do desenvolvimento do fruto (Ruan *et al.*, 2012), o desenvolvimento prossegue pós-antese da flor, momento marcado pela fertilização dos óvulos (van der Knaap *et al.*, 2014). A fase pós-antese é caracterizada basicamente por uma fase de crescimento, em que ocorre o estímulo para o início das divisões celulares e subsequente expansão celular, seguida por uma fase de amadurecimento em que há alteração da coloração e acúmulo de

nutrientes e açúcares que conferem as características organolépticas (*e.g.* sabor e aroma) do fruto (Osorio *et al.*, 2011).

Durante a fase de crescimento, há um aumento no nível de auxina, citocinina e giberelina no fruto, de modo que esses fitohormônios agem de maneira orquestrada para promover a divisão e a expansão celular (Mc Atee *et al.*, 2013). Em tomateiro, há um aumento de giberelina no ovário pós fertilização e posterior aumento da síntese de auxina nas sementes em desenvolvimento (Olimpieri *et al.*, 2007). A auxina produzida é transportada para o pericarpo do fruto, onde induz a síntese de giberelina que promove a expansão celular em sinergia com a auxina (Hu *et al.*, 2008). Esse *crosstalk* entre auxina e giberelina é conhecido como a hipótese de “controle da semente” sobre o crescimento do fruto (Ozga *et al.*, 1992). A síntese inicial de auxina já é detectada, inclusive, em óvulos de até 6 dias antes da antese da flor, momento em que ocorre a fertilização dos óvulos e se inicia o transporte da auxina sintetizada nas sementes para a placenta e pericarpo do fruto (Pattison e Catalá, 2012). Na fase posterior de amadurecimento, há um declínio gradual de síntese de auxina citocinina e giberelina, enquanto ocorre um aumento de ácido abscísico (ABA) e etileno que promovem o transporte de açúcares, redução da acidez e alteração da cor e aroma do fruto (Klee e Giovannoni, 2011). A função de cada hormônio nesses processos ainda não é bem documentada, mas já foi demonstrado que a síntese de ABA precede a do etileno (Jiang *et al.*, 2000) e que a aplicação desse hormônio induz a síntese de etileno por meio da ativação de genes de sua biossíntese (Zhang *et al.*, 2009). Por sua vez, a supressão de ABA resulta em atraso do amadurecimento (Sun *et al.*, 2012). Curiosamente, foi demonstrado que o etileno pode induzir um aumento de síntese de auxina também nessa fase, através da indução de expressão de genes de síntese e sinalização (Trainotti *et al.*, 2007).

1.3. Genes regulatórios do desenvolvimento do carpelo pré-antese

A regulação do desenvolvimento do carpelo ocorre através da interação dos fitohormônios com importantes genes responsáveis pela determinação da forma e tamanho do fruto (Rodríguez *et al.*, 2011). Esses genes regulam o desenvolvimento do carpelo durante as fases de pré-antese, especificamente a partir da formação do MF, a saber: *Locule Number (LC)*, *FASCIATED (FAS)*, *Cell Number Regulator (CNR)*, *OVATE* e *SUN* (van der Knaap *et al.*, 2014). O gene *CNR* controla o número e tamanho de células do MF (Guo *et al.*, 2010),

OVATE e *SUN* estão relacionados com o desenvolvimento de frutos alongados (Wang *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2013) e *FAS* e *LC* controlam o número de lóculos do fruto (Muños *et al.*, 2011). Dentre esses genes, o *OVATE* e o *SUN* são expressos durante o período de surgimento dos primórdios carpelares (Wu *et al.*, 2011), o que sugere que esses genes podem influenciar diretamente a determinação da morfologia do carpelo regulando as taxas de proliferação e expansão celular.

O gene *OVATE* está localizado no cromossomo 2 e codifica proteínas *Ovate Family proteins (OFPs)*, uma nova classe de proteínas identificada em várias espécies vegetais incluindo arábida (19 *OFPs*) e tomateiro (26 *OFPs*) (Liu *et al.*, 2014). A mutação *OVATE* encontrada em tomateiro apresenta um códon prematuro de parada transducional, o que leva à perda do domínio C-terminal 9 (que caracteriza a família *OFP*) conservado em arábida, tomateiro e outras espécies vegetais (Liu *et al.*, 2002). Essa alteração da proteína gera alterações na estrutura do carpelo, além da formação de frutos alongados e/ou oblongos (formato de pêra) (Wu *et al.*, 2015). As modificações no carpelo podem estar associadas com a interação de *OVATE* com um domínio TRM, o qual é característico de uma superfamília de proteínas que participam da síntese e organização de microtúbulos do citoesqueleto; (Spinner *et al.*, 2013; van der Naap *et al.*, 2014). Isso ocorre em função do *OVATE* ser um repressor do crescimento e alongamento do fruto, possivelmente reprimindo a expressão do *SIGA20ox1*, gene de biossíntese de giberelina (Wang *et al.*, 2007). De fato, a expressão transiente de *AtOFP1* e *AtOFP5* em folhas de tabaco detectou sinal de ambos em microtúbulos e plantas que superexpressam *AtOFP1* apresentam redução da expressão de *AtGA20ox1* (Hackbusch *et al.*, 2005). Além da modificação da morfologia do fruto, o aumento da expressão de *OVATE* em tomateiro resulta em redução da estatura da planta e dos verticilos florais (Liu *et al.*, 2002), sugerindo uma regulação pleiotrópica no desenvolvimento vegetal, provavelmente em sinergia com outros importantes genes reguladores do desenvolvimento como *LANCEOLATE (LA)* e *SUN*.

O gene *SUN*, por sua vez, está localizado no cromossomo 7 e codifica uma proteína envolvida na sinalização de cálcio intracelular. Um evento de translocação que ocorre do cromossomo 10 para o 7 no mutante *SUN* de tomateiro resulta em sua maior expressão durante o desenvolvimento da flor e leva à formação de frutos alongados (Jiang *et al.*, 2009). A relação desse fenótipo com o aumento de expressão de *SUN* ainda não está bem

esclarecida, mas já foi demonstrado que o mutante *SUN* apresenta alterações no padrão de divisão e distribuição de células do pericarpo (van der Knaap *et al.*, 2014).

Adicionalmente, plantas obtidas do cruzamento entre mutantes para ambos *OVATE* e *SUN* apresentam efeito sinérgico no alongamento do fruto, indicando o envolvimento em vias comuns de regulação da fase de proliferação e expansão celular (Parapunova *et al.*, 2014). Curiosamente, um fenótipo similar aos frutos desses mutantes é observado no mutante natural de tomateiro do gene do tipo TCP *LANCEOLATE* (mutante *La*).

1.4. Os fatores de transcrição *TCPs*

Plantas mutantes *La* possuem mutação no gene *LANCEOLATE*. Este gene pertence à família de fatores de transcrição do tipo *Teosinte Branched1/Cycloidea/PCF* (TCP; Martin-Trillo *et al.*, 2010). Os *TCPs* controlam diversos aspectos do desenvolvimento, como morfogênese foliar, simetria floral e padrão de ramificação (Uberti *et al.*, 2013). Os *TCPs* são caracterizados pela presença do domínio *basic-helix-loop-helix (bHLH)* de ligação ao DNA e, baseado na homologia deste domínio, os *TCPs* de *Arabidopsis thaliana* são subdivididos em duas classes: classe I e II (Cubas *et al.*, 1999). A classe I é representada pelos *PCFs*, os quais regulam a divisão celular e crescimento em processos como desenvolvimento embrionário (Herve *et al.*, 2009) e biossíntese de pólen (Takeda *et al.*, 2006), enquanto a classe II é representada pelo *Cycloidea (CYC)* e *Teosinte Branched1 (TBI)* que estão relacionados com a determinação da arquitetura da planta, regulando, entre outros processos, a simetria floral (Howarth *et al.*, 2014) e o desenvolvimento das gemas axilares (*branching*), respectivamente (Aguilar-Martínez *et al.*, 2007). As vias moleculares dos *TCPs* de classe II ainda não estão bem esclarecidas, mas já foi demonstrado o papel do *TCP4* na regulação do ciclo celular e na repressão da divisão celular (Aggarwal *et al.*, 2011; Schommer *et al.*, 2014). O gene *TCP4* em *Arabidopsis* é o homólogo de *LA* de tomateiro, o qual também pode ser denominado *SITCP4 (Solanum lycopersicum TCP4)* (Parapunova *et al.*, 2014).

Interessantemente, os *TCPs* de classe II são regulados pós-transcricionalmente pelo microRNA miR319, como é o caso do *LA*, gene que está relacionado com a determinação da arquitetura da planta de tomateiro por meio da regulação do período de diferenciação da morfogênese foliar (Ori *et al.*, 2007).

1.5. O mutante *LANCEOLATE* (*La*)

O fenótipo mais característico da mutação *LANCEOLATE* é a alteração da arquitetura vegetativa: em vez da característica folha composta de tomateiro, o mutante apresenta folha simples de margens não recortadas, o que lhe confere um aspecto morfológico similar a uma lança. Essa mutação apresenta dominância incompleta, o que gera um fenótipo dose-dependente para o alelo *La*; os homozigotos (*La/La*) têm folhas muito pequenas e geralmente não sobrevivem, enquanto os heterozigotos (*La/+*) se desenvolvem e apresentam o fenótipo foliar característico da mutação (Stettler *et al.*, 1964). O fenótipo observado nos mutantes *La/La* e *La/+* deve-se a uma substituição de base no sítio de reconhecimento ao miR319, o que impede a regulação dos seus níveis de expressão por esse microRNA (miRNA) durante a morfogênese foliar (Ori *et al.*, 2007). Curiosamente, a análise da atividade do promotor *pDR5* (promotor sintético responsável ao fitohormônio auxina), revela que o mutante *La/+* apresenta redução de resposta à auxina na região meristemática do primórdio foliar (Ben-Gera e Ori, 2012). Entretanto, a maior expressão de *LA* deveria estar associada com níveis maiores de auxina, uma vez que a diferenciação foliar é adiantada. De fato, o mutante de tomateiro *e* (*entire*), ao liberar a inibição de auxina, apresenta folhas simples similares ao mutante *La/+* (Ben-Gera *et al.*, 2012) e ao duplo mutante *La/+ ;e* (Ben-Gera e Ori, 2012).

O controle de distribuição de auxina também é essencial para a regulação do crescimento proximal-distal e estabelecimento da simetria radial durante o desenvolvimento do carpelo (Moubayidin e Østergaard, 2014), o que indica uma relação com outro fenótipo bastante intrigante e pouco estudado do mutante *La/+*: o desenvolvimento de frutos alongados. Estas características do fruto podem estar associadas com modificações da estrutura do carpelo no eixo de crescimento proximal-distal e/ou meso-lateral durante as fases 2 e 3 da pré-antese, o que sugere alterações na distribuição de auxina ao longo desse eixo de crescimento e nas vias regulatórias de *OVATE* e *SUN*, associadas a um novo padrão de expressão de *LA*. Curiosamente, essas alterações morfológicas do carpelo conferem ao fruto um aspecto similar à pimenta (fruto das espécies do gênero *Capsicum*) o que pode sugerir mutações em alelos de genes conservados entre as espécies da família *Solanaceae* (Kim *et al.*, 2014).

1.6. miR319a/LA: uma via regulatória do desenvolvimento vegetal

Os miRNAs são importantes moléculas envolvidas na regulação da expressão gênica em vias de crescimento e desenvolvimento vegetal (Baulcombe, 2004; Mallory e Vaucheret, 2006). Essas moléculas são pequenos RNAs não codificantes de 19-22 nucleotídeos que regulam a expressão gênica se ligando a um sítio complementar em seus RNAs mensageiros (RNAs) alvo (miRBase 21, <http://www.mirbase.org/>). Essa associação induz a desestabilização e/ou clivagem ou mesmo bloqueamento da tradução do RNAm por associação do complexo miRNA/RNAm alvo com ribozimas argonautas do complexo de silenciamento induzido por miRNA (RISC) (Iwakawa *et al.*, 2013).

O miR319 foi descoberto em plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* *jagged and wavy leaves* (*jaw-D*) por apresentar um drástico fenótipo da folha (complexa e de margem mais recortada) e, conseqüentemente, da arquitetura vegetativa da planta. A descoberta ocorreu durante um *screening* de plantas transgênicas transformadas com um vetor contendo um T-DNA (*Tagging-DNA*) que carrega um *enhancer* viral derivado do pCaMV35S (*cawlflower mosaic virus promoter 35S*). Esse T-DNA se insere randomicamente no genoma e induz a expressão de genes próximos levando ao surgimento de mutantes ganho de função (Weigel *et al.*, 2000). Curiosamente, a análise de *jaw-D* revelou que a inserção do T-DNA ocorreu numa região intergênica do cromossomo 4 onde não foi localizada nenhuma *ORF* (*open region frame*). Isso sugeriu que *JAW* poderia não ser um gene codificador de proteína. Experimentos de microarranjo (*microarray*) identificaram cinco genes *TCPs* com expressão reduzida no mutante *jaw-D* que contêm uma região altamente conservada de 21 nucleotídeos em seus RNAs compartilhada com *TCPs* de 20 espécies. O sequenciamento de *jaw-D* identificou uma sequência complementar à região conservada dos RNAs dos *TCPs* e a análise de expressão indicou superexpressão do transcrito, o que levou à identificação do gene codificador de microRNA (*MIR*) *MIR319* (Palatnik *et al.*, 2003). A estratégia permitiu a descoberta de outros miRNAs e seus alvos por *microarray*, abordagem utilizada posteriormente também em animais (Lim *et al.*, 2005).

A identificação dos alvos do miR319 vieram a partir de estudos com a indução de novas mutações em *jaw-D*, utilizando a aplicação do agente mutagênico EMS (etilmetanosulfanato). Dos mutantes identificados, o *soj8* (*supressor of jaw-D*) apresentou uma mutação no sítio de reconhecimento do miR319 que levou à supressão do fenótipo foliar de *jaw-D*, compensando os altos níveis de expressão do miR319 nessa planta e confirmando a

regulação dos *TCPs* pelo miR319 (Palatnik *et al.*, 2007). Além disso, foi identificada a redução do tamanho da folha em plantas transgênicas de arábida *rTCP4(miR319-resistant TCP)*, o qual possui seis mutações sinônimas inseridas no sítio de reconhecimento do miR319, além da mesma mutação encontrada no mutante *soj8* (Palatnik *et al.*, 2003; 2014).

Os *TCPs* regulados pelo miR319 pertencem à classe II dessa família de fatores de transcrição (Lopez *et al.*, 2015). Em tomateiro, a relação entre os níveis de expressão do miR319 e seus alvos determina o tempo de diferenciação das células presentes na margem foliar (blastozona), região que ao se diferenciar, dá origem a folhas compostas e de margem recortada. No caso do mutante *La*, baixos níveis de expressão do miR319 e altos níveis do gene *LA* geram folhas simples. Em contrapartida, a maior expressão do miR319 e consequente menor expressão do *LA* resulta em crescimento indeterminado das folhas (Ori *et al.*, 2007).

Recentemente, foi demonstrado em *A. thaliana* que das três isoformas do miR319 (miR319a, miR319b e miR319c), o miR319a é a isoforma que regula o gene *TCP4* (Ori *et al.*, 2007) e que a mutação de perda de função para o *MIR319a* leva à formação de pétalas curtas e estames que apresentam deformidades durante o desenvolvimento das anteras (Nag *et al.*, 2009), indicando que a via miR319a/*TCP4* também regula o desenvolvimento de órgãos reprodutivos e, conseqüentemente, a arquitetura floral. O gene *CINCINNATA*, outro homólogo de *LA* em *Antirrhinum*, regula o desenvolvimento de pétalas (Crawford *et al.*, 2004). Essas evidências sugerem que as vias de regulação da morfogênese foliar podem regular também o desenvolvimento dos verticilos florais em tomateiro.

Embora a importância dessa via para o desenvolvimento vegetativo e de algumas estruturas florais já esteja estabelecida, ainda não havia sido esclarecido o papel da via *miR319a/LANCEOLATE* durante o desenvolvimento do carpelo de tomateiro, estrutura floral que determina a forma e o tamanho dos frutos. Portanto, a hipótese deste trabalho é que a via *miR319a/LANCEOLATE* regule o desenvolvimento dos carpelos em tomateiro, similarmente ao seu controle do desenvolvimento foliar. Tal controle pode envolver, ainda, modificações de resposta ao fitohormônio auxina e modulação de expressão de genes associados ao estabelecimento da arquitetura carpelar e ao desenvolvimento inicial do fruto.

2. OBJETIVO

Avaliar a via *miR319a/LANCEOLATE* no desenvolvimento dos carpelos e frutos de tomateiro cv. Micro-Tom (MT).

2.1. Objetivos específicos

Caracterizar o desenvolvimento dos ovários pré-antese no mutante *LANCEOLATE* (*La/+*) introgridido no cultivar MT:

- Avaliar a expressão do gene *LANCEOLATE* e *miR319a*, bem como dos genes *OVATE* e *SUN* e genes das vias de biogênese e sinalização de auxina, em ovários de plantas MT e do mutante *La/+*.

- Determinar a expressão espaço-temporal do *LANCEOLATE* e do *miR319a* em ovários pré-antese por hibridização *in situ*.

- Avaliar o padrão de distribuição de auxina em ovários pré-antese de plantas transgênicas MT-*pDR5::GUS* e progênie advinda de cruzamentos das plantas *La/+ X MT-pDR5::GUS*.

3. METODOLOGIA

3.1. Material vegetal: obtenção dos genótipos, cultivo e coleta

O desenvolvimento do carpelo e fruto foi avaliado em tomateiro Micro-Tom (MT), planta modelo que apresenta pequeno tamanho, ciclo de vida curto e fácil transformação genética (Meissner *et al.*, 1997). A mutação *LANCEOLATE* (acesso LA0335; <http://plantontology.org/>) foi introgridida no *background* MT pelo grupo do prof. Lázaro E. P. Péres (ESALQ/USP), de modo que os mutantes *La/+* estão na geração BC₆F_n e, portanto, somente possuem a mutação *LA* diferente das plantas MT. O fenótipo característico de folhas simples e não recortadas foi observado em todas as plantas *La/+* no *background* MT (<http://www.esalq.usp.br/tomato/Lanceolate.pdf>) (Fig. 2).



Figura 2. Comparação fenotípica entre plantas MT e *La/+*.

As plantas foram semeadas em vasos de 250 mL contendo uma mistura 1:1 (por volume) de substrato comercial (*Plantmax HT Eucatex*, Brasil) e vermiculita, suplementada com 1 g/L de NPK 10:10:10 e 4 g/L de calcário. Quando o primeiro par de folhas verdadeiras foi observado, as plântulas foram transplantadas individualmente para vasos de 150 mL contendo a mesma mistura de substrato.

Os botões florais e carpelos analisados em todos os experimentos foram coletados em período pré-antese e estabelecidos dois estágios de desenvolvimento: da formação do MF até o crescimento dos primórdios carpelares (período de 2-5 dias pós-formação do MF ou pós-inflorescência – 2-5dpi) e da fusão dos primórdios carpelares e crescimento do carpelo até a sua maturação, o que compreende o período de 6-10 dpi (Xiao *et al.*, 2009; tabela 1). Para melhor apresentação dos dados, foi adotado a seguinte nomenclatura para os dois períodos: P1 (2-5 dpi) e P2 (6-10 dpi). As coletas foram realizadas após análise da diferença do período de florescimento entre MT e *La/+* a partir da avaliação de *shoot branching* (Busch *et al.*, 2011), método que determina o surgimento da primeira inflorescência visível.

3.2. Determinação da mutação do mutante *La/+* introgridido em Micro-Tom

A identificação do alelo mutado *La* foi realizada a partir da clonagem da *ORF* do gene *LA* das plantas obtidas do acesso LA0335 e das plantas *La/+* no *background* MT. A clonagem foi realizada a partir da extração de DNA das plantas, amplificação da *ORF* utilizando os primers *forward* (CCAGCCCACTTTGGAGGAAA) e *reverse* (TTCAAGTAGAGCATTTCCCTGTCA) que flanqueiam o sítio de ligação do miR319a e subsequente ligação do *amplicom* no vetor *pENTR* (*pENTR/D-TOPO Cloning Kit* – Invitrogen - EUA). Posteriormente, bactérias *E. coli* da linhagem *TOP10* foram transformadas com o vetor contendo o inserto clonado. O DNA plasmidial de pelo menos três clones independentes foi então extraído, purificado e enviado para sequenciamento na plataforma *3500 Genetic Analyzer* (*Thermo Fisher Scientific* – EUA).

3.3. Caracterização morfológica e histológica do desenvolvimento do carpelo

Plantas MT e *La/+* foram avaliadas quanto à morfologia do fruto e dos verticilos florais, principalmente do ovário em pré-antese, fase que representa o desenvolvimento inicial dos frutos de tomateiro. A análise dos frutos foi realizada por fotografias e mensuração dos eixos de crescimento proximal-distal e meso-lateral para estabelecer a relação entre o comprimento e largura dos frutos de cada genótipo. A análise do desenvolvimento do carpelo foi feita nos dois períodos (P1 e P2) por fotografia e confecção de lâminas histológicas. O tecido foi fixado em solução de Karnovsky, desidratado em serie etílica crescente (10% a 100%) e infiltrado em resina sintética 2- hidroxietilmetacrilato (*Leica Histo Resin Embedding Kit* – *Leica - Alemanha*) de acordo com as recomendações do fabricante. As secções obtidas com espessura de 8 µm do material foram feitas em micrótomo rotativo (*Leica - EUA*) e para a coloração foi utilizado o azul de toluidina 0,05%. As lâminas permanentes foram montadas com resina sintética (*Entellan*).

3.4. Hibridização *in situ* (ISH)

O protocolo de hibridização *in situ* (ISH) é complexo e muito longo e leva cerca de 30 dias para ser finalizado (Javelle *et al.*, 2011). O experimento se inicia com a coleta dos ovários pré-antese nos períodos P1 e P2 e prossegue, em suma, com as seguintes etapas;

fixação do tecido, desidratação, infiltração de solvente orgânico (*Histoclear* - *Sigma* - *EUA*), infiltração de parafina e montagem de blocos, os quais são seccionados (8-10 µm) em micrótomo (*Leica* - *EUA*) para confecção das lâminas histológicas utilizadas no ensaio de hibridização. Posteriormente, foram obtidas as sondas de hibridização para prosseguir com o ensaio de hibridização descrito a seguir.

3.4.1. Sondas de hibridização ISH

A detecção da expressão do miR319a foi obtida pela utilização de sondas LNA (*locked nucleic acid*) (*Biotika*). Foram utilizadas duas sondas no ensaio de hibridização: a sonda de detecção, que tem sequência complementar ao miR319a (5'-AACCTGACTTCCCTCGAGGGA) e uma sonda como controle negativo, de sequência aleatória ou *Scramble*-miR (5'-GTGTAACACGTCTATACGCCCA) (*Exiqon*, USA).

A região 1254-1785 da *ORF* do gene *LA* foi amplificada de *S. lycopersicum* utilizando os primers *foward* (CCAGCCCACTTTGGAGGAAA) e *reverse* (TTCAAGTAGAGCATTTCCCTGTCA), inserida em *pGENT-Easy* (*Promega* - *EUA*) e clonada em colônia permanente de *E. coli* (Figura Suplementar 1A - Fig. S1A). O DNA plasmidial foi então extraído e enviado para sequenciamento para confirmação da integridade da sequência. O vetor contendo o *LA* foi linearizado por digestão enzimática utilizando a enzima de restrição *SacI* e submetido à transcrição *in vitro* (Fig. S1B) utilizando o *DIG RNA labeling kit (SP6/T7)* (*Roche* - *Suíça*). A eficiência da sonda foi analisada em diferentes concentrações pelo teste *Dot blot* (Fig. S2) e o ensaio de hibridização foi realizado a partir de protocolo adaptado (Javelle *et al.*, 2011).

3.4.2. Ensaio de hibridização

O processo da hibridização das sondas de *LA* e do miR319a com seus respectivos RNAs alvos *in situ* é realizada de acordo com as etapas descritas por (Javelle *et al.*, 2011). Em síntese, as lâminas histológicas passam por solução de desparafinação (*Histoclear* - *Natinal Diagnostics*), desidratação do tecido por série alcóolica, tratamento com proteínase k para facilitar infiltração da sonda no tecido, remoção de grupos amino carregados positivamente, reidratação do tecido por série alcóolica inversa, aplicação da sonda de

hibridização, incubação *overnight*, lavagem com albumina de soro bovino diluída (BSA-Sigma - EUA), tratamento com RNAase A (Invitrogen - EUA), imersão em solução contendo anticorpos primários anti-digoxigenina (AP-anti-DIG), incubação *overnight*, aplicação do substrato NBT/BCIP (Roche - Irland) reativo à fosfatase alcalina (ligada à digoxigenina na sonda) , acompanhamento de detecção de sinal, bateria de série alcóolica, imersão em *Histoclear* e, finalmente, montagem das lâminas.

3.5. Cruzamentos entre plantas mutantes *La/+* e plantas transgênicas MT *pDR5::GUS*

O efeito da mutação *La-1* na distribuição e acúmulo de auxina foi avaliada por meio do cruzamento entre plantas mutantes *La/+* e plantas transgênicas MT-*pDR5::GUS*. Essas plantas contém em seu genoma o gene quimérico *pDR5::GUS*. Essa construção genética é constituída de promotor sintético *pDR5* que é responsivo à auxina, o qual dirige a expressão do gene *uidA/gus*, gene codificador da enzima β -glucuronidase. A expressão espaço-temporal desse gene é amplamente utilizada para avaliar indiretamente o acúmulo e distribuição do fitohormônio auxina após teste histoquímico da enzima β -glucuronidase em tecidos vegetais (Maraschin *et al.*, 2009).

Os genótipos foram cruzados por métodos convencionais: deposição de pólen coletado de flores da planta doadora no estigma de ovários de flores emasculadas da planta receptora (Sacks *et al.*, 1997). Após crescimento e maturação dos frutos, foram coletadas sementes para semeadura. Da geração F1 dessas sementes, foram selecionadas as plantas *La/+* que são obrigatoriamente hemizigotas para *pDR5*. As plantas foram triadas de acordo com o fenótipo da folha (*La/+*) e aplicação do antibiótico canamicina para seleção do transgene *pDR5::GUS* (presença do gene marcador *nptII* que cosegrega com *pDR5::GUS*). Posteriormente, foram realizadas análises para determinação do padrão de distribuição de auxina em ovários pré-antese via teste histoquímico da enzima β -glucuronidase com substrato X-GLUC (5-bromo-4-cloro-3-indolil glucoronida). Foram realizados experimentos de *time-coursing* avaliando o melhor tempo de incubação do material vegetal com o tampão contendo o substrato X-GLUC, nas seguintes condições: infiltração a vácuo por 30 minutos e pós-incubação por 60 minutos a 37 ° C.

3. 6. Análise quantitativa da expressão gênica por Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR)

3.6.1. Extração, quantificação e análise da qualidade de RNA total

A extração de RNA total foi feita a partir de 4 amostras biológicas obtidas da coleta de ovários pré-antese de MT e *La/+* nos períodos P1 e P2. O procedimento foi realizado seguindo as recomendações do fabricante do reagente *Trizol* (*Invitrogen - EUA*). Cada amostra biológica corresponde a 10 botões florais de 1-3 milímetros (P1) ou 10 ovários coletados de flores emasculadas (P2) de cada genótipo (MT e *La/+*). Após a coleta, as amostras foram adicionadas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas em biofreezer (-80° C) para posterior maceração em almofariz. Após a extração do RNA total, as amostras foram tratadas com 2 µl de DNase I (*Amplification Grade – Invitrogen - EUA*), seguindo as recomendações do fabricante para remoção total de DNA genômico. Em seguida, a qualidade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com 0,001% (v/v) de brometo de etídio, em tampão de corrida TAE 1X (40mM Tris-acetato; 1mM EDTA) com tensão constante de 120V. A concentração e pureza do RNA foram avaliadas por espectrofotometria de absorção, utilizando o equipamento *Thermo NanoDrop 2000* (*Uniscience - Alemanha*), considerando amostras ótimas com valores das razões de absorbância 260/280 e 260/230 >1,9.

3.6.2. Avaliação da expressão gênica por RT- PCR em Tempo Real (RT-qPCR)

As análises de expressão gênica em tempo real (RT-qPCR) de *LA*, *miR319a*, *SUN*, *OVATE*, *ToFZY1* e *ARF3* foram realizadas em ovários pré-antese das plantas MT e *La/+* nos períodos P1 e P2. A transcrição reversa do *miR319a* foi realizada utilizando o método *Pulsed stem-loop* RT-PCR (Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007; Ferreira e Silva *et al.*, 2014). Tal metodologia é utilizada com eficiência em tomateiro quando acoplada ao PCR quantitativo para avaliar a quantificação de microRNAs (Feng *et al.*, 2009). Os primers utilizados para os genes avaliados e para o *miR319a* estão relacionados no material suplementar (Tabelas S1 e S2). Para obtenção do cDNA dos genes, foi utilizado o *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (*Promega - EUA*) com primers Oligo dt para os RNAs.

Foram utilizados 2,5 µl de cDNA para um volume total de 25 µl de reação de qPCR utilizando-se os ensaios *SYBR Green PCR master mix* (Life Technologies - EUA), contendo primers específicos para cada gene ou miRNA. As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas no sistema *One Step PCR System* (Life Technologies - EUA). As reações foram amplificadas por 10 segundos a 95°C, seguido de 40 a 50 ciclos de 95°C por 10 segundos e 72°C por 30 segundos. Todas as reações foram realizadas em triplicatas e com controle negativo (sem adição de amostra cDNA). A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método do *Ct* comparativo pelo *software* homônimo da mesma plataforma. O gene *SAND* (SGN-U316474) foi utilizado como gene de referência por apresentar valores estáveis de expressão durante o desenvolvimento dos verticilos florais (Expósito-Rodríguez *et al.*, 2008).

3.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas morfológicas (número de sementes e medição do comprimento e largura dos frutos) e de qPCR foram realizadas pelo teste *t-student* no *software Sigma Stat 3.5* (Sistat Software Inc. - EUA). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$ e apresentados como média \pm erro padrão (Cumming *et al.*, 2007) de quatro amostras biológicas (utilizadas para obtenção dos resultados de qPCR).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. 1. Caracterização do fenótipo reprodutivo do mutante *La/+*

4. 1. 1. Alterações morfológicas da flor

As flores das plantas mutantes *La/+* apresentam fenótipos característicos do mutante, tais como diminuição do comprimento das sépalas e estames retorcidos em seu próprio eixo (Stettler *et al.*, 1964), mas também, pétalas retorcidas similares ao formato “lanceolado” das folhas e estigma aparente no ápice do cone de anteras (Fig. 3). É interessante notar que a diminuição de comprimento de sépalas é um fenótipo também observado em mutante de perda de função para o gene *MIR319a* em arábido (Nag *et al.*, 2009), sugerindo conservação da regulação do desenvolvimento de sépalas pela via *miR319/TCP4* em arábido e tomateiro.

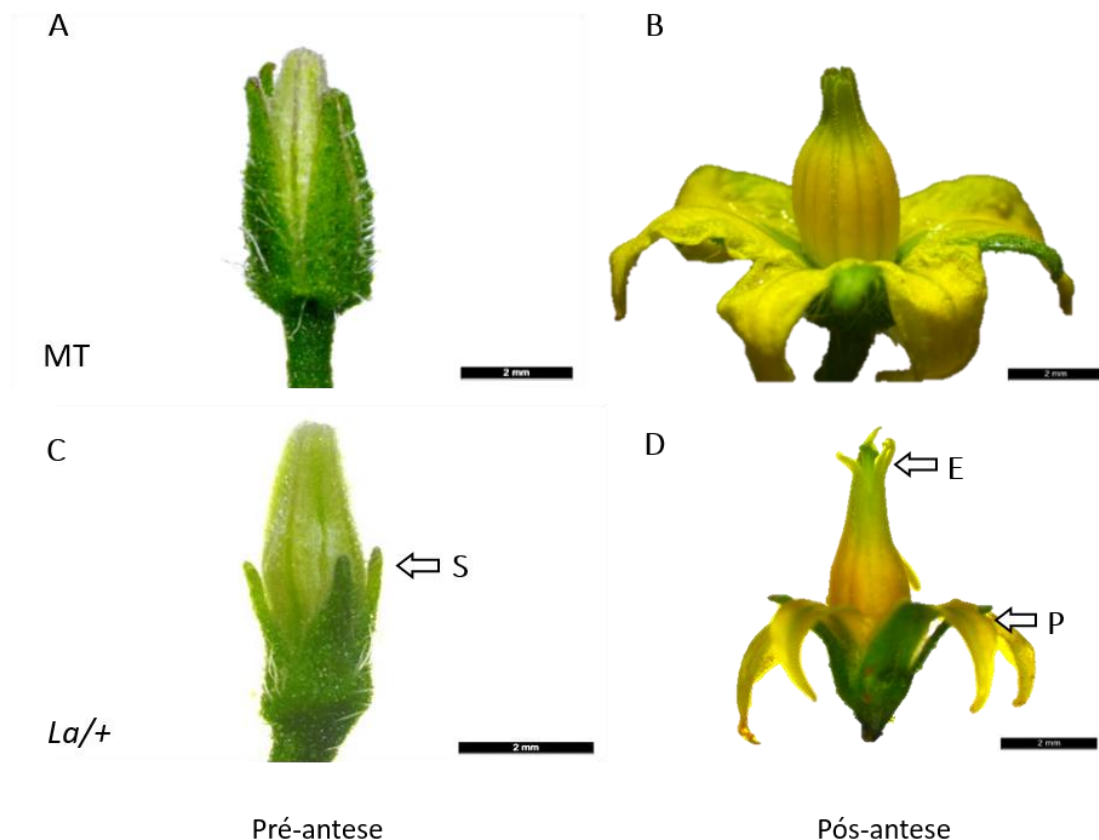


Figura 3. Alterações fenotípicas dos verticilos florais de *La/+*. A e B: botão floral e flor pós-antese de MT, respectivamente. C e D: o botão floral de *La/+* apresenta sépalas reduzidas (seta) e pétalas com aspecto similar às folhas do mutante, enquanto a flor apresenta heteroestilia (estigma acima do cone de anteras -seta). S: sépala; P: pétala; E: estigma.

O crescimento do estilete até ultrapassar o limite superior do cone de anteras é denominado *exserted stigma* (ou heteroestilia) e dificulta ou impede a autopolinização (Motten e Stone, 2000). Fenótipo similar é observado no mutante *procera* de fenótipo pronunciado (*pro*^{ΔGRAS}) que, além da heteroestilia, apresenta também redução do número de sementes e atraso do florescimento (Livne *et al.*, 2015). O gene *PROCERA* (*PRO*) (da família *GRAS* em *arabidopsis*) codifica para uma proteína repressora da resposta à giberelina (GA) e seu mutante *pro* exibe alongamento das regiões entre-nós do caule e folhas menores e mais finas (Bassel *et al.*, 2008). A supressão da atividade de *PRO* no mutante *pro*^{ΔGRAS} promove aumento de resposta à GA induzindo crescimento do ovário independente de polinização e resultando na formação de frutos partenocárpicos (Martí *et al.*, 2007). Curiosamente, *LA* apresenta expressão elevada do *SIGA20oxidase1* (*SIGA20ox1*), gene da via de biossíntese de GA em tomateiro, enquanto plantas que superexpressam o miR319a apresentam aumento da

expressão do *SlGA2ox4*, gene da via de degradação de GA (Yanai *et al.*, 2011). A heteroestilia caracteriza, portanto, mais um intrigante fenótipo do mutante *La/+*, uma vez que a maior atividade de GA pode estar associada não só à exposição do estigma acima do cone de anteras como também às demais modificações da morfologia do carpelo e fruto (Fig. 3). De fato, a análise de *shoot branching* indica atraso do florescimento de *La/+* (Tabela 2) e frutos com drástica redução do número de sementes (Fig. 4B), assim como observado no mutante *pro*^{ΔGRAS} (Livne *et al.*, 2015).

4. 1. 2. Arquitetura constrita-alongada do fruto

Os frutos de *La/+* apresentam um crescimento diferenciado dos eixos de crescimento: um aumento do crescimento no eixo proximal-distal e uma simultânea diminuição meso-lateral (Figs. 4A e 4C), sendo que os frutos de fenótipo extremo apresentam uma acentuada constrição meso-lateral (Fig. 5A). Cortes longitudinais dos frutos revelam que a arquitetura do fruto também é alterada internamente com a formação de menor número de lóculos e sementes (Fig. 4C), sendo por vezes, mal desenvolvidas (não mostrado). Outros fenótipos intrigantes são a ausência de septos e a formação de uma placenta rudimentar, o que implica no não estabelecimento da placentação axial característica do fruto de tomateiro (Fig. 4C). A significativa diferença de crescimento entre os eixos proximal distal e meso-lateral, associada a não formação do septo e placenta e à heteroestilia (Fig. 3), podem determinar a baixa fertilidade de *La/+*, no que diz respeito ao baixo número de sementes formadas (Fig. 4B).

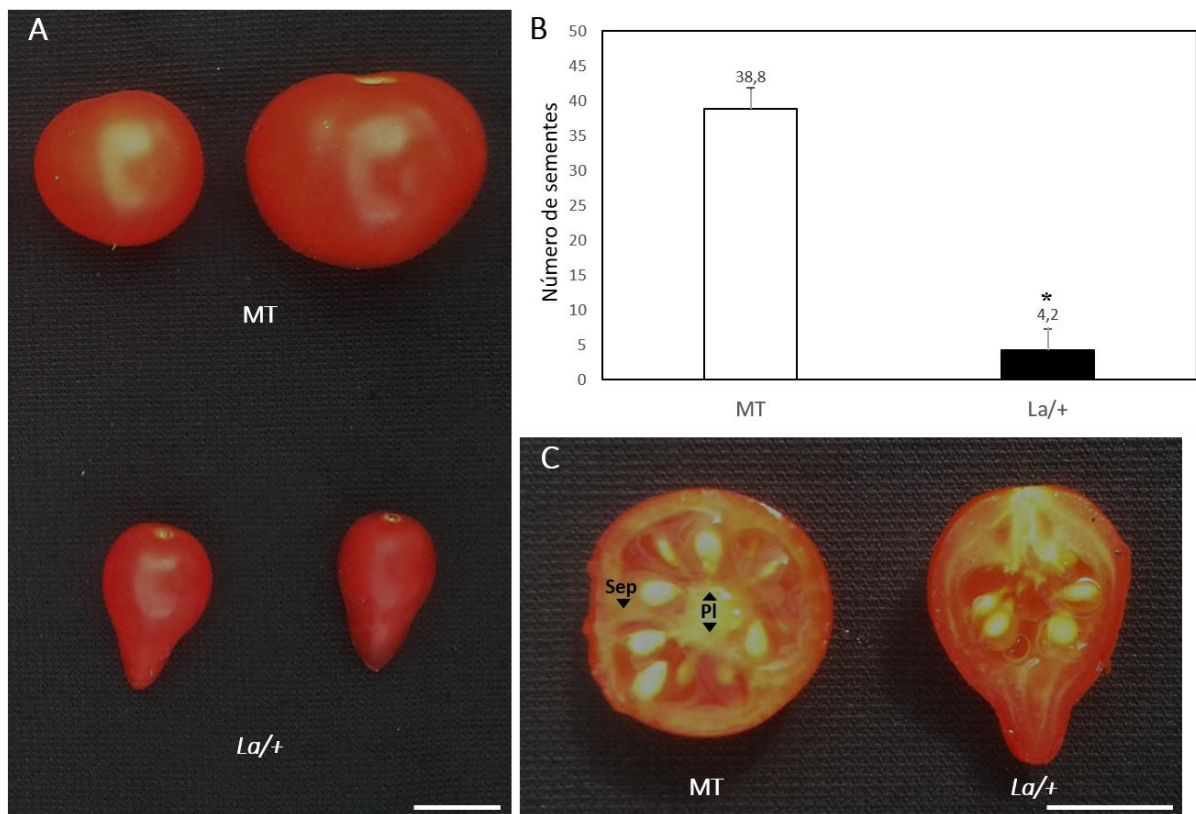


Figura 4. Modificações da arquitetura do fruto de *La/+*. Fenótipo interno dos frutos de *La/+* e relação com a produção de sementes **A:** comparação dos frutos de MT e *La/+*. **B:** baixa produção de sementes de *La/+*. O asterisco corresponde à significância pelo teste *t-student* ($p < 0,05$). **C:** ausência da formação de septo e placenta no mutante *La/+* (setas comparativas em MT). Pl: placenta; Sep: septo.

A análise mais precisa da diferença entre o crescimento dos eixos proximal-distal e meso-lateral revela que o fruto do mutante *La/+* apresenta uma relação entre comprimento e largura de 1,7, enquanto essa relação para MT é de aproximadamente igual a 1,0 (Fig. 5C). Essa relação é estabelecida em função do estreitamento meso-lateral, mas também do alongamento proximal-distal e demonstra que o fenótipo alongado observado no fruto de *La/+* ocorre em decorrência desse padrão alterado de crescimento, o qual foi denominado neste trabalho de **constrito-alongado** para *La/+* e **isométrico** para MT (Fig. 5B).

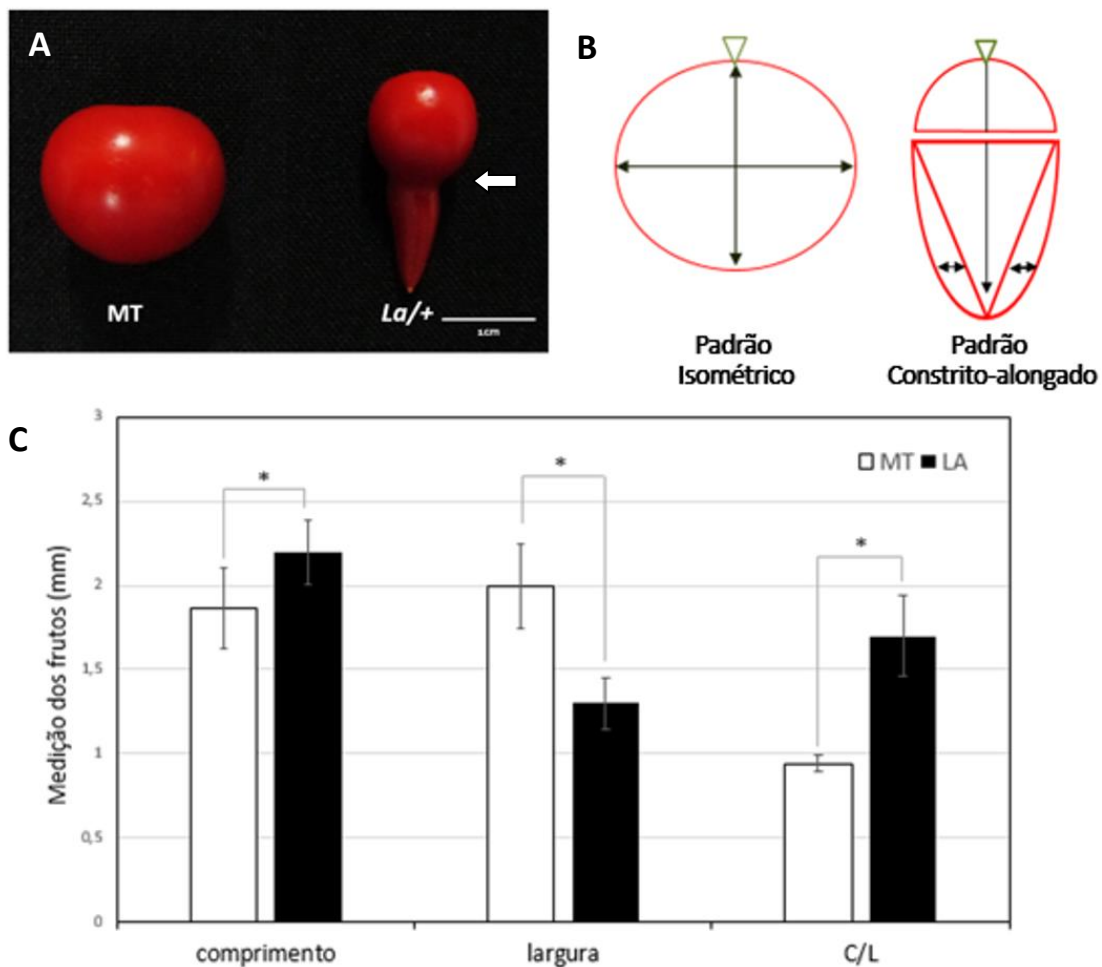


Figura 5. Padrão de crescimento constricto-elongado do fruto de *La/+*. Maior relação entre comprimento e largura estabelece o padrão de crescimento constricto-elongado do mutante *La/+* em comparação com padrão isométrico de MT. **A:** Constrictão meso-lateral (seta) no fruto de *La/+*. **B:** modelos de crescimento de MT e *La/+*. **C:** Relação entre comprimento e largura dos frutos de plantas MT e *La/+*. Os asteriscos correspondem à significância pelo teste *t-student* ($P < 0,05$).

4. 1. 3. Progressão do fenótipo reprodutivo de *La/+*: do carpelo ao fruto.

Diferentemente de ovários de MT (Fig. 6A), os ovários em pré-antese das flores das plantas *La/+* apresentam padrão de crescimento dos frutos com aparente alongamento do eixo proximal-distal e uma constrictão meso-lateral, o que confere ao carpelo um aspecto de pêra e/ou pimenta (Fig. 6D). A progressão do fenótipo constricto-elongado do carpelo até a formação do fruto maduro de *La/+* (Fig. 6D-F) indica que a determinação desse padrão de crescimento deve ocorrer nos primeiros estágios de desenvolvimento do fruto.

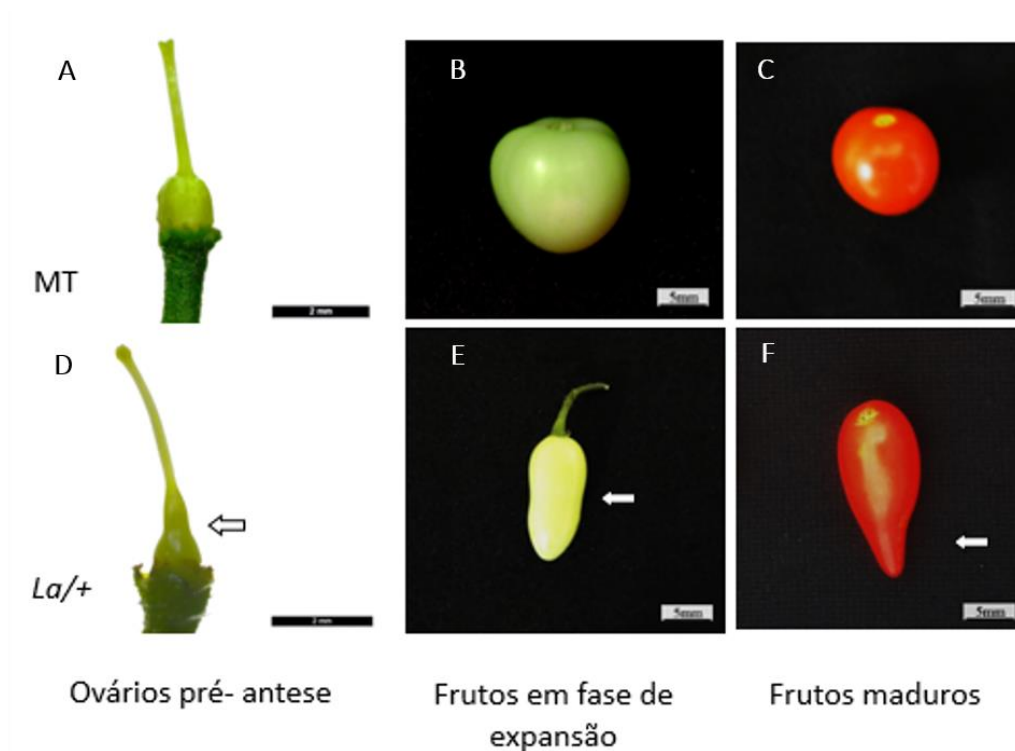


Figura 6. Progressão fenotípica do mutante *La/+*: do carpelo ao fruto. A-C: desenvolvimento do carpelo ao fruto de plantas MT. D-F: progressão do alongamento proximal-distal e constrição meso-lateral do carpelo ao fruto de plantas *La/+*. Setas indicam progressão do crescimento constrito-alongado.

4. 1. 4. Caracterização do desenvolvimento do carpelo

As análises histológicas ao longo do desenvolvimento dos carpelos (2-10 dpi) demonstram que o alongamento do ovário no eixo proximal-distal e a constrição meso-lateral observada no carpelo maduro de *La/+* (Fig. 7D) são determinadas já no período P1 (2-5 dpi) (Fig. 7C), durante a formação dos primórdios carpelares, quando comparado ao desenvolvimento dos mesmos órgãos em MT (Fig. 7A). Essa modificação é mantida até a formação do ovário maduro de *La/+* no período P2 (Fig. 7D), diferentemente do que é observado para os ovários de plantas MT (Fig. 7A-B), os quais não desenvolvem o padrão constrito-alongado.

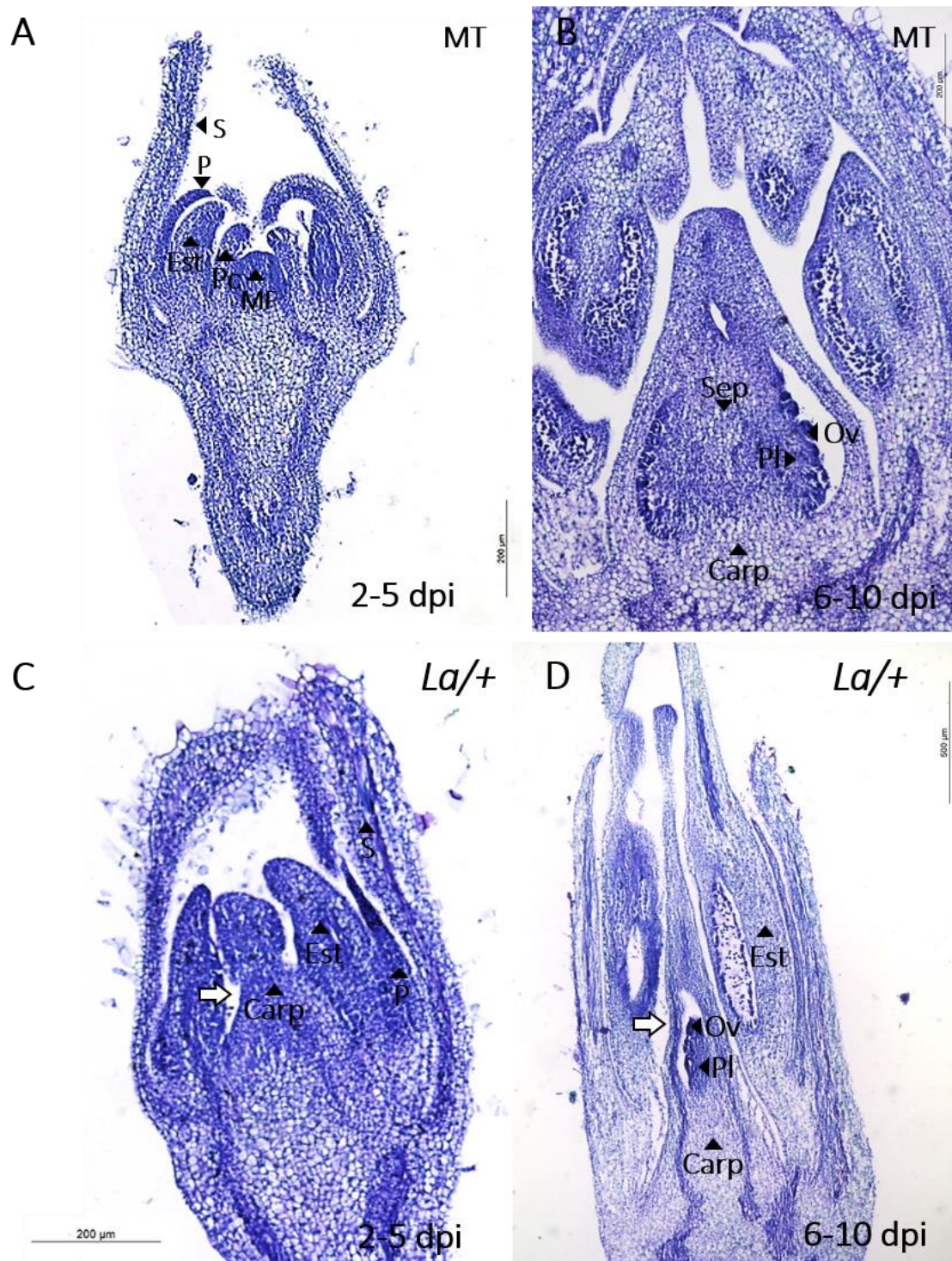


Figura 7. Caracterização histológica do desenvolvimento do carpelo. A-B: desenvolvimento do carpelo de MT. **C-D:** Formação do carpelo do mutante *La/+*, com destaque para a progressão da constrição meso-lateral desde os primórdios carpelares fusionados (seta) até o carpelo maduro (seta). Carp: carpelo; Est: estame; MF: meristema floral; Ov: óvulo; P: pétala; Pc: primórdio carpelar; Pl: placenta; S: sépala; Sep: septo.

Stettler e colaboradores (1964) já haviam sugerido que a redução do crescimento meso-lateral de primórdios foliares do mutante *LANCEOLATE* ocorresse devido a uma menor taxa de divisão celular do meristema lateral. No entanto, ainda não está esclarecido quais genes interagem com *LA* na regulação do crescimento do carpelo em seus diferentes eixos. Os genes *SUN* e *OVATE* são conhecidos por regularem, especificamente, o crescimento do eixo proximal-distal dos frutos de tomateiro (Rodríguez *et al.*, 2011; van der Knaap *et al.*, 2014). Recentemente foi demonstrado que o duplo-mutante *ovate;sun* tem efeito sinérgico das duas mutações na determinação do fenótipo de carpelos e frutos alongados, com predominância de *sun* sobre o fenótipo (Wu *et al.*, 2015). Esses estudos sugerem uma possível interação entre *LA*, *SUN* e *OVATE* de modo que, no mutante *La/+*, esses genes também interfiram na regulação da taxa de divisão celular no eixo proximal-distal do meristema floral à formação do carpelo maduro. Portanto, a expressão dos genes *SUN* e *OVATE* foi avaliada nos botões florais do mutante *La/+* (ver tópico abaixo).

4. 1. 5. Atraso do florescimento de *La/+*

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 e Lotan, 2007). A análise do padrão de brotação das plantas *La/+* demonstra atraso do florescimento que ocorre após o desenvolvimento, em média, de sete folhas (Tabela 2), enquanto plantas MT produzem em média cinco folhas antes de florescerem (Vicente *et al.*, 2015).

Tabela 2. Padrão de brotação das plantas *La/+*. (L): folhas (*leaves*) uma ou 2 folhas; (+): brotação de ramo lateral.

Planta	Número de folhas produzidas na fase vegetativa	Padrão de brotação*
1	8	2(L)3(+),4(+),5(+),6(+),7(+)
2	8	2(L),3(L),4(L),5(L),6(+),7(+)
3	7	1(L),2(L),3(L),4(L),5(+),6(+)
4	6	1(L),2(+)3(+),4(+),5(+)
5	7	1(L),2(+)3(+),4(+),5(+),6(+)
6	7	1(L),2(L),3(+),4(L),5(+),6(+)
Média	7,16 ± 0,3 ^a	

^aValores do número de folhas produzidas na fase vegetativa estão expressos como média ± erro padrão (EP).

*Cada linha corresponde a uma planta independente e os números da coluna “padrão de brotação” correspondem a cada axila do caule, começando imediatamente após os cotilédones. Os caracteres utilizados entre parênteses correspondem à brotação (+) e ao desenvolvimento da gema lateral/axilar (L), mas sem a formação de um ramo (nessa situação apenas uma ou duas folhas são produzidas).

Os resultados de *shoot branching* foram essenciais para estabelecer o período de coleta dos ovários em pré-antese nos estágios P1 e P2, uma vez que se observa a primeira inflorescência após a transição do meristema vegetativo para o floral (Tabela 2). Já o atraso do florescimento pode ocorrer, em parte, pelo aumento de resposta à GA já detectado no mutante *La/+*, uma vez que GA reprime o florescimento em tomateiro (Yanai *et al.*, 2011). Curiosamente, a resposta à GA induz o florescimento em *arabidopsis*, como observado em planta transgênica que apresenta maior nível de expressão do *TCP4* (ortólogo de *LA*) e tem o florescimento adiantado (Sarvepalli e Nath, 2011).

4. 2. Identificação do alelo *LANCEOLATE*

O mutante *La/+* possui a mutação *LANCEOLATE* (acesso LA0335) introgridida no *background* MT e obtida no TGRC (*Tomato Genetics Resource Center*). A mutação em *LA* ocorre por substituição de uma base nitrogenada no sítio de reconhecimento do miR319a, no

entanto, essa modificação pode ocorrer em duas posições diferentes e gerar até cinco alelos distintos (Ori, N. *et al*, 2007). O sequenciamento da *ORF* do gene *LA* das plantas *La/+* introgrididas em MT revelou que o acesso LA0335 corresponde ao alelo *La-1* (Fig. 8).

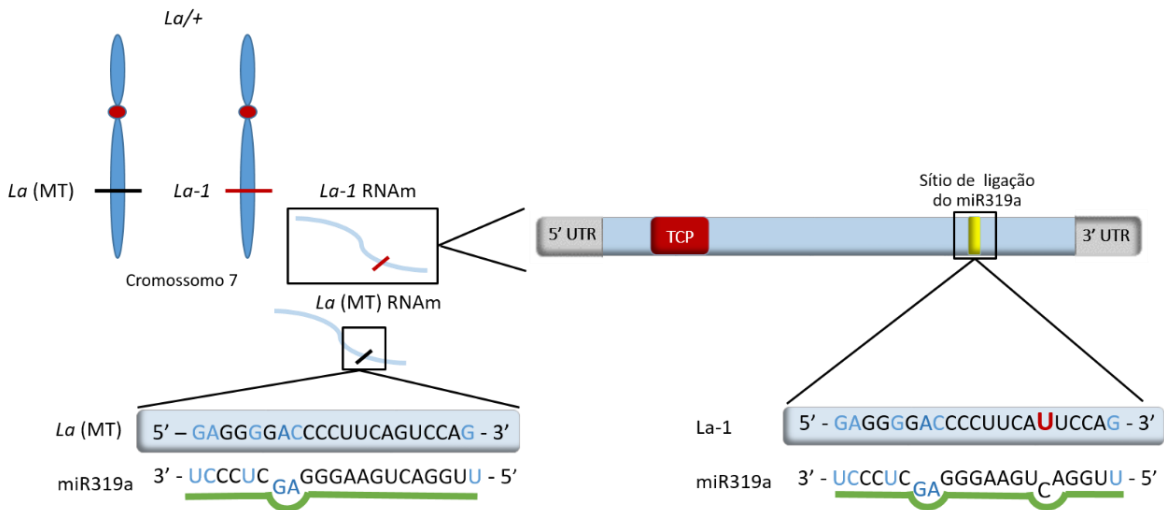


Figura 8. O alelo *La-1* do mutante *La/+*. O alelo *La-1* é caracterizado pela substituição de uma base nitrogenada guanina por uma timina no DNA (representada como uracila no *La-1* RNAm), especificamente no sítio de reconhecimento do miR319a. TCP: domínio da família de fatores de transcrição *TCP*. (-): alelo selvagem *La* do mutante *La/+* idêntico ao alelo *La* de MT. (-): alelo mutado *La-1* do mutante *La/+*; base nitrogenada azul: *mismatches*; base nitrogenada vermelha: substituição da guanina por uracila.

A alteração de uma citosina por uma uracila na região do RNAm correspondente ao sítio de ligação do miR319a do alelo *La-1* gera uma mutação não sinônima que leva à alteração de glutamina para histidina na antepenúltima posição da sequência de aminoácidos da proteína. Apesar dessa alteração, a proteína é funcional, uma vez que o mutante *La/+* introgridido em MT mantém os fenótipos característicos da mutação *La* de tomateiro com proteína funcional já descrita (Ori *et al*, 2007). Adicionalmente, a manutenção dos fenótipos de *La/+* indica que estes ocorrem em função da perda da regulação de *La-1* pelo miR319a em vez da alteração da atividade da proteína (Ori *et al*, 2007; Schommer *et al.*, 2012; Palatnick *et al.*, 2003; 2007; 2014).

Outra característica relevante da regulação dos *TCPs* pelo miR319a é a ocorrência de até seis *mismatches* na interação entre miRNA e alvo, o que é um número maior do que o esperado para outros RNAs de plantas (Megraw *et al.*, 2016). No entanto, o nível de energia

livre (ΔG -34 kcal/mol) é suficiente para garantir o pareamento entre o miRNA e seu RNAm-alvo, assim como os produtos da clivagem do RNAm dos *TCPs* podem ser identificados e isolados (Schommer *et al.*, 2012). O *mismatch* adicional gerado pela mutação de *La-1* deve dificultar ainda mais o pareamento entre o miR319a e *La-1*, de modo que este não seja mais efetivo e, conseqüentemente, não induza o silenciamento da expressão de *LA* no alelo mutado.

4. 3. Regulação do desenvolvimento do carpelo pela via *LA*/miR319a

4. 3. 1. O padrão de expressão espaço-temporal de *LA*

4. 3. 1. 1. Expressão ectópica de *LA* no meristema floral (MF) de *La/+*

Os ovários pré-antese no período de desenvolvimento P1 apresentam diferente padrão de expressão do gene *LA* no mutante *La/+* em relação ao MT, apresentando uma expressão ectópica no MF, bem como em estames e vasos condutores (Fig. 9).

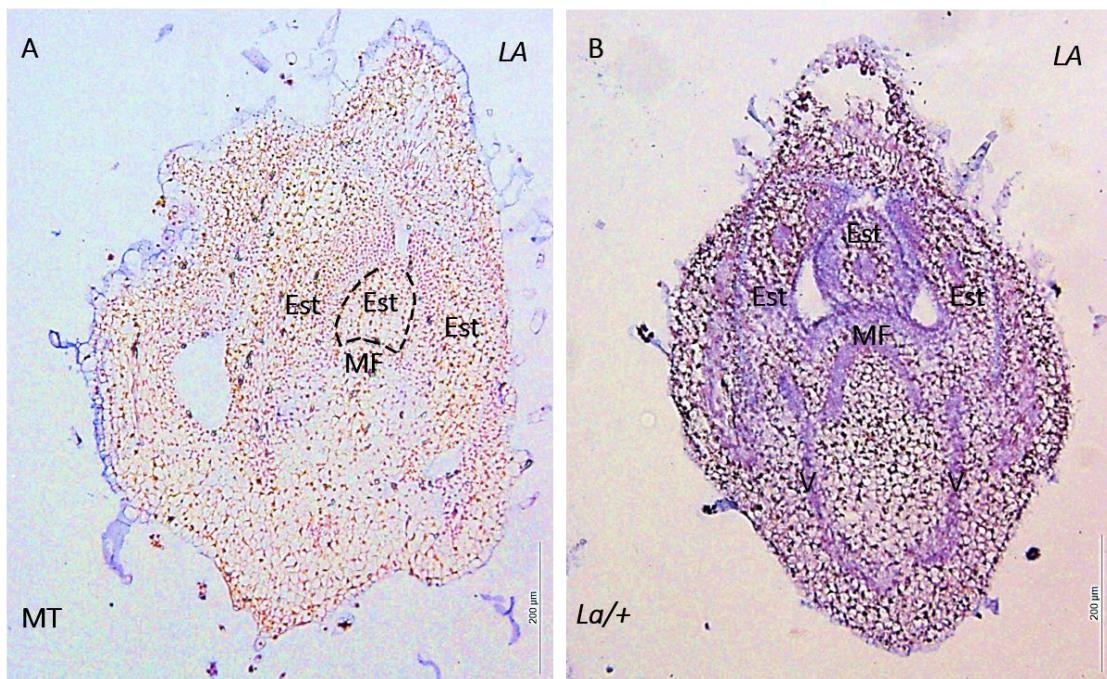


Figura 9. Expressão ectópica de *LA* no MF do mutante *La/+*. **A:** botão floral de MT com reduzida expressão de *LA* no MF. **B:** expressão ectópica de *LA* no MF e primórdios de estames do mutante *La/+*. **Período de desenvolvimento:** 2-5 dpi. Est: primórdio de estame; MF: meristema floral; V: vasos condutores. O experimento foi repetido duas vezes, apresentando o mesmo padrão de expressão.

Esse resultado demonstra que, uma vez não sendo mais regulado pelo miR319a, *LA* é expresso ectopicamente no MF do mutante, sendo alterado seu padrão de expressão espaço-temporal. Em vez de ser expresso apenas no momento de diferenciação celular (6-10 dpi), *LA* é expresso previamente no período marcado pela proliferação celular e delimitação dos eixos de crescimento do carpelo (2-5 dpi), apresentando uma antecipação do período de morfogênese, assim como ocorre nas folhas (Ori *et al.*, 2007).

Ainda não havia sido demonstrado que um diferente padrão de expressão espaço-temporal de *LA* pode determinar a alteração da morfologia dos verticilos florais, principalmente o carpelo e, dessa forma, influenciar significativamente a morfologia do fruto. No entanto, o comprometimento do desenvolvimento de pétalas e anteras pela desregulação do gene *TCP4* (homólogo de *LA*) já foi demonstrada em *A. thaliana* (Nag *et al.*, 2009).

4. 3. 1. 2. Expressão diferencial de *LA* no ovário e anteras maduros de *La/+*

Os ovários pré-antese no período de desenvolvimento P2 também apresentam um diferente padrão de expressão do gene *LA* no mutante em relação ao MT, apresentando uma distribuição diferencial nas estruturas carpelares: enquanto no MT o gene *LA* é expresso no estigma, estilete, óvulos e placenta (bem delimitada nas regiões de formação dos óvulos) do ovário maduro (Fig. 10A), em *La/+*, há uma expressão delimitada apenas ao ápice do estigma e na formação de uma incipiente placenta (Fig. 10B).

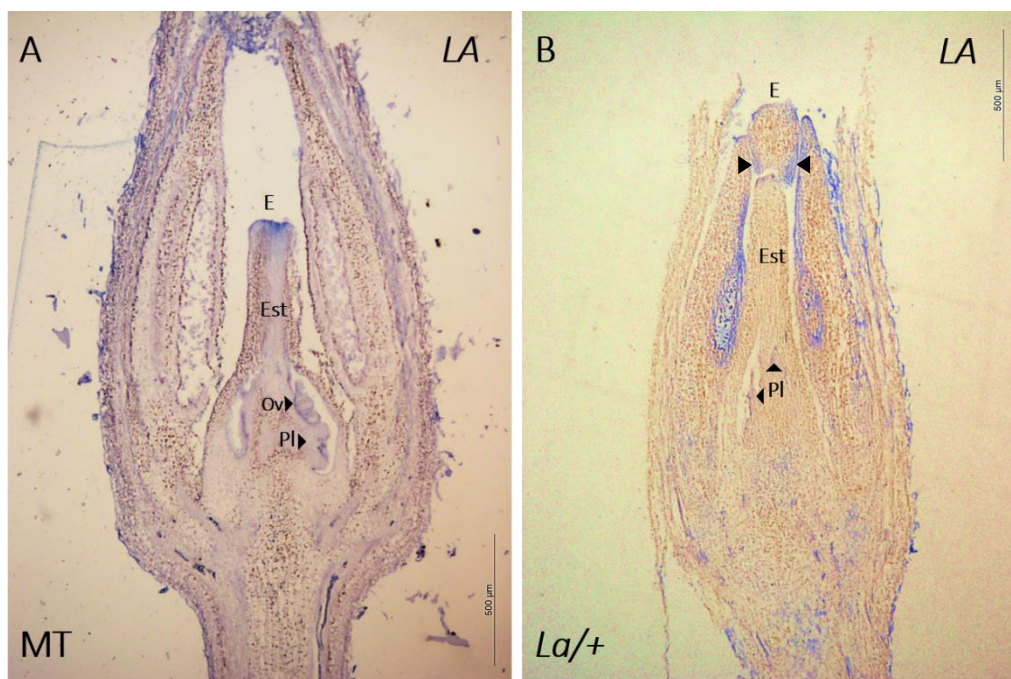


Figura 10. Expressão diferencial de *LA* em ovários maduros de *La/+*. **A:** *LA* expresso em estigma, porção superior do estilete, placenta e óvulos de ovário maduro de MT. **B:** expressão de *LA* nas margens laterais do estigma (setas) e placenta em formação (setas) de ovário maduro de *La/+*. **Período de desenvolvimento:** 6-10dpi. E: estigma; Est: estilete; Ov: óvulo; Pl: placenta. O experimento foi repetido duas vezes, apresentando o mesmo padrão de expressão.

O padrão de expressão ectópico de *LA* nas margens do estigma e a ausência de expressão no estilete do mutante *La/+* podem estar relacionados com o alongamento do eixo-proximal-distal de *La/+* e a consequente heteroestilia observada na flor (Fig. 3), já que se *LA* estivesse expresso no estilete de *La/+*, inibiria a proliferação celular e, conseqüentemente, seu alongamento (Schommer *et al.*, 2014). Da mesma forma, a expressão na placenta de *La/+* pode ser responsável pela diferenciação precoce da placenta e, conseqüentemente, de sua incipiente formação no fruto (Fig. 4C), uma vez que ainda não se observa no carpelo de *La/+* a formação dos óvulos (Fig. 10B), enquanto que, em MT, os óvulos já estão formados e se diferenciando (Fig. 10A). Curiosamente, as anteras também apresentam uma detecção de sinal mais expressiva em botões florais de *La/+*, o que pode estar associado com baixa fertilidade do mutante, no que diz respeito à capacidade de fertilização do pólen, assim como ocorre em mutante perda de função para o gene *MIR319a* em *A. thaliana*. (Nag *et al.*, 2009).

A não formação de septo e placenta pode estar relacionada também à detecção de uma polarização basal de auxina nos ovários em período P2 do cruzamento *La/+ X pDR5::GUS* (ver tópico abaixo). A alteração no padrão de distribuição da auxina no carpelo pode interferir no desenvolvimento do septo e da placenta, uma vez que, segundo o modelo aceito de fluxo de auxina na morfogênese do gineceu de arábido, o gradiente de auxina apical-basal ao longo do eixo proximal-distal de crescimento seria necessário para o desenvolvimento normal do lóculo e suas estruturas (Nemhauser *et al.*, 2000).

Adicionalmente, a formação de placenta rudimentar pode estar associada com alterações no padrão de expressão do gene *PPC2* (*phosphoenolpyruvate carboxylase 2*), o qual é expresso no septo, placenta e mesocarpo do fruto em crescimento, regulando o acúmulo de açúcares, especificamente no período de expansão celular até o amadurecimento (Guillet *et al.*, 2012). A atividade do promotor do gene *PPC2* em MT já foi caracterizada (Fernandez *et al.*, 2009), sendo uma ferramenta em potencial para melhor compreensão do desenvolvimento das estruturas do fruto no mutante *La/+*.

4. 3. 2. Aumento dos níveis de expressão de LA durante o desenvolvimento do carpelo de tomateiro

O significativo aumento de expressão de *LA* no mutante *La/+* se mantém prevalente em relação ao MT durante todo o período de desenvolvimento do carpelo (P1-P2). O período inicial P1 compreende os três primeiros estágios de desenvolvimento do carpelo, fase marcada pelo crescimento dos primórdios carpelares. A partir da determinação do MF, os primórdios do carpelo emergem e crescem até sua fusão em um carpelo prematuro. Nessa fase, a expressão de *LA* nos botões florais do mutante *La/+* dobra em comparação com o MT. Na fase posterior do desenvolvimento do carpelo (P2), quando este já está maduro, a expressão de *LA* é quatro vezes maior nas plantas *La/+*, quando comparado ao MT (Fig.11).

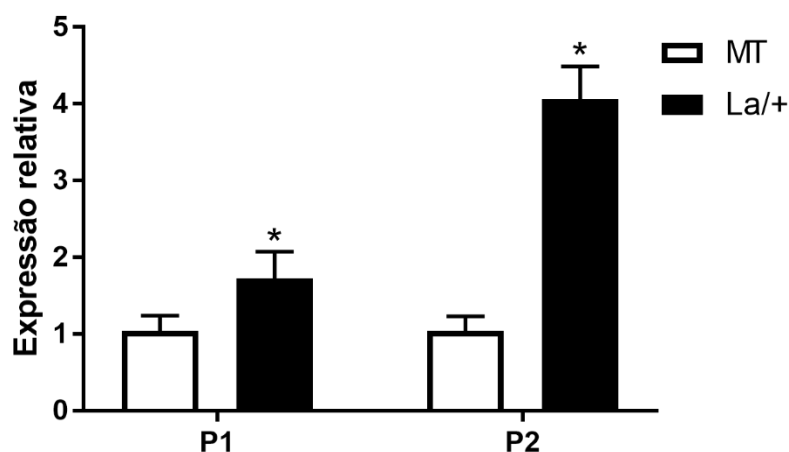


Figura 11. Aumento da expressão de *LA* na morfogênese de ovários de *La/+*. A: A expressão de *LA* aumenta durante a formação dos primórdios carpelares (P1) e mantém um aumento progressivo até a maturação do carpelo (P2) do mutante *La/+*. **P1:** 2-5 dpi; **P2:** 6-10 dpi. Valores apresentados como média ± erro padrão. Os valores de MT foram normalizados para 1,0. *: valores considerados significativos para $p < 0,05$.

O significativo aumento da expressão de *LA* durante a morfogênese do carpelo do mutante *La/+* indica que não somente a antecipação de sua expressão no MF (Fig. 9), mas também a desregulação dos seus níveis de expressão, determinam as alterações fenotípicas observadas em carpelos e flores de plantas *La/+*. Nessas plantas, *LA* deixa de ser silenciado pelo miR319a, o que afeta os órgãos vegetativos, como já foi demonstrado no desenvolvimento das folhas (Ori *et al.*, 2007). No entanto, esse fenômeno ainda não havia sido demonstrado durante o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos, principalmente na morfogênese dos verticilos florais. Uma vez que já é bem aceita a hipótese de que os verticilos florais são “folhas especializadas”, esse aumento expressivo de *LA* durante o desenvolvimento do carpelo evidencia uma regulação similar à morfogênese foliar: maiores níveis de expressão na fase inicial do desenvolvimento do carpelo levam a uma redução do período de proliferação celular e uma antecipação da diferenciação dos tecidos do carpelo. Ademais, é a primeira vez que se demonstra o aumento de expressão de *LA* nas plantas *LA/+* associado com a detecção antecipada dessa expressão, o que sugere que não só o aumento, mas também a antecipação da expressão de *LA*, estão associados com o fenótipo constricto-alongado dos carpelos e frutos maduros de tomateiro.

4. 3. 3. Expressão do miR319a em ovários de tomateiro

4. 3. 3. 1. Expressão espaço-temporal do miR319a em ovário e anteras maduros

O padrão de expressão do miR319a em MT coincide parcialmente com o de *LA*, sendo expresso nos mesmos órgãos florais, uma vez que regula sua expressão (Fig. 10). No período P2, o miR319a é expresso de forma difusa no estigma e no estilete de plantas MT (Fig. 12A), diferentemente da expressão mais localizada do *LA* no estigma (Fig. 12A). Similarmente, a expressão de *LA* parece ser mais localizada no integumento do óvulo (região periférica) (Fig. 10A), enquanto o miR319a é expresso de forma mais difusa nos óvulos (Fig. 12A). Tal padrão de expressão sugere uma restrição espacial de *LA* pelo miR319a nos verticilos florais de tomateiro. O mutante *La/+* não apresenta, em relação a MT, diferenças significativas na localização de expressão do miR319a, já que a janela de desenvolvimento morfogênético do carpelo já passou (P1). No entanto, esse resultado confirma a co-localização de *LA* e do miR319a, evidenciando a manutenção da via de regulação estabelecida por eles na regulação do desenvolvimento do carpelo.

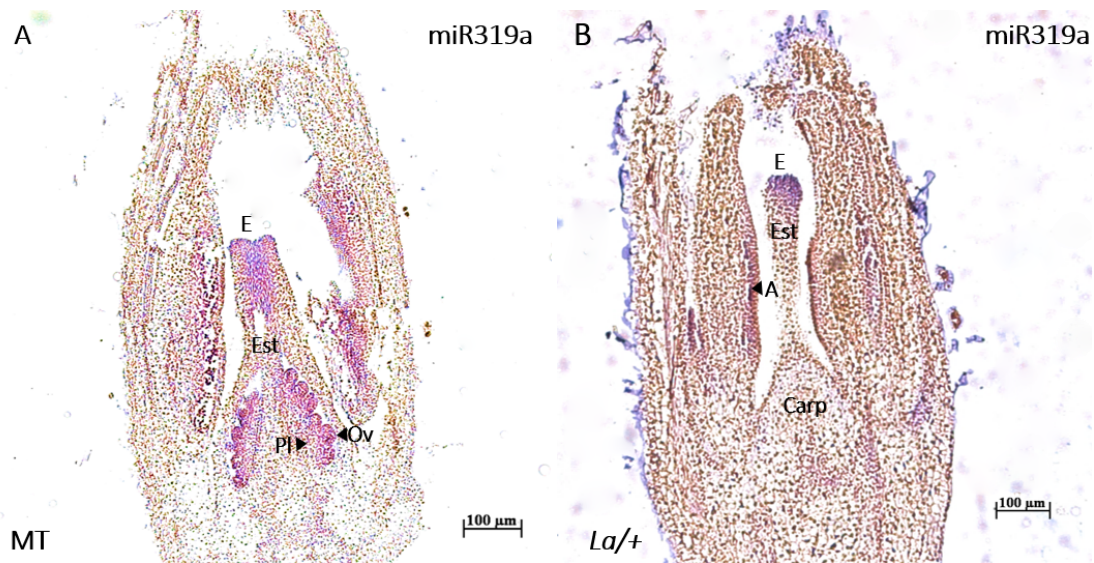


Figura 12. Co-localização do miR319a e *LA* em ovários maduros. De modo geral, o miR319a é expresso no carpelo nas mesmas regiões que *LA*. **A:** miR319a expresso em estigma, porção superior do estilete, placenta e óvulos (setas) de ovário MT maduro. **B:** expressão do miR319a delimitada apenas ao ápice do estigma e óvulo em formação de ovário maduro de *La/+* (setas). **Período de desenvolvimento: 6-10 dpi.** A: antera; Carp: carpelo; E: estigma; Est: estilete; Ov: óvulo; Pl: placenta.

4. 3. 3. 2. Regulação temporal de *LA* pelo miR319a

Os dados de RT-qPCR indicam que o miRNA319a é cerca de 11 vezes menos expresso no mutante *La/+* em botões florais no estágio P1, quando comparado as plantas MT (Fig. 13). Entretanto, os níveis de transcritos do miR319a aumentam cerca de três vezes no carpelo maduro de *La/+* (Fig. 13). Comparativamente, os níveis de expressão do miR319a acompanham inversamente os níveis de expressão de *LA* no período P1 (Fig. 11).

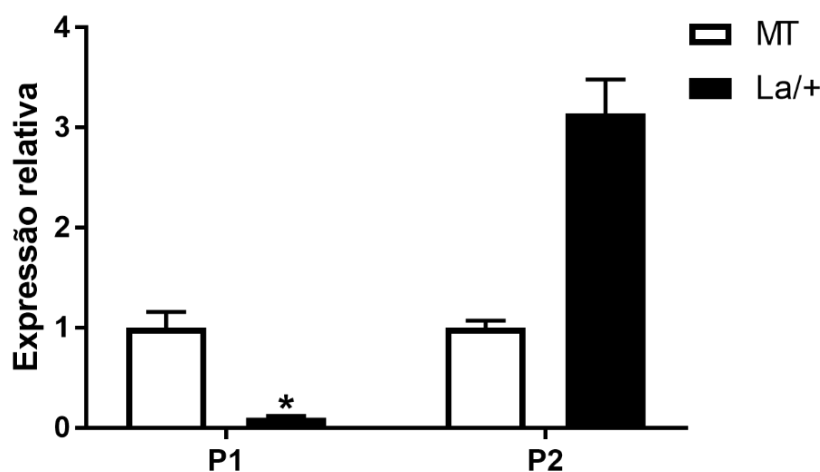


Figura 13. O padrão de expressão do miR319a. Os níveis de transcritos do miR319a são reduzidos em P1, momento em que *LA* é superexpresso. **P1:** período 1; **P2:** período 2. Valores apresentados como média \pm erro padrão. Os valores de MT foram normalizados para 1,0. *: valores considerados significativos para $p < 0,05$.

A redução de transcritos do miR319a no mutante *La/+* durante P1 (Fig. 11) não é necessariamente esperada, como propõe Naomi e colaboradores (Ori *et al.*, 2007). Uma vez que *LA* é mais expresso no mutante *La/+* pelo não pareamento do miR319a em seu RNAm mutado, isso não deveria afetar os níveis de expressão do próprio miR319a em *La/+* nem em MT. No entanto, os baixos níveis de expressão do miR319a em *La/+* no P1 podem indicar um mecanismo de retroalimentação negativa em que o aumento de expressão de *LA* leva à diminuição da expressão do miR319a como uma resposta de compensação. Esse tipo de resposta celular pode ocorrer em função de uma provável regulação do gene *MIR319a* pelo próprio *LA*. Tal regulação pode ser direta ou indireta por ativação de outros genes que induzam/reprimam o gene *MIR319a*, ou ainda por interações proteína-proteína que regulam

os níveis de proteína de LA na célula (Rubio-Somoza *et al.*, 2014). Ainda são necessários, portanto, mais estudos para identificar os demais genes e miRNAs que interagem com essa via, bem como seus mecanismos de ação para uma caracterização mais precisa dos fatores que determinam o balanço entre os níveis de expressão de LA e do miR319a.

4. 4. A potencial regulação dos genes *SUN* e *OVATE* pela via miR319a/LA

A análise da expressão do gene *SUN* durante o desenvolvimento do carpelo do mutante *La/+* e MT indicou uma tendência de superexpressão que se inicia mais proeminente em P1, sem modificações significativas em P2 (Fig. 14).

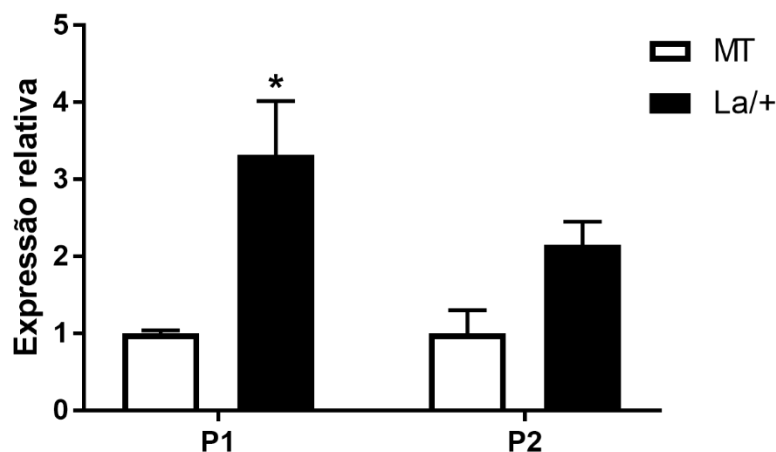


Figura 14. A superexpressão de *SUN* durante o desenvolvimento inicial do fruto constricto-alongado do mutante *La/+*. O aumento de expressão de *SUN* contribui para o alongamento do carpelo desde os primórdios carpelares (P1). **P1:** período 1; **P2:** período 2. Valores apresentados como média \pm erro padrão. Os valores de MT foram normalizados para 1,0. *: valores considerados significativos para $p < 0,05$.

O aumento de expressão de *SUN* no P1 de *La/+* pode indicar que esse gene induza o alongamento do carpelo e seja responsável, em parte, pelo fenótipo do fruto observado no mutante (Fig. 4). Esse resultado sugere, ainda, uma provável interação entre *SUN* e *LA*, já que o aumento da expressão de *LA* está associada com o padrão de crescimento constricto-alongado do fruto (Fig. 5), e o aumento de expressão do *SUN* leva ao alongamento do fruto por um

maior número de divisões celulares no plano longitudinal e um menor número no plano transversal (Wang *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2011). As vias moleculares que devem interagir para a possível sinergia entre a via miR319a/LA e *SUN* na determinação do fenótipo de fruto alongado ainda não foram exploradas, mas provavelmente, o aumento de expressão de *LA* e *SUN* (detectado nos dois períodos avaliados) induzem o alongamento do fruto.

No sentido inverso, os níveis de expressão do gene *OVATE* estão reduzidos no período P1 no mutante *La/+*, quando comparado ao MT (Fig. 15).

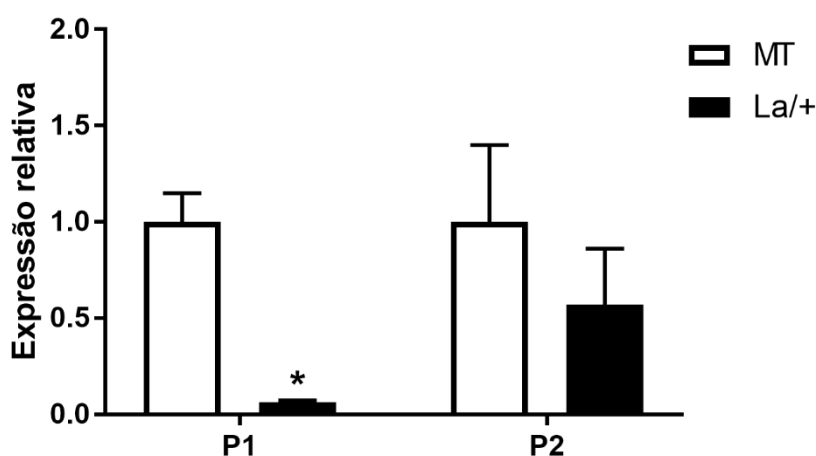


Figura 15. Redução da expressão de *OVATE* durante o desenvolvimento inicial do fruto constrito-alongado no mutante *La/+*. O gene *OVATE* é subexpresso durante o desenvolvimento inicial do carpelo do mutante *La/+*. **P1:** período 1; **P2:** período 2. Valores apresentados como média \pm erro padrão. Os valores de MT foram normalizados para 1,0. *: valores considerados significativos para $p < 0,05$.

O gene *OVATE* é um regulador negativo do crescimento e contribui para o controle do tamanho dos verticilos florais (Liu *et al.*, 2002), sendo que sua superexpressão leva a fenótipos de tamanho reduzido nos órgãos vegetativos e florais de *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 2007), bem como em tabaco (Hackbusch *et al.*, 2005). Contrariamente, observa-se no mutante perda de função *ovate* a formação de frutos de tomateiro periformes e alongados longitudinalmente (van der Knaap *et al.*, 2014). Dessa forma, os baixos níveis de expressão

do gene *OVATE* em P1 parece contribuir para o fenótipo constricto-alongado do fruto do mutante *La/+*. Provavelmente, a expressão do gene *OVATE* no estágio 2-5 dpi seria necessária para reduzir a proliferação celular excessiva no sentido apical-basal de crescimento do carpelo, o qual ocorre no mutante *La/+*, o que manteria o formato isométrico do fruto em MT, em vez do constricto-alongado no mutante *La/+* (Fig. 5).

4. 5. O aumento de resposta à auxina do mutante *La/+* pode determinar o padrão de crescimento constricto-alongado do fruto

4. 5. 1. O padrão espacial de resposta à auxina nos botões florais de *La/+*

A resposta de auxina nos botões florais pré-antese em P1 de plantas *La/+ pDR5::GUS* demonstrou alteração de resposta na região medial e nos limites superior e inferior que demarcam a diferenciação entre as sépalas (Fig. 16C), enquanto o controle positivo *pDR5::GUS* apresentou um padrão restrito e contínuo nas áreas que delimitam as sépalas (Fig. 16B).

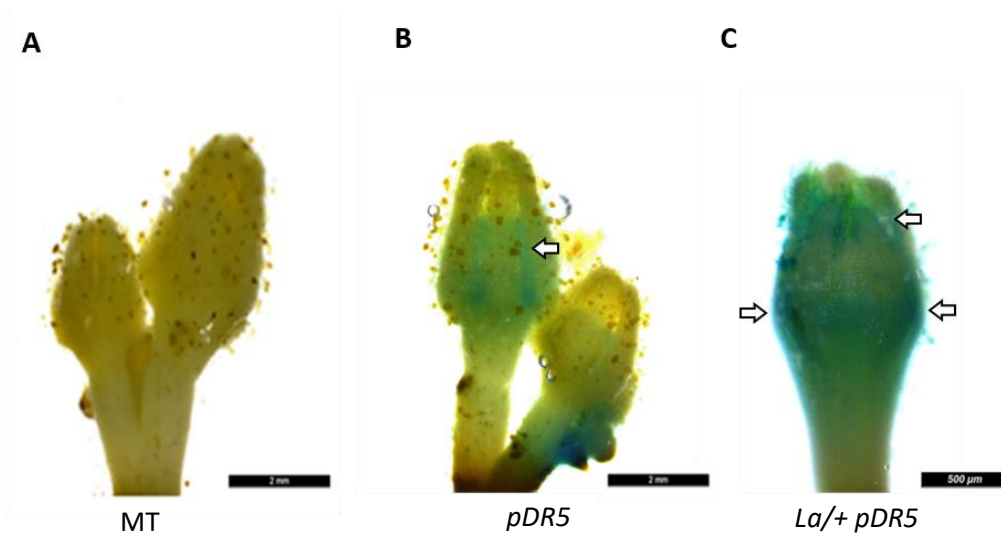


Figura 16. Localização diferencial de atividade de auxina em botões florais de *La/+ pDR5::GUS*. A: botão floral de planta MT não transgênica (controle negativo). **B:** botão floral de planta MT contendo o transgene *pDR5::GUS* (controle positivo). Seta indica sinal de resposta à auxina na região de delimitação das sépalas **C:** botão floral de planta da geração F1 do cruzamento *La/+ X pDR5::GUS*. Setas indicam sinal de resposta à auxina na região medial do botão floral e ápice das sépalas em formação. **Estágio de desenvolvimento:** P1.

Essa diferença de resposta é, no entanto, inconclusiva, pois seria necessário a remoção dos verticilos florais que envolvem o carpelo para detectar o sinal especificamente nos primórdios carpelares, o que é dificultado pelo tamanho reduzido dos botões florais. Entretanto, cortes histológicos de tecido de botões florais (estágio P1) fixados em resina dos genótipos *pDR5::GUS* e *La/+ pDR5::GUS* estão sendo obtidos para melhor visualização da distribuição de auxina no início de desenvolvimento do carpelo. Não obstante, a diferença de sinal observada externamente nos botões florais parece indicar um acúmulo de auxina na região basal que é similar ao detectado nos ovários em P2 do cruzamento *La/+ X pDR5::GUS* (Fig. 17). Esse padrão de resposta à auxina pode indicar também uma alteração na distribuição de auxina no eixo proximal-distal que pode contribuir para o fenótipo constricto-alongado dos ovários e frutos de plantas *La/+*.

4. 5. 2. A polarização de resposta à auxina nos carpelos maduros de *La/+*

A análise de ovários pré-antese em P2 das plantas *La/+ pDR5::GUS* demonstra uma localização diferencial da atividade de auxina nessas plantas, apresentando uma polarização basal, enquanto os ovários de *pDR5::GUS* apresentam uma detecção na porção medial do estilete (Fig. 17).

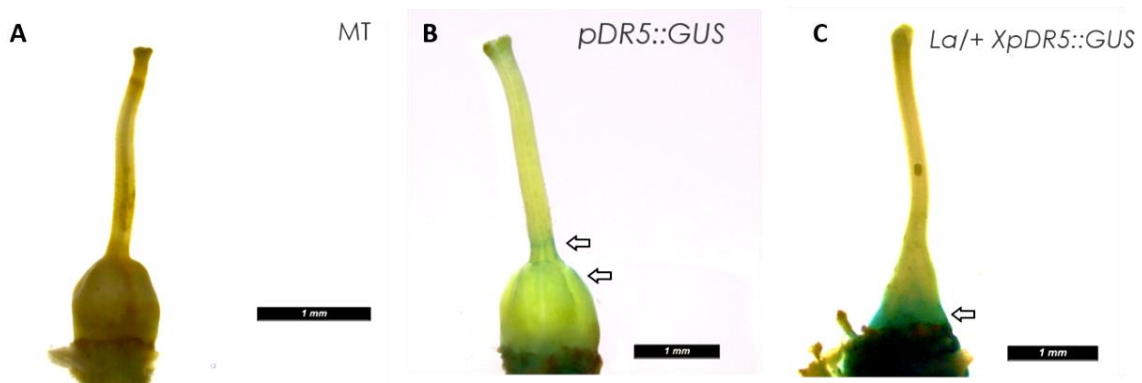


Figura 17. Polarização basal de resposta à auxina em ovários maduros de *La/+ pDR5::GUS*. A: carpelo de planta MT não transgênica (controle negativo). **B:** carpelo de MT transformado com vetor contendo *pDR5::GUS* (controle positivo). Setas indicam sinal de resposta à auxina no ápice do ovário e base do estilete **C:** botões florais da geração F1 do cruzamento *La/+ X pDR5::GUS*. Seta indica sinal de resposta à auxina na região basal do carpelo. **A-C:** ovários de flores emasculadas. **Período de desenvolvimento:** P2

A polarização basal de resposta à auxina observada no carpelo de *La/+* remete à formação de um gradiente de auxina que regula o desenvolvimento do gineceu. Essa ideia foi apresentada em *arabidopsis* a partir da proposição de um modelo em que o padrão de desenvolvimento do gineceu é determinado pelo fluxo de auxina apical-basal gerando um gradiente de concentração decrescente no eixo de crescimento proximal-distal (Nemhauser *et al.*, 2000). O modelo sugere que um gradiente de auxina apical-basal é necessário para o estabelecimento, ainda no primórdio carpelar, das regiões que formarão o ovário, o estilete e o estigma, bem como a manutenção do padrão de delimitação entre eles. Entretanto, tal modelo foi baseado na aplicação de ácido naftilftalâmico (NPA), um inibidor de transporte de auxina, para demonstrar o efeito do acúmulo de auxina no gineceu do mutante *ettin*, o qual contém mutação no gene *ARF3*, membro da família *ARF* (*Auxin Responsive Factor*). O gineceu de plantas *ettin* apresenta estigma e estilete pouco desenvolvidos (Nemhauser *et al.*, 2000).

Novos estudos têm proposto, no entanto, a revisão desse modelo (Robert *et al.*, 2015; Liu e Franks, 2015) visando uma abordagem mais abrangente e detalhada da distribuição de auxina durante o desenvolvimento do gineceu de *arabidopsis*. Análises da localização de auxina no estágio inicial do gineceu indicam sinal apenas no ápice, sem detecção de um gradiente apical-basal (Girin *et al.*, 2011), assim como, uma detecção apical inicial, seguida de uma expressão meso-lateral em vasos condutores (Larsson *et al.*, 2013). De fato, a distribuição de auxina durante o desenvolvimento do gineceu parece não se caracterizar somente por um gradiente de concentração longitudinal, mas por um transporte regulado nos diferentes eixos de crescimento, inclusive na determinação do estabelecimento radial do gineceu (Østergaard *et al.*, 2014).

A ausência de detecção de um gradiente de concentração de resposta à auxina no carpelo de *pDR5::GUS* (Fig. 17B) e a polarização basal de resposta à auxina do carpelo do mutante *La/+* (Fig. 17C) se contrapõem, portanto, ao modelo proposto por Nemhauser e colaboradores (2000) e sugerem que possa haver, na verdade, uma inversão do gradiente de auxina no eixo de crescimento proximal-distal. Esse resultado pode estar relacionado com o sentido de transporte da auxina estabelecido pelos transportadores de membrana de auxina do tipo *PIN*.

A análise do transporte de auxina via *PIN* tem sido amplamente utilizada para compreensão da organogênese de estruturas vegetativas e reprodutivas em plantas (Benková *et al.*, 2003; Liu e Hawkins *et al.*, 2014; Østergaard *et al.*, 2014; Robert *et al.*, 2015). Recentes

análises em arábidoopsis mostraram o acúmulo deste transportador polar de auxina no ápice das células de replum (tecido conectivo da válvula), o que indica transporte de auxina no sentido basal-apical (Grieneisen *et al.*, 2013). Isso poderia explicar a polarização basal de auxina no carpelo de plantas *La/+ pDR5::GUS* (Fig. 17C). Em tomateiro, já foi demonstrado que a aplicação de NPA induz a formação de folhas simples (fenótipo característico de *La/+*) em plantas selvagens regeneradas *in vitro* (Avasarala *et al.*, 1996). A relação da inibição do transporte de auxina com a expressão precoce de *LA* observada na morfogênese foliar do mutante *La/+* (Ori *et al.*, 2007) permanece, contudo, desconhecida, o que faz dos transportadores *PIN*, candidatos em potencial para a caracterização do transporte de auxina nos ovários do mutante *La/+* e para a elucidação da polarização basal de auxina no carpelo de plantas *La/+*.

Outra observação interessante é a detecção do sinal no ápice do ovário e base do estilete, bem como da parede do ovário na região meso-lateral do carpelo de *pDR5::GUS* (Fig. 17B) e ausência dessa detecção em plantas *La/+ pDR5::GUS* (Fig. 17C). Essa resposta diferenciada à auxina pode ser devida à redução de sensibilidade à auxina no eixo meso-lateral, uma vez que, ao se aplicar solução de NPA no gineceu de arábidoopsis, há crescimento lateral do estilete (Nole-Wilson *et al.*, 2010; Larsson *et al.*, 2013).

Os diferentes padrões de resposta à auxina detectados nos carpelos de *La/+ pDR5::GUS* no período P2 ainda são, contudo, inconclusivos para caracterizar o padrão de resposta à auxina do mutante *La/+* durante todo o período de desenvolvimento do carpelo (2-10 dpi), já que os resultados de P1 impossibilitam a visualização do primórdio carpelar nesse período. No entanto, a detecção da atividade de auxina na porção basal do ovário de *La/+* reforça a necessidade de revisão do modelo proposto por Nemhauser e colaboradores (2000).

4. 5. 3. O acúmulo e a maior responsividade à auxina no carpelo de plantas *La/+*

O gene *ToFZY1* apresenta padrão de expressão similar no estágio P1 nas plantas MT e *La/+* e aumenta significativamente em P2 nos carpelos de plantas *La/+*, a ponto de ser quatro vezes maior que em plantas MT (Fig. 18).

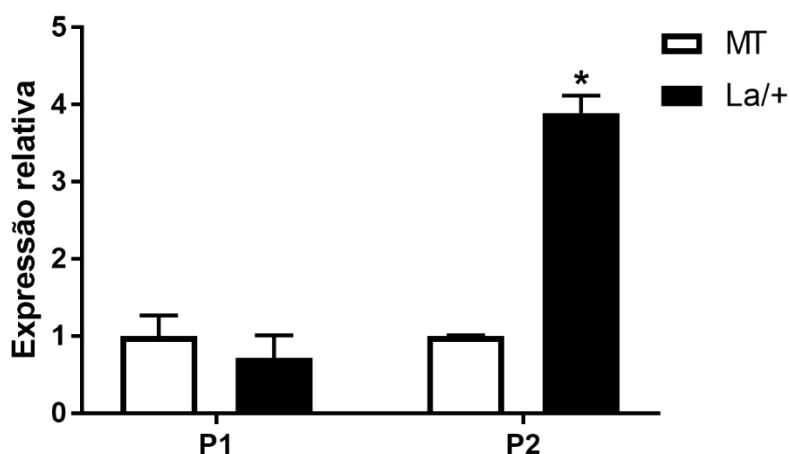


Figura 18. Aumento de expressão de *ToFZY1* no período de maturação do carpelo do mutante *La/+*. A expressão de *ToFZY1* aumenta quatro vezes em carpelos no estágio P2 de plantas *La/+*, período em que ocorre a maturação do carpelo. **P1:** período 1; **P2:** período 2. Valores apresentados como média \pm erro padrão. Os valores de MT foram normalizados para 1,0 *: valores considerados significativos para $p < 0,05$.

O gene *ToFZY1* regula o desenvolvimento vegetativo e floral (Chandler *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2006), atuando na via de biossíntese de auxina, mas especificamente na etapa final de conversão do ácido indol-3-pirúvico em ácido indol-3-acético (Zhao *et al.*, 2001). O gene *ToFZY1* é homólogo ao gene *YUCCA* de arabisopsis, o qual faz parte de uma família com mais 10 membros, sendo que em tomateiro, foram identificados recentemente 6 homólogos da mesma família (*ToFZY*), dos quais destacam-se os *ToFZY1*, *ToFZY4* e *ToFZY5* com padrão de expressão detectado no período P1 do desenvolvimento floral (Expósito-Rodríguez *et al.*, 2011). O nível de expressão do gene *ToFZY1* aumentou no mutante *La/+* no período P2, quando comparado ao MT (Fig. 18), o que pode estar relacionado com o aumento de biossíntese de auxina na base do carpelo de plantas *La/+ pDR5::GUS* (Fig. 17C) e a consequente polarização do hormônio nessa região. Ademais, o aumento de biossíntese leva à um aumento de resposta proporcional no carpelo maduro do mutante *La/+*, como é observado no aumento significativo de expressão do gene *ARF3* em P2 (Fig. 19).

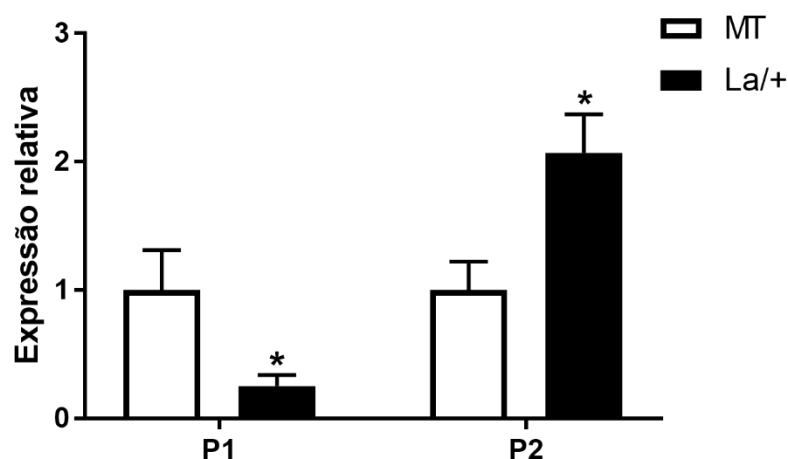


Figura 19. Expressão diferencial do gene *ARF3* durante o desenvolvimento do carpelo do mutante *La/+*. O gene *ARF3* é subexpresso no início do desenvolvimento do carpelo e passa a ser mais expresso durante a maturação do carpelo. **P1:** período 1; **P2:** período 2. Valores apresentados como média \pm erro padrão. Os valores de MT foram normalizados para 1,0. *: valores considerados significativos para $p < 0,05$.

O gene *ARF3* é um membro da família de fatores responsivos à auxina (*ARFs*) composta por 23 membros que foram identificados em arábida (Tiwari, S. *et al.*, 2003). Os *ARFs* são fatores de transcrição que contêm uma sequência específica (TGTCTC) denominada elemento de resposta à auxina e responsável por ativar promotores de genes que respondem primariamente ao aumento dos níveis desse hormônio (Guilfoyle e Hagen, 2007). O *ARF3* é também conhecido como *ETTIN* em função dos estudos com o mutante *ettin* de arábida que apresenta alterações dos verticilos florais como aumento do número de sépalas e pétalas e diminuição do número de estames (Pekker *et al.*, 2005). Particularmente, esse mutante apresenta alterações durante o desenvolvimento do gineceu que abrangem desde o alongamento precoce do meristema floral e diferenciação precoce do estigma até a má formação da valva e alongamento da base do ovário (Sessions, 1997; Nemhauser *et al.*, 2000). Essas alterações fenotípicas são similares à progressão do fenótipo constricto-alongado observado durante o desenvolvimento do carpelo do mutante *La/+* (Fig. 7). Além disso, os níveis de expressão do *ARF3* no mutante *La/+* indicam uma redução significativa no período P1 que pode, assim como em *ettin*, levar à diferenciação precoce de células do MF que dão origem aos primórdios carpelares e desencadear o fenótipo constricto-alongado do carpelo.

Posteriormente, a expressão do *ARF3* aumenta em P2, sendo o dobro em relação à MT. Isso indica aumento de resposta à auxina e acompanha o aumento da biossíntese desse hormônio no mesmo período (Fig. 18). Interessantemente, foi demonstrado que o *knockdown* do miR160 leva não só à desrepressão de genes *ARFs*, mas também a um aumento significativo de expressão desses genes, o que resulta em alongamento do carpelo e formação de frutos piriformes, similares ao do mutante *ovate* (Damodharan *et al.*, 2016). Adicionalmente, a diminuição da expressão do miR160 resulta também em desenvolvimento de folhas similares ao do mutante *La/+* (Damodharan *et al.*, 2016). De fato, o alongamento do carpelo e dos frutos de *La/+* estão relacionados com o aumento de resposta à auxina evidenciado pelo aumento de expressão do *ToFZY1* e do *ARF3* (Fig. 18; Fig. 19) no período P2.

A auxina age, ainda, de maneira antagônica em relação à citocinina no meristema apical, o que deve ocorrer também no MF: a auxina promove diferenciação celular, enquanto a citocinina induz divisão celular (Zúñiga-Mayo *et al.*, 2014). A aparente contradição entre os efeitos da resposta à auxina induzidos pelo *ARF3* nos períodos P1 e P2 pode ocorrer, entretanto, em função de uma resposta fisiológica específica em cada estágio: no primeiro, a diminuição de resposta à auxina pode induzir uma diferenciação antecipada dos primórdios carpelares, enquanto no segundo, o aumento de resposta à auxina pode ocorrer como uma resposta indireta de uma provável realocação das proteínas transportadoras *PIN* no carpelo maduro, o que pode ser inferido da polarização de auxina observada na base do carpelo (Fig. 17C). Isso pode resultar num crescimento diferencial da porção supra-medial do ovário e explicaria o alongamento e a constrição medial do carpelo (Fig. 6D).

4. 6. Modelo proposto para o desenvolvimento do fruto de tomateiro

As vias genéticas e hormonais que regulam o desenvolvimento do fruto em *Solanum Lycopersicum* são amplamente estudadas (Giovannoni, 2001; Ruan *et al.*, 2012; van der Knaap *et al.*, 2014), seja no período mais conhecido relativo à pós-fertilização dos óvulos ao crescimento e amadurecimento do fruto (Terao *et al.*, 2013) ou no período pré-antese da flor que caracteriza todo o desenvolvimento do carpelo que dará origem ao fruto (Xiao *et al.*, 2009). Entretanto, nenhum modelo de desenvolvimento do fruto que contemple a interação entre os genes e fitohormônios reguladores deste processo foi proposto.

A relevância de cada um dos dados apresentados, bem como a inter-relação entre eles evidencia um possível panorama durante todo o desenvolvimento do carpelo (2-10 dpi) em que *LA* não apenas regule o desenvolvimento do carpelo como em folha, mas também, que interaja com *SUN* e *OVATE* para a indução do alongamento dos frutos e, ainda, promova o aumento de biossíntese e resposta à auxina através da indução da expressão do *ToFZY1* e *ARF3*, respectivamente, no estágio P2 de desenvolvimento do carpelo do mutante *La/+*.

Considerando tal cenário (Fig. 20), especificamente no período inicial P1, o MF, por influência do aumento de expressão de *LA* (Fig. 11), apresenta uma redução do tempo de divisões celulares que seria necessário para o estabelecimento do número ideal de células a se diferenciariam em cada tecido. Da mesma forma, pela indução da superexpressão de *SUN* em P1 (Fig. 14), o MF se diferencia prematuramente e inicia-se o alongamento dos primórdios carpelares. Ao mesmo tempo, a subexpressão do *ARF3* indica uma redução de resposta à auxina, que nesse período, é essencial para a demarcação dos limites de crescimento entre os grupos celulares que vão se diferenciar nos tecidos do carpelo. No período seguinte (P2), o carpelo cresce, mas se diferencia antecipadamente, uma vez que *LA* e *SUN* são ainda mais expressos (Fig. 11; Fig. 14). Simultaneamente, o aumento de biossíntese de auxina gerado pela superexpressão de *ToFZY1* (Fig. 18) gera um acúmulo desse hormônio e resulta numa maior resposta à auxina induzida pela superexpressão de *ARF3* (Fig. 19). A alteração de resposta aos níveis hormonais pode interferir no fluxo de auxina via realocação de proteínas transportadoras *PIN* e promover o direcionamento ou retenção de auxina na base do ovário (Fig. 17). A polarização basal de auxina no carpelo e a superexpressão de *LA* e *SUN* induzem a diferenciação precoce da placenta e dos óvulos e, ainda, promovem um padrão de crescimento diferencial da parede do carpelo: enquanto a base para de crescer e se diferencia antecipadamente, o ápice, o estilete e o estigma continuam crescendo (Fig. 7). Esse padrão de crescimento diferencial resulta, finalmente, na constrição medial e no alongamento do carpelo (Fig. 6), que ao ser fertilizado, desenvolve-se em um fruto constricto-alongado (Fig. 5).

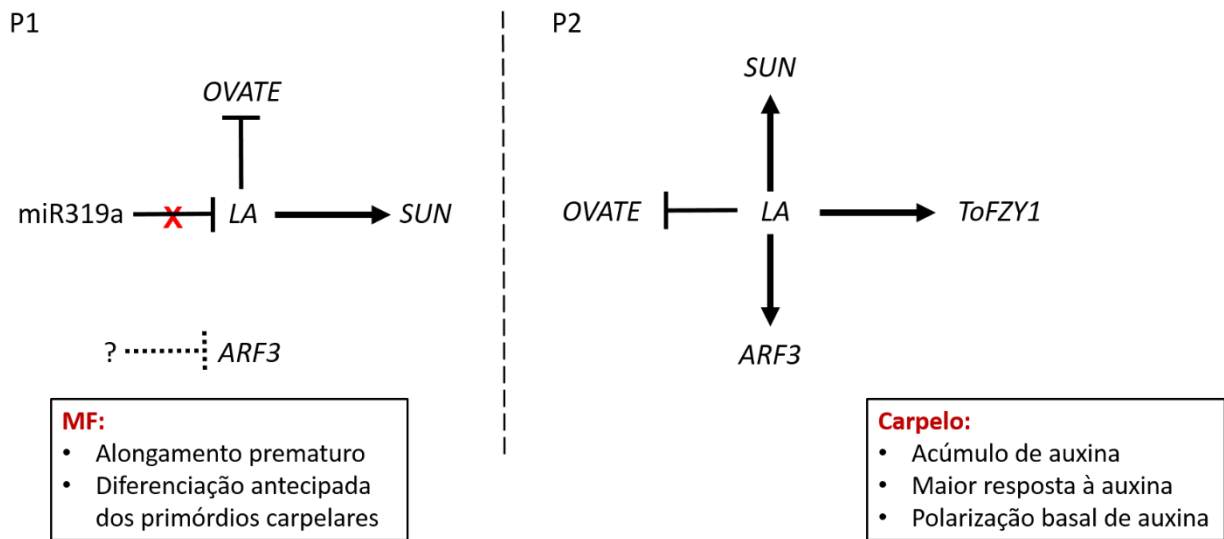


Figura 20. Modelo hipotético das vias regulatórias do desenvolvimento do carpelo do mutante *La*/+. **P1:** subexpressão de *OVATE* e superexpressão de *LA* e *SUN* promovem crescimento prematuro dos primórdios carpelares, enquanto a expressão de *ARF3* é inibida indiretamente por via desconhecida. X: desrepressão de *LA* pelo miR319a. **P2:** subexpressão de *OVATE* e superexpressão de *LA*, *SUN*, *ToFZY1* e *ARF3* promovem fenótipo constricto-longado do carpelo e frutos de *La*/+. O miR319a é omitido em P2 para facilitar visualização dos genes.

5. TABELAS SUPLEMENTARES

Ref. Seq. NCBI	Nome	Primer foward	Primer reverse
EF091571.1	<i>LANCEOLATE</i>	TGCAGCAGCTATTCGGTCAA	ACCCAGAGAATCCGCCTACT
NM001246864.1	<i>SUN</i>	GGTCAAACAGCACAGCGAAG	AAGTTCTGCTTGTCTGGCG
NM001247292.1	<i>OVATE</i>	GCTGATGAGTACAGCGGGAT	CTGTGACGACGCCTCATTG
NM001247414.1	<i>ToTY1</i>	GTACTCGACGTTGGAGCATTATC	TGAAGAAATCATTCCCTTAAACC
NM_001247387.2	<i>ARF3</i>	GTCTGAGAACTGTTGTAGGTATCCGT	CCTGTTTGCTTTTGCTCCTTTAAG

Tabela S1. Primers utilizados para os genes avaliados nos ensaios de qPCR.

Nome	miR319a
Sequência madura	CUUGGACUGAAGGGAGCUCC
Primer foward	GCATAGCTTGGACTGAAGGG
Primer reverse universal	GTGCAGGGTCCGAGG
Primer RT	<i>Steam-Loop</i> +GGAGCT

Sequência *Steam-Loop*:

GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATA|
CGAC. **GCATAG**: Sequência aleatória para estabilidade do primer.

Tabela S2. Primers utilizados para o miR319a avaliado no ensaio de qPCR.

5. FIGURAS SUPLEMENTARES

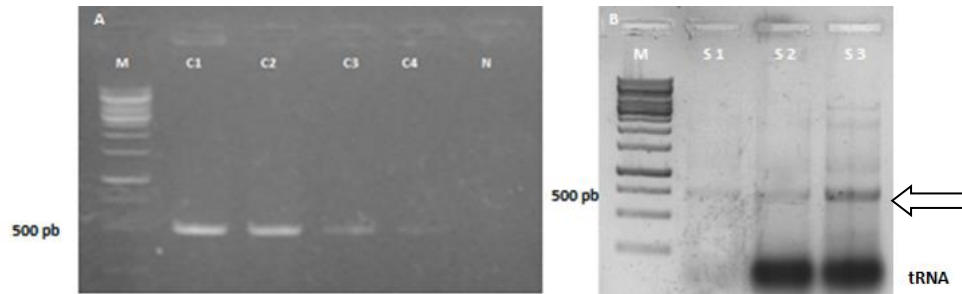


Figura S1. Obtenção da sonda de hibridização *LANCEOLATE*. A: Clonagem da região 1254-1785 da ORF do gene *LA*. B: Sonda para hibridização de *LA*. M: marcador (*ladder*); C: colônia; N: controle negativo; S: sonda. Seta indica o tamanho esperado do transcrito (530 pb).

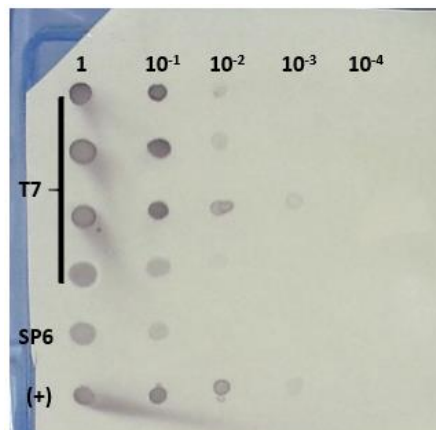


Figura S2. Eficiência da sonda de hibridização *LANCEOLATE*. Confirmação da eficiência das sondas. T7: RNA polimerase utilizada para transcrever sonda *LA* anti-senso (quadruplicata). SP6: RNA polimerase utilizada para transcrever sonda *LA* senso (utilizada como controle negativo no ensaio de hibridização). (+): sonda anti-senso transcrita por T7 utilizada como controle positivo. 1- 10^{-4} : diluição seriada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aggarwal P, Padmanabhan B, Bhat A, Sarvepalli K, Sadhale PP, Nath U. The TCP4 transcription factor of Arabidopsis blocks cell division in yeast at G1→S transition. *Biochem Biophys Res Commun*, 410(2): 276-81, (2011).

Aguilar-Martínez JA, Poza-Carrión C, Cubas P. Arabidopsis BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds. *Plant Cell*, 19(2): 458–472, (2007).

Avasarala S, Yang J, Caruso JL. Production of phenocopies of the lanceolate mutant in tomato using polar auxin transport inhibitors. *J Exp Bot*, (47)298: 709-712, (1996).

Bassel GW, Mullen RT, Bewley JD. Procera is a putative DELLA mutant in tomato (*Solanum lycopersicum*): effects on the seed and vegetative plant. *J Exp Bot*, 59(3): 585-93, (2008).

Baulcombe D. RNA silencing in plants. *Nature*, 431(7006): 356-63, (2004).

Ben-Gera H, Ori N. Auxin and LANCEOLATE affect leaf shape in tomato via different developmental processes. *Plant Signal Behav*, 7(10): 1255-7, (2012).

Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G, *et al.* Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, (115): 591–602, (2003).

Brukhin V, Hernould M, Gonzalez N, Chevalier C, Mouras A. Flower development schedule in tomato *Lycopersicon esculentum* cv. sweet cherry. *Springer*, 15(6): 311-320, (2003).

Busch BL, Schmitz G, Rossmann S. Shoot branching and leaf dissection in tomato are regulated by homologous gene modules. *Plant Cell*, (10): 3595-609, (2011).

Causier B, Schwarz-Sommer Z and Davies B. Floral organ identity: 20 years of ABCs. *Semin Cell Dev Biol*, (21): 73–79, (2010).

Chandler JW. Local auxin production: a small contribution to a big field Bioessays, 31(1): 60-70, (2009).

- Cheng Y, Dai X, Zhao Y. Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in Arabidopsis. *Genes Dev*, 20(13): 1790-9, (2006).
- Crawford BC, Nath U, Carpenter R, Coen ES. CINCINNATA controls both cell differentiation and growth in petal lobes and leaves of *Antirrhinum*. *Plant Physiology*, 135(1): 244-253, (2004).
- Cubas P, Lauter N, Doebley J, Coen E. The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. *Plant J*, 18(2): 215-22, (1999).
- Cumming G, Fidler F and Vaux DL. Error bars in experimental biology. *JCB*, 177(1): 7–11, (2007).
- Damodharan S, Zhao D and Arazi T. A common miRNA160-based mechanism regulates ovary patterning, floral organ abscission and lamina outgrowth in tomato. *Plant J*, (Epub ahead of print), (2016).
- Expósito-Rodríguez M, Borges AA, Borges-Pérez A, Pérez JA. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biol*, (8): 131, (2008).
- Expósito-Rodríguez M, Borges AA, Borges-Pérez A, Pérez JÁ. Gene structure and spatiotemporal expression profile of tomato genes encoding YUCCA-like flavin monooxygenases: the ToFZY gene Family. *Plant Physiol Biochem*, 49(7): 782-91, (2011).
- Feng J, Wang K, Liu X, Chen S, Chen J. The quantification of tomato microRNAs response to viral infection by stem-loop real-time RT-PCR. *Gene*, (437)1: 14-21, (2009).
- Fernandez AI, Viron N, Alhagdow M, Karimi M, Jones M. *et al.* Flexible tools for gene expression and silencing in tomato. *Plant Physiol*. 151(4):1729-40, (2009).
- Ferreira e Silva GF, Silva EM, Azevedo Mda S, Guivin MA, Ramiro DA, Figueiredo CR, Carrer H, Peres LE, Nogueira FT. microRNA156-targeted SPL/SBP box transcription factors regulate tomato ovary and fruit development. *Plant J*, 78(4): 604-18, (2014).
- Gillaspy G, Ben-David H and Gruissem W. Fruits: a developmental perspective. *Plant Cell*, (5): 1439–1451, (1993).

- Giovannoni J. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, (52): 725-749, (2001).
- Girin T, Paicu T, Stephenson P, Fuentes S, Korner E, O'Brien M *et al.* INDEHISCENT and SPATULA interact to specify carpel and valve margin tissue and thus promote seed dispersal in Arabidopsis. *Plant Cell*, (23): 3641–3653, (2011).
- Grieneisen VA, Marée AFM and Østergaard L. Juicy stories on female reproductive tissue development: coordinating the hormone flows. *J Integr Plant Biol*, (55): 847–863, (2013).
- Guilfoyle TJ and Hagen G. Auxin response factors. *Curr Opin Plant Biol*, (10): 453–460, (2007).
- Guillet C, Aboul-Soud MA, Le Menn A, Viron N, Pribat A. Regulation of the fruit-specific PEP carboxylase SIPP2 promoter at early stages of tomato fruit development. *PLoS One*, 7(5):e36795, (2012).
- Guo M and Simmons CR. Cell number counts—the fw2.2 and CNR genes and implications for controlling plant fruit and organ size. *Plant Sci*, (181): 1–7, (2011).
- Hawkins C and Liu Z. A model for an early role of auxin in Arabidopsis gynoecium morphogenesis. *Front Plant Sci*, 8(5): 327, (2014).
- Hackbusch J, Richter K, Muller J, Salamini F and Uhrig J. A central role of Arabidopsis thaliana ovate family proteins in networking and subcellular localization of 3-aa loop extension homeodomain proteins. *PNAS*, (102): 4908–4912, (2005).
- Heisler M G, Atkinson A, Bylstra YH, Walsh R and Smyth DR. SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in Arabidopsis, encodes a bHLH protein. *Development*, (128): 1089–1098, (2001).
- Herve C, Dabos P, Bardet C, Jauneau A, Auriac MC, Ramboer A, Lacout F, Tremousaygue D. In vivo interference with AtTCP20 function induces severe plant growth alterations and deregulates the expression of many genes important for development. *Plant Physiol*, 149(3): 1462–1477, (2009).
- Howarth DG, Martins T, Chimney E and Donoghue MJ. Diversification of CYCLOIDEA expression in the evolution of bilateral flower symmetry in Caprifoliaceae and Lonicera (Dipsacales). *Ann Bot*, 107(9): 1521-32, (2011).

- Hu J, Mitchum M G, Barnaby N, Ayele B T, Ogawa M, Nam E *et al.* Potential sites of bioactive gibberellin production during reproductive growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* (20): 320–336, (2008).
- Huang Z, Van Houten J, Gonzalez G, Xiao H and Van Der Knaap E. Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of SUN, OFP and YABBY gene family in tomato. *Mol Genet Genomics*, (288): 111–129, (2013).
- Iwakawa HO and Tomari Y. Molecular insights into microRNA-mediated translational repression in plants. *Mol Cell*, 52(4): 591-601, (2013).
- Javelle M, Marco CF and Timmermans M. In situ hybridization for the precise localization of transcripts in plants. *J Vis Exp*, (57):e3328, (2011).
- Jiang N, Gao D, Xiao H and Van Der Knaap E. Genome organization of the tomato sun locus and characterization of the unusual retrotransposon Rider. *Plant J*, (60): 181–193, (2009).
- Jiang Y, Joyce DC, Macnish AJ. Effect of abscisic acid on banana fruit ripening in relation to the role of ethylene. *J Plant Growth Regul*, (19): 106–111, (2000).
- Kim S, Park M, Yeom SI *et al.* Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nat Genet*, 46(3): 270-8, (2014).
- Kumar R, Khurana A, Sharma AK. Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. *J Exp Bot*, 65(16): 4561-75 (2015).
- Larsson E, Franks RG and Sundberg E. Auxin and the *Arabidopsis thaliana* gynoecium. *J Exp Bot*, 64(9): 2619-27, (2013).
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, ;433(7027): 769-73, (2005).
- Johnson JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433(7027): 769–773, (2005).
- Klee H J and Giovannoni JJ. Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annu Rev Genet*, (45): 41–59, (2011).

- Lippman ZB, Cohen O, Alvarez JP, Abu-Abied M, Pekker I, Paran I, Zamir D. The making of a compound inflorescence in tomato and related nightshades. *PLoS biology*, 6(11): e288, (2008).
- Liu J, Van Eck J, Cong B and Tanksley SD. A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit. *PNAS*, (99): 13302–13306, (2002).
- Liu Z and Hawkins C. A model for an early role of auxin in *Arabidopsis* gynoecium morphogenesis. *Front Plant Sci*, 8(5): 327, (2014).
- Liu Z, Franks RG. Molecular basis of fruit development. *Front Plant Sci*, 5(6): 28 (2015).
- Liu X, Dinh TT, Li D, Shi B, Li Y, Cao X, Guo L, Pan Y, Jiao Y, Chen X. AUXIN RESPONSE FACTOR 3 integrates the functions of AGAMOUS and APETALA2 in floral meristem determinacy. *Plant J*, 80(4): 629-41, (2014).
- Livne S, Lor VS, Nir I, Eliaz N, Aharoni A, Olszewski NE, Eshed Y, Weiss D. Uncovering DELLA-Independent Gibberellin Responses by Characterizing New Tomato *procera* Mutants. *Plant Cell*, 27(6): 1579-94, (2015).
- Lopez JA, Sun Y, Blair PB, Mukhtar MS. TCP three-way handshake: linking developmental processes with plant immunity. *Trends Plant Sci*, (15): 1360-1385, (2015).
- Mallory AC and Vaucheret H. Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nat Genet*, 38(7): 850, (2006).
- Maraschin FS, Memelink J, Offringa R. Auxin-induced, SCFTIR1-mediated polyubiquitination marks AUX/IAA proteins for degradation. *Plant J*, 59(1): 100–109, (2009).
- Martí C, Orzáez D, Ellul P, Moreno V, Carbonell J, Granell A. Silencing of DELLA induces facultative parthenocarpy in tomato fruits. *Plant J*, 52(5): 865-76, (2007).
- Martin-Trillo M, Cubas P. TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends Plant Sci*, 15(1): 31–39, (2010).
- McAtee P, Karim PS, Schaffer R, David K. A dynamic interplay between phytohormones is required for fruit development, maturation, and ripening. *Front Plant Sci*, (4): 79, (2013).
- Megraw M, Cumbie JS, Ivanchenko MG, Filichkin SA. Small Genetic Circuits and MicroRNAs: Big Players in Polymerase II Transcriptional Control in Plants. *Plant Cell*, 28(2): 286-303, (2016).

- Meissner R, Jacobson Y, Melamed S, Levyatuv S, Shalev G, Ashri A, Elkind Y, Levy A. A new model system for tomato genetics. *Plant J*, (12)6: 1465-1472, (1997).
- Motten AF and Stone JL. Heritability of stigma position Function of Heterostyly and the effect of stigma-anther separation on outcrossing in a predominantly self-fertilizing weed, *Datura stramonium*. *Am J Bot*, (87): 339–347, (2000).
- Moubayidin L and Østergaard L. Dynamic Control of Auxin Distribution Imposes a Bilateral-to-Radial Symmetry Switch during Gynoecium Development *Curr Biol*, 24(22): 2743-2748, (2014).
- Muños S, Ranc N, Botton E. *et al.* Increase in tomato locule number is controlled by two single-nucleotide polymorphisms located near WUSCHEL. *Plant Physiol*, 156(4): 2244-54, (2011).
- Nahar MA, Ishida T, Smyth DR, Tasaka M and Aida M. Interactions of CUP-SHAPED COTYLEDON and SPATULA genes control carpel margin development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, (53): 1134–1143, (2012).
- Nag A, King S, Jack T. miR319a targeting ofTCP4 is critical for petal growth and development in *Arabidopsis*. *PNAS*, 106(52): 22534 –39, (2009).
- Nemhauser JL, Feldman LJ and Zambyrski PC. Auxin and ETTIN in *Arabidopsis* gynoecium morphogenesis. *Development*, (127): 3877–3888, (2000).
- Nole-Wilson S, Azhakanandam S, Franks RG. Polar auxin transport together with aintegumenta and revoluta coordinate early *Arabidopsis* gynoecium development. *Dev Biol*, 346(2):181-95, (2010).
- Olimpieri I, Siligato F, Caccia R, Mariotti L, Ceccarelli N, Soressi GP, Mazzucato A. Tomato fruit set driven by pollination or by the parthenocarpic fruit allele are mediated by transcriptionally regulated gibberellin biosynthesis. *Planta*, 226(4): 877-88, (2007).
- Ori N, Cohen AR, Etzioni A, *et al.* Regulation of LANCEOLATE by miR319 is required for compound-leaf development in tomato. *Nat Genet*, 39(6): 787-91, (2007).
- Osorio S, Alba R, Damasceno C M B, Lopez-Casado G, Lohse M, Zanor M I, *et al.* Systems biology of tomato fruit development: combined transcript, protein, and metabolite analysis of

tomato transcription factor (nor, rin) and ethylene receptor (Nr) mutants reveals novel regulatory interactions. *Plant Physiol*, (157): 405–425, (2011).

Ozga J A, Brenner M L, Reinecke D M. Seed effects on gibberellin metabolism in pea pericarp. *Plant Physiol*, (100): 88–94, (1992).

Palatnik JF, Allen E, Wu X *et al.* Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, 425(6955): 257-63, (2003).

Palatnik JF, Wollmann H, Schommer C, Schwab R, Boisbouvier J, Rodríguez R, Warthmann N, Allen E, Dezulian T, Huson D, Carrington JC, Weigel D. Sequence and expression differences underlie functional specialization of Arabidopsis microRNAs miR159 and miR319. *Dev Cell*, 13(1): 115–125, (2007).

Palmer WM, Ru L, Jin Y. Tomato Ovary-to-Fruit Transition is Characterized by a Spatial Shift of mRNAs for Cell Wall Invertase and its Inhibitor with the Encoded Proteins Localized to Sieve Elements. *Mol Plant*, 8(2): 315-28, (2015).

Pattison RJ e Catalá C. Evaluating auxin distribution in tomato (*Solanum lycopersicum*) through an analysis of the PIN and AUX/LAX gene families. *Plant J*, (70): 585–598, (2012).

Parapunova V, Busscher M, Busscher-Lange J *et al.* Identification, cloning and characterization of the tomato TCP transcription factor family. *BMC Plant Biology*, 14(1): 157, (2014).

Pekker I, Alvarez JP and Eshed Y. Auxin response factors mediate Arabidopsis organ asymmetry via modulation of KANADI activity. *Plant Cell* (17): 2899–2910, (2005).

Robert HS, Crhak Khaitova L, Mroue S, Benková E. The importance of localized auxin production for morphogenesis of reproductive organs and embryos in Arabidopsis. *J Exp Bot*, 66(16): 5029-42, (2015).

Rodríguez GR, Muños S, Anderson C, *et al.* Distribution of SUN, OVATE, LC, and FAS in the tomato germplasm and the relationship to fruit shape diversity. *Plant Physiol*, 156(1): 275-85, (2011).

Ruan YL, Patrick JW, Bouzayen M, Osorio S and Fernie AR. Molecular regulation of seed and fruit set. *Trends Plant Sci*, 17: 656–665, (2012).

Rubio-Somoza I, Zhou CM, Confraria A, Martinho C, von Born P, Baena-Gonzalez E, Wang JW, Weigel D. Temporal control of leaf complexity by miRNA-regulated licensing of protein complexes. *Curr Biol*, 24(22): 2714-9, (2014).

Sacks E J, Gerhardt L M, Graham E B, Jacobs J, Thorup T A, Stclair D A. Variation among 41 genotypes of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) for crossability to *Lperuvianum* (L.) Mill. *Annals of Botany*, (80)4: 469-477, (1997).

Samach A and Lotan H. The transition to flowering in tomato. (24): 71–82, (2007).

Sarvepalli K and Nath U. Hyper-activation of the TCP4 transcription factor in *Arabidopsis thaliana* accelerates multiple aspects of plant maturation. *Plant J*, (67): 595 - 607, (2011).

Schommer C, Bresso EG, Spinelli SV, Palatnik JF. Role of MicroRNA miR319 in Plant Development. *Springer*, (15): 29-47, (2012).

Schommer C, Debernardi JM, Bresso EG, Rodriguez RE, Palatnik JF. Repression of cell proliferation by miR319-regulated TCP4. *Mol Plant*, 7(10): 1533-44, (2014).

Sessions R. *Arabidopsis* (Brassicaceae) flower development and gynoecium patterning in wild type and *Ettin* mutants. *Am J Bot*, 84(9): 1179, (1997).

Spinner L, Pastuglia M, Belcram K, Pegoraro M, Goussot M, Bouchez D *et al*. The function of TONNEAU1 in moss reveals ancient mechanisms of division plane specification and cell elongation in land plants. *Development*, (137): 2733–2742, (2010).

Stettler RF. Dosage effects of the Lanceolate gene in tomato. *Am J Bot*, (51): 253–264, (1964).

Stewart CN. The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. *Plant Cell Rep*, 20(5): 376-382, (2001).

Sun L, Sun Y, Zhang M, Wang L, Ren J, Cu, M, *et al*. Suppression of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, which encodes a key enzyme in abscisic acid biosynthesis, alters fruit texture in transgenic tomato. *Plant Physiol*, (158): 283–298, (2012).

Szymkowiak EJ and Sussex IM. The internal meristem layer (L3) determines floral meristem size and carpel number in tomato periclinal chimeras. *Plant Cell*, (4): 1089–1100, (1992).

- Takeda T, Amano K, Ohto MA, Nakamura K, Sato S, Kato T, Tabata S, Ueguchi C: RNA interference of the Arabidopsis putative transcription factor TCP16 gene results in abortion of early pollen development. *Plant Mol Biol*, 61(1–2): 165–177, (2006).
- Terao A, Hyodo H, Satoh S, Iwai H. Changes in the distribution of cell wall polysaccharides in early fruit pericarp and ovule, from fruit set to early fruit development, in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of plant research*, 126(5): 719-728, (2013).
- Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle T. The Roles of Auxin Response Factor Domains in Auxin-Responsive Transcription. *Plant Cell*, 15(2): 533-43, (2003).
- Trainotti L, Tadiello A, Casadoro G. The involvement of auxin in the ripening of climacteric fruits comes of age: the hormone plays a role of its own and has an intense interplay with ethylene in ripening peaches. *J Exp Bot*, (58): 3299–3308, (2007).
- Uberti Manassero NG, Viola IL, Welchen E, Gonzalez DH: TCP transcription factors: Architectures of plant form. *Biomol Concepts*, 4(2):111–127, (2013).
- van der Knaap E, Chakrabarti M, Chu YH *et al.* What lies beyond the eye: the molecular mechanisms regulating tomato fruit weight and shape. *Frontiers in Plant Science*, 27 (5):227 (2014).
- Van Mourik S, Kaufmann K, Van Dijk A D, Angenent G C, Merks R M, Molenaar J. Simulation of organ patterning on the floral meristem using a polar auxin transport model. *PLoS ONE*, 7(1): e28762, (2012).
- Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton E F, Hellens R P. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, (3)12: 1-12, (2007).
- Vernoux T, Kronenberger J, Grandjean O, Laufs P, Traas J. PIN-FORMED 1 regulates cell fate at the periphery of the shoot apical meristem. *Development*, 127(23): 5157-65, (2000).
- Vicente MH, Zsögön A, de Sá AF, Ribeiro RV, Peres LE. Semi-determinate growth habit adjusts the vegetative-to-reproductive balance and increases productivity and water-use efficiency in tomato (*Solanum lycopersicum*). *J Plant Physiol*, 1(177): 11-9, (2015).
- Wang S, Chang Y, Guo J, Chen JG. Arabidopsis Ovate Family Protein 1 is a transcriptional repressor that suppresses cell elongation. *Plant J.* (50): 858–872, (2007).

- Wang S, Chang Y, Guo J, *et al.* Arabidopsis ovate family proteins, a novel transcriptional repressor family, control multiple aspects of plant growth and development. PLoS One, 6(8): e23896, (2011).
- Wang S, Chang Y, Ellis B. Overview of OVATE FAMILY PROTEINS, A Novel Class of Plant-Specific Growth Regulators. Front Plant Sci, (7): 417, (2016).
- Warthmann N, Allen E, Dezulian T, Huson D, Carrington JC, Weigel D. Sequence and expression differences underlie functional specialization of Arabidopsis microRNAs miR159 and miR319. Dev Cell, 13(1): 115–125, (2007).
- Weigel D, Ahn JH, Blazquez MA, Borevitz JO, *et al.* Activation tagging in Arabidopsis. Plant Physiol, 122(4): 1003–1013, (2000).
- Winter CM, Yamaguchi N, Wu MF, Wagner D. Transcriptional programs regulated by both LEAFY and APETALA1 at the time of flower formation. Physiol Plant, 155(1): 55-73, (2015).
- Wu S, Xiao H, Cabrera A, Meulia T and Van Der Knaap E. SUN regulates vegetative and reproductive organ shape by changing cell division patterns. Plant Physiol, (157): 1175–1186, (2011).
- Wu S, Clevenger JP, Sun L *et al.* The control of tomato fruit elongation orchestrated by sun, ovate and fs8.1 in a wild relative of tomato. Plant Sci, (238): 95-104, (2015).
- Xiao H, Radovich C, Welty N, Hsu J, Li D, Meulia T *et al.* Integration of tomato reproductive developmental landmarks and expression profiles, and the effect of SUN on fruit shape. BMC Plant Biol, 9(49): 1471-2229-9-49, (2009).
- Yanai O, Shani E, Russ D, Ori N. Gibberellin partly mediates *LANCEOLATE* activity in tomato. Plant J 68(4):571-82, (2011).
- Yu H and Huang T. Molecular Mechanisms of Floral Boundary Formation in Arabidopsis. Int J Mol Sci, 17(3): 317, (2016).
- Zhang M, Yuan B and Leng P. The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. J Exp Bot, (60): 1579–1588, (2009).

Zhao Y, Christensen SK, Fankhauser C, Cashman JR, Cohen JD, Weigel D, Chory J. A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science*, 291(5502): 306-9, (2001).