

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 05/08/2018.

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

Carvalho Júnior, Airton de.

O tomate constrito-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</i> (<i>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</i> /miR319a.....	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 constrito-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 constrito-alongado do mutante <i>La/+</i>	44

Figura 15. Redução da expressão de OVATE durante o desenvolvimento inicial do fruto constrito-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 constrito-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 *arabidopsis* 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.

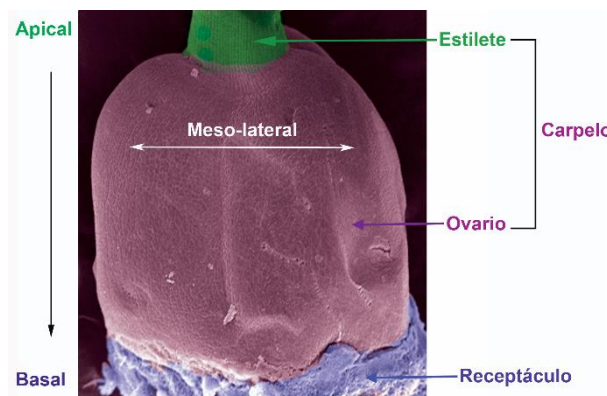


Figura 1. Estrutura carpelar do tomateiro. Microscopia eletrônica de varredura (*false colored*) do gineceu (mostrando estilete, ovário e receptáculo) de tomateiro cv. Micro-Tom (MT). Fonte: Laboratório GMDV.

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 (TB1)* 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 (*cawliflower 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 *arabidopsis* *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, consequentemente, 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.

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 SLPPC2 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-Engle 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 *L. peruvianum* (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 *ett* 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).