



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Campus Botucatu – Instituto de Biociências

**Caracterização funcional da via miR159/*SlyGAMYB-like* ao longo do
processo de frutificação em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)**

Eder Marques da Silva

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu,
UNESP, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor, pelo
Programa de Pós Graduação em
Ciências Biológicas/AC: Genética.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Tebaldi S. Nogueira

Botucatu

2016

**Caracterização funcional da via miR159/*Sl*GAMYB-like ao longo do
processo de frutificação em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)**

Eder Marques da Silva

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu,
UNESP, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor, pelo
Programa de Pós Graduação em
Ciências Biológicas/AC: Genética.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Tebaldi S. Nogueira

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

Silva, Eder Marques.

Caracterização funcional da via miR159/SlyGAMYB-like ao longo do processo de frutificação em tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv Micro Tom) / Eder Marques Silva. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fábio Tebaldi S. Nogueira
Capes: 20100000

1. Plantas - Reguladores. 2. Plantas - Reprodução.
3. Giberelina. 4. Tomateiro. 5. Partenocarpia. 6. Frutas.

Palavras-chave: ARFs; Giberelina; Ovário; Partenocarpia; miR167.

AGRADECIMENTOS

À minha família, meu pai Odilon, minha mãe Vilma, meu irmão mais velho Fábio Marques e meu irmão mais novo Evandro.

Minha outra família: Professor Dr. Luiz Eduardo Grassi e à professora Msc. Maria de Fátima Mattos Grassi (Fatinha), por todos os conselhos e principalmente pela confiança depositada em mim desde o momento que eu tive o privilégio de ambos fazerem parte de minha história.

Ao senhor Silvio Albano Moreira Campos, por ter sido um bom exemplo em um momento muito determinante em minha adolescência, pelo apoio ao longo de minha formação, mas principalmente, por me encorajar a “correr atrás” dos meus sonhos e também por me ensinar a nunca desperdiçar a chance de aprender algo novo.

Ao meu grande amigo Renato (kékú), pela paciência durante o tempo em que dividimos república, por sempre me encorajar durante momentos difíceis e por sempre ter deixado claro que é um amigo que eu posso contar.

Aos meus companheiros Fernando e Tobias, porque sei que sempre estão torcendo pelo meu sucesso.

Ao meu amigo Juan, pela ajuda quando cheguei a Botucatu.

Aos meus amigos de infância João Paulo e Bruno Bezerra, porque sei que ainda não tenhamos muito contato, posso contar com eles em qualquer momento e também porque seguramente estão torcendo pelas minhas conquistas.

Ao meu orientador pela confiança depositada ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Ao pessoal do Departamento de Genética de Botucatu, em especial à Valquíria pela paciência e por sempre ter me auxiliado em todos os momentos que precisei.

À Gicela, ex-companheira de laboratório, pela amizade e pela paciência durante o tempo em que trabalhamos juntos.

À Cris, também ex-companheira de laboratório, pela amizade paciência e pela ajuda depois que me mudei para Piracicaba.

Aos amigos Rafael Takahiro e Marcos Geraldo, pelo companheirismo e por que sei que também torcem pelo meu sucesso.

Ao amigo Geraldo, pelo apoio na realização do trabalho, pela revisão do presente trabalho, pelas discussões científicas muito proveitosas e também por todas as vezes que ele me deu carona quando fomos para os bares e churrascos.

Ao meu amigo Mateus Henrique (Parceiro de casa vegetação, futebol e truco), por todas as discussões científicas (sempre muito proveitosas), por ter feito considerações, correções e sugestões na revisão de literatura e introdução do meu trabalho.

Aos alunos de pós-graduação: Frederico, Maisa, Eloisa, Mariana pelo auxílio e por todas as dicas ao longo da realização do trabalho.

À minha ex-estagiária Debora Bidoia, pelo auxílio e dedicação durante a realização deste trabalho.

Ao companheiro e colega de laboratório: João por ter revisado o presente trabalho.

Aos colegas Carlos e Pollyana.

Ao amigo Antoine Gady, por todas as revisões e sugestões no artigo da tese e pela parceria no laboratório.

Ao meu amigo Airton, pela paciência durante o convívio no laboratório, por ter revisado e feito sugestões no texto do presente trabalho.

A CAPES pela concessão da Bolsa de Doutorado.

À FAPESP, pela concessão da Bolsa de doutorado e também pela bolsa de doutorado Sanduiche.

Às Pesquisadoras Isabel Lopes e Esther Carrera da UPV (Universitat Politècnica de València), pela colaboração no presente trabalho.

À técnica de laboratório Teresa (UPV (Universitat Politècnica de València) sua ajuda foi fundamental nos experimentos de quantificação hormonal.

Às amigas, Suzana, Sarah e o amigo Artur de Valência, ainda que estejam longe, sempre estão torcendo pelo meu sucesso.

Ao amigo Aitor pela ajuda no laboratório durante o tempo que passei na UPV.

Ao pessoal do departamento de botânica de Botucatu, em especial ao professor Luiz Fernando e ao seu orientado Danilo.

Muito Obrigado!

RESUMO

O processo de frutificação é definido como a transição de um ovário em estágio quiescente para estágio de iniciação de formação do fruto. Esta transição é iniciada em resposta aos eventos de polinização e fertilização, os quais induzem o início dos processos fisiológicos e moleculares, que, ao final, irão originar o fruto. A frutificação é fundamental para reprodução nas plantas com flores (Angiospermas). Já foi demonstrado que hormônios (tais como auxina e giberelina) podem atuar em paralelo com fatores de transcrição durante o desenvolvimento do fruto. Alguns desses fatores de transcrição são pós-transcricionalmente regulados por microRNAs. MicroRNAs, são pequenos RNAs (20-22 nt) que regulam pós-transcricionalmente a expressão de genes endógenos, modelando o transcriptoma e a produção de proteínas. Entretanto, vias genéticas orquestradas por microRNAs associadas com o desenvolvimento de ovário, e consequentemente, do fruto em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), permanecem pouco exploradas. Neste trabalho, foi investigada a contribuição da via *SlymiR159/GAMYB-like* durante o processo de desenvolvimento do ovário e frutificação em tomateiro. O *miR159* e seus alvos (*SlyGAMYB1* e 2) são dinamicamente expressos durante os estágios de desenvolvimento do ovário e consequentemente do fruto. Eventos transgênicos de tomateiro (cv. Micro-Tom) apresentando super-expressão do precursor *SlyMIR159* (denominados OE-159) exibiram frutificação precoce quando comparadas aos controles. Notavelmente, todos os eventos OE-159 apresentaram formação de frutos partenocárpicos. Tal alteração no padrão de frutificação pode estar correlacionada a repressão do gene *SlyGAMYB1* em períodos pré-antese de desenvolvimento do ovário, é possível que a atividade do fator de transcrição *SlyGAMYB1* seja importante para prevenir o início da frutificação antes da polinização. Além disso, a via regulada pelo *miR167/SlyARF8A* mostrou-se desregulada em ovários pré-antese de plantas transgênicas OE-159. Adicionalmente, mesmo com o fenótipo de partenocarpia e frutificação precoce, não houve alterações na quantidade de hormônios (e.g. giberelina, ácido abscísico e auxina) relacionados à formação de frutos nas plantas transgênicas OE-159. Contudo, a via *miR159/GAMYB-like* encontra-se

reprimida nos primeiros estágios da frutificação (após polinização e fertilização) e a expressão do *SlyARF8A* (alvo do miR167) encontra-se induzida na presença de auxina. Em conjunto, nossos dados sugerem que o *crosstalk* entre as vias moduladas pelos microRNAs miR159 e miR167, integrados com a via de sinalização de auxina, é importante para a frutificação em tomateiro.

Palavras chave: ARF, Giberelina, Ovário, Partenocarpia, auxina e miR167.

ABSTRACT

Fruit set, defined as the shift from quiescent ovary to a fast-growing young fruit, is a key process for fruit production in flowering plants. It has been shown that hormones (such as auxin and gibberellin) act in parallel with transcription factors during fruit set. Some of these are post-transcriptionally regulated by microRNAs (miRNAs). MiRNAs are a group of small non coding RNAs (21-22 nt) that act by regulating post-transcriptionally genes in plants and animals. However, microRNA-regulated genetic pathways associated with tomato (*Solanum lycopersicum* L.) ovary development and fruit set remain poorly exploited. Here, we investigated the functional role of miRNA159/*SlyGAMYB-like* in tomato ovary development and fruit set. MiR159 and its targets were dynamically expressed in developing flowers, ovaries and fruit tissues. Transgenic tomato (cv. Micro-Tom) plants over-expressing the *SlyMIR159* (termed OE-159) exhibited fruit set earlier when compared with control plants. Strikingly, all transgenic lines presented parthenocarpic fruits. Such developmental modification may be a result of the repression of *SlyGAMYB1* in pre-anthesis ovaries, our data suggest that *SlyGAMYB1* activity is important to prevent fruit set before pollination. In addition as a consequence of this repression, the miR167 node (miR167/*SlyARF8* pathway) was mis-regulated in OE-159 ovaries. In addition, we observed that levels of auxin, gibberellin (GA) and abscisic acid (ABA) in pre-anthesis ovaries of several transgenic lines over-expressing the *SlyMIR159* were similar to those of the control. Moreover, our experiments suggested that auxin and GA may act repressing the miR159 node during fruit set initiation, in order to release the miR167-targeted *SlyARF8A* expression during fruit set. Our data show how two microRNA nodes (miR159 and miR167) integrated with hormone signalling into a circuit that coordinates successive steps along ovary and fruit development.

Key words: ovary, parthenocarpic, *Solanum lycopersicum*, gibberellin, Auxin.

Sumário

1 - Introdução Geral	01
2.0- Revisão bibliográfica	05
2.1 - Considerações gerais em relação à organização e classificação dos frutos.....	05
2.2 – Importância agrônômica do tomateiro e sua utilização como espécie modelo em estudos genéticos e moleculares associados ao desenvolvimento dos frutos	06
2.3 – Aspectos hormonais e moleculares do desenvolvimento e formação de frutos..	09
2.4 – Considerações gerais sobre os microRNAs ao longo do desenvolvimento e formação de frutos.....	11
2.5 – Aspectos gerais relacionados à geração de frutos sem sementes com ênfase em partenocarpia.....	15
2.6 Considerações genéticas e moleculares sobre partenocarpia em tomateiro	17
2.7 - Considerações gerais sobre os genes <i>GAMYB</i> -like e sua regulação pelo miR159 ao longo do desenvolvimento vegetal	19
3.0 - Os resultados e discussão da tese estão apresentados no formato de artigo científico	23
3.1 - microRNA159-targeted SlyGAMYB-like transcription factors regulate tomato fruit set and induce parthenocarp.	24
4.0 - Conclusões gerais da tese	57
5.0 - Referências Bibliográficas	58
6.0 - Anexos: Artigos publicados em colaboração e pedagógica (capítulo de livro publicado) durante o período de doutoramento. Tabela de primers utilizados na tese.....	63
I. Functional and evolutionary analyses of the miR156 and miR529 families in land plants.....	64
II. microRNA156-targeted SPL/SBP-box transcription factors regulate tomato ovary and fruit development.....	65
III. Global analysis of the sugarcane microtranscriptome reveals a unique composition of small RNAs associated with axillary bud outgrowth	66
IV. MicroRNAs e desenvolvimento Vegetal	67

V. Tabela de Oligonucleotídeos utilizados na realização do presente trabalho.....	68
---	----

1 - Introdução Geral

O início do processo de frutificação é definido como a transição de um ovário que estava em estágio quiescente de desenvolvimento, que em resposta aos eventos de polinização e fertilização, dá início as etapas posteriores de formação do fruto (Jong *et al.*, 2009). Apesar de a maioria dos frutos nas plantas terrestres serem secos e deiscentes, as pesquisas visando entender o desenvolvimento de frutos estão focadas nos frutos carnosos, devido à relevância dos mesmos na dieta humana. Importância tem sido dada ao fruto do tomateiro, que vem sendo muito utilizado como modelo para estudos fisiológicos, genéticos e moleculares que visam conhecer a biologia dos frutos carnosos (Giovanoni, 2001).

Em tomateiro, assim como em todas as Angiospermas, a frutificação e desenvolvimento de sementes são dependentes dos eventos de polinização e fertilização. Mesmo que todos os verticilos florais estejam completamente formados, na ausência de fertilização, há uma tendência de abortamento foral (O'Neill e Nadeau, 1997). Uma vez ocorrida a fertilização, inicia-se as etapas de divisão e, subsequentemente, expansão celular que são fundamentais na determinação do tamanho final do fruto.

As etapas de divisão e expansão celular da frutificação são controladas principalmente pelos hormônios auxina, citocinina e giberelina (GA). Ao final, uma série de eventos genéticos, fisiológicos e bioquímicos atuam de maneira coordenada com o hormônio etileno no amadurecimento do fruto (Gillaspy *et al.*, 1993).

O efeito da polinização e fertilização na indução da frutificação pode ser substituído pela aplicação de hormônios vegetais (i.e. Auxina e GA) (Vivian-

Smith e Koltunow, 1999; Serrani *et al.*, 2007). No entanto, os frutos provenientes de ovários tratados com hormônios não apresentam o desenvolvimento de sementes.

Mecanismos que induzem a formação de frutos sem sementes já foram demonstrados em algumas espécies vegetais, dentre os quais se destaca a partenocarpia, no qual o fruto se desenvolve na ausência de fertilização, como é o caso de culturas algumas cultivares de *Citrus* e banana. Além da partenocarpia, frutos sem sementes podem ser formados por estenospermia, onde a polinização e fertilização são necessárias para frutificação, porém, o embrião não se desenvolve. Frutos de uva são exemplos onde ocorre estenospermia (Bouquet *et al.*, 1996; Stout, 1936).

Frutos partenocárpicos são tidos como uma característica de interesse econômico (Varoquaux *et al.*, 2000). Alguns mutantes e transgênicos de tomateiro possuem capacidade de gerar frutos partenocárpicos. Geralmente estes mutantes e/ou transgênicos possuem vias de síntese e ou sinalização de hormônios alteradas (Fos *et al.*, 2000, 2001; Olimpieri *et al.*, 2007; Jong *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2005a).

Já foi demonstrado que hormônios podem agir em paralelo com alguns fatores de transcrição durante as diferentes etapas de frutificação, sugerindo que o controle da expressão dos genes que codificam fatores transcricionais é importante para o processo de frutificação (Ma *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014). Alguns fatores de transcrição que são ativos durante o desenvolvimento do fruto são regulados por microRNAs. MicroRNAs são pequenos RNAs não codantes de 19 a 22 nucleotídeos codificados por genes *MIRNAs* (*MIRs*) que regulam pós-transcricionalmente a expressão gênica.

Em tomateiro, já foi demonstrado que as vias miR164/SlyGOBLET e miR156/SlySPLs são importantes para o desenvolvimento do fruto (Berger et al., Silva et al., 2014). Adicionalmente, também já foi explorado a via miR167/ARFs durante o desenvolvimento do fruto de tomateiro (Liu et al. (2013). Entretanto, há poucos exemplos demonstrando o papel funcional de vias reguladas por esses pequenos RNAs no processo de frutificação dos vegetais.

O miR159 regula negativamente alguns fatores de transcrição GAMYB-like (Schwab et al., 2005; Tsuji et al., 2006). Em arabidopsis, foi demonstrado que a via miR159/GAMYB-like está envolvida com o tempo de florescimento, pois, plantas de arabidopsis que superexpressam o miR159 apresentam florescimento tardio. Também foi demonstrado que a via miR159/GAMYB-like é importante no estabelecimento de alguns verticilos florais, uma vez que plantas de arabidopsis que superexpressam o miR159 apresentam escurecimento do cone de anteras (Achard et al., 2004; Blazquez e Weigel 2000; Gocal et al., 2001). Nesse contexto, pode-se dizer que os genes *GAMYB-like*, bem como sua regulação pelo miR159, possuem papéis relevantes em vários aspectos do desenvolvimento vegetal.

Em tomateiro, com a utilização e análise do mutante *7B-1* (mutante de tomateiro macho estéril que é dependente de foto-período), foi sugerido que a via miR159/*GAMYB-like* possa estar relacionada com o desenvolvimento das anteras (Omidvar et al., 2015). Adicionalmente, foi demonstrado que o miR159 e seus alvos *GAMYB1* e *2* são expressos ao longo do desenvolvimento de fruto (Gong e Bewley, 2008, Mohorianu et al., 2011; Lopez-Gollomon et al., 2012; Karlova et al., 2013), o que levanta a questão sobre a participação da via do miR159 durante as etapas de desenvolvimento e formação do fruto e se ela

atua interagindo com outros fatores moleculares e fisiológicos durante as diferentes etapas de frutificação.

Ainda que tenha sido demonstrado que o miR159 e seus alvos são expressos em ovário e frutos de tomateiro, até o momento, não há trabalhos descrevendo a importância funcional da via orquestrada por esse microRNA durante o desenvolvimento reprodutivo desta cultura que possui grande relevância econômica.

Desta forma, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar funcionalmente a via regulada pelo miR159 durante o processo de frutificação em tomateiro (cv. Micro-Tom), e a possível correlação desta via (miR159/*GAMYB-like*) com outras vias moleculares e vias hormonais durante as etapas de desenvolvimento do ovário e do fruto.

2- Revisão bibliográfica

2.1 - Considerações gerais em relação à organização e classificação dos frutos

Os frutos são definidos como estruturas provenientes do ovário maduro que armazenam sementes (Seymour *et al.*, 2013), sendo assim, modificações no desenvolvimento do ovário podem acarretar em alterações no padrão de formação dos tecidos que compõem o fruto.

Existem frutos nos quais a região carnosa é originada de outra região da flor que não o ovário (ex. morango, maçã), os quais são denominados frutos não verdadeiros. Frutos verdadeiros são, portanto, aqueles que se derivam do gineceu (órgão reprodutor feminino proveniente da fusão dos carpelos). Frutos são frequentemente classificados como: secos ou carnosos, sendo os considerados secos, aqueles que apresentam o pericarpo seco (ex. milho, arroz), os quais representam a maioria dos frutos das plantas terrestres (Giovanoni, 2004). Aqueles que apresentam o pericarpo macio são classificados como frutos carnosos (ex. tomate, abóbora). Nos frutos secos, o endocarpo possui papel crucial na dispersão de sementes, o que permite classificá-los em frutos deiscentes (aqueles que quando maduros se abrem, permitindo assim, a liberação das sementes ex. feijão, soja) e frutos indeiscentes (sendo estes os que não se abrem quando maduros, ex. avelã, noz) (Raven 2006; Vidal e Vidal 2006).

Além disso, os frutos carnosos podem ser classificados como bagas e drupas. Bagas são frutos que possuem em seu interior uma ou várias sementes (ex. tomate, mamão, melancia). As drupas geralmente apresentam

uma única semente no endocarpo, sendo este, na maioria das vezes, duro e espesso (ex. abacate, azeitona, manga) (Raven 2006; Vidal e Vidal 2006)

Com relação aos mecanismos que governam o amadurecimento, frutos podem ser divididos em dois grupos: (1) frutos climatéricos, aqueles em que o processo de amadurecimento é estreitamente ligado à respiração, produção e resposta ao hormônio etileno (ex. tomate, abacate); (2) frutos não climatéricos, que são caracterizados por um processo de amadurecimento não relacionados com picos de respiração e pouca alteração na produção de etileno (ex. pimenta, uva) (Biale, 1964; McMurchie *et al.*, 1972).

Os frutos, independente de como são classificados, possuem a função de armazenar as sementes e são muito importantes para sua dispersão (Gillaspy *et al.*, 1993), sendo assim, são órgãos primordiais para o sucesso reprodutivo de várias espécies vegetais.

2.2 – Importância agronômica do tomateiro e sua utilização como espécie modelo em estudos genéticos e moleculares associados ao desenvolvimento dos frutos

Os frutos possuem papel extremamente relevante para a dieta humana. Humanos consomem frutos de uma ampla faixa de espécies, tais como: Solanaceae (tomate, berinjela, pimenta), Rutaceae (citrus), Rosaceae (peras), Cucurbitaceae (melão, abóbora) Vitaceae (uva), entre outros. Consequentemente, os humanos passaram a domesticar espécies vegetais com o intuito de consumo de seus respectivos frutos (Tanksley 2004; Monforte *et al.*, 2014). Nesse contexto, o tomateiro (*Solanum lycopersicum*, antes denominado como *Lycopersicon esculentum* Mill.) se destaca como um desses vegetais que foi domesticado com o intuito de consumo.

O tomateiro é uma espécie originária da região Andina, onde atualmente se encontram parte do Chile, Bolívia, Equador, Colômbia e Peru. Ainda que já se saiba que a domesticação do tomateiro se deu nas Américas, a região exata permanece em debate (Peralta e Spooner, 2007). Acredita-se a sua localização mais provável de sua domesticação seja no México (Larry e Joanne, 2007).

A cultura do tomateiro é muito praticada devido ao seu fruto ser extremamente apreciado na dieta humana, principalmente em decorrência do seu valor nutricional e das várias formas em que é possível consumi-lo. Atualmente, o fruto do tomateiro figura como umas das hortaliças de maior consumo em nível mundial (FAOSTAT, <http://faostat3.fao.org/home/index.html>), sendo o seu consumo inferior apenas ao consumo de batata (*Solanum tuberosum*), o que demonstra sua grande importância econômica (UNITED STATES. Department of Agriculture, 2009). A produção mundial de tomate é liderada pela China, seguida dos EUA, sendo o Brasil o oitavo maior produtor.

Além do valor comercial do tomateiro, este também vem adquirindo um valor muito relevante como espécie modelo para diversos estudos relacionados ao desenvolvimento vegetativo e reprodutivo dos vegetais. Tal fato é consequência de algumas características que contrastam a planta do tomateiro com plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*, *Antirrhinum majus* e *Oryza sativa*. Dentre essas características do tomateiro destacam-se: hábito de crescimento simpodial, desenvolvimento de folhas compostas, insensibilidade a foto-período, genoma relativamente pequeno (950Mb), facilidade de transformação genética e formação de frutos carnosos, sendo esta última uma característica com grande interesse agrônomo ausente nas plantas modelos citadas anteriormente (Carvalho *et al*, 2011; Ranjan *et al*, 2012; Bergougnoux, 2013; Pino *et al.*, 2011). Também vale destacar que a caracterização de

mutantes (sejam naturais ou gerados em laboratório) para várias vias de desenvolvimento de tomateiro tem contribuído significativamente para a sua utilização como organismo modelo para estudos genéticos e moleculares (Saito *et al.*, 2011).

A cultivar de tomateiro Micro-Tom (MT) vem sendo cada vez mais adotada como ferramenta para estudos de genômica funcional. Essa cultivar apresenta algumas mutações em seu *background* genético que faz com que a mesma possua ciclo de vida relativamente curto. A presença do alelo *sp* para o locus *SELF-PRUNING* (proteínas moduladoras da família CETS) resulta em crescimento determinado da cultivar (Macgarry e Ayre, 2012; Lifschitz *et al.*, 2014). Já o alelo *d* para o locus *DWARF* que codifica uma proteína da família P450 envolvida na biossíntese de brassinoesteróides proporciona o fenótipo anão do MT (Bishop *et al.*, 1999). Além disso, essa cultivar possui outra mutação que induz a redução no comprimento do entrenó, ao qual afeta a altura da planta sem alterar os níveis de giberelina (GA) (Marti *et al.*, 2006)

A presença de mutações não é exclusividade da cultivar MT, uma vez que todas as cultivares de tomateiro apresentam alelos mutantes quando comparado a qualquer outro genótipo, e esta variação genética é exatamente o que define a cultivar como tal (Campos *et al.*, 2010). Adicionalmente, a cultivar MT é sugerido como um ótimo modelo para estudos de regulação do desenvolvimento de frutos (Meissner *et al.*, 1997; Eyal y Levy, 2002; Serrani *et al.*, 2007b).

2.3 – Aspectos hormonais e moleculares do desenvolvimento e formação de frutos

O início do processo de frutificação (Figura 1) pode ser definido como a modificação de um ovário quiescente para ovário em desenvolvimento, dando origem ao fruto jovem (Gillaspy *et al.*, 1993). Assim, pode-se dizer que o desenvolvimento do fruto pode ser dividido em diferentes estágios, sendo que cada estágio possui características morfológicas e moleculares específicas. Estágio 1: nesse período a identidade dos verticilos florais é determinada, ocorrendo entre duas a três semanas após a iniciação floral e a geração de uma flor considerada madura, onde a divisão celular é temporariamente reduzida até que a fertilização ocorra, uma vez que as vias de sinalização hormonal encontram-se reprimidas antes da fertilização. Uma característica molecular nessa etapa é a expressão de genes *AuxIAAs*, os quais codificam proteínas que atuam inibindo a resposta à auxina, através da formação de heterodímeros com proteínas codificadas por alguns genes *ARFs* (*Auxin Response Factors*), fatores de resposta à auxina (Wang *et al.*, 2005).

Estágio 2: Período de intensa divisão celular, que começa na antese, ou seja, o ato de abertura da flor, e continua por aproximadamente duas semanas após a fertilização. A fertilização é primordial para a transição do segundo para o terceiro estágio, uma vez que a mesma desencadeia a síntese do fitohormônio auxina, o que qual induz a degradação das proteínas *AuxIAAs* e consequentemente favorece a expressão de alguns genes *ARFs* que estão relacionados com o início da frutificação. Adicionalmente, foi demonstrado que o nível de citocinina também aumenta em ovários de tomateiro em estágio de pós-antese, e que os níveis de etileno reduzem depois da polinização,

demonstrando que esses fitohormônios podem atuar no processo de frutificação (Matsuo *et al.*, 2012; Shinozaki *et al.*, 2015).

Estágio 3: Período de rápida expansão celular que começa com o fim da divisão celular e permanece até aproximadamente uma semana antes do início do amadurecimento. As células podem se expandir em até 20 vezes nesse período. Nesta etapa os genes de biossíntese de GAs biologicamente ativas são muito expressos.

Estágio 4: Fase de amadurecimento, ou seja, nesta etapa o etileno está intimamente relacionado com a indução do amadurecimento, o qual se inicia após o crescimento ter cessado e envolve rápidas modificações químicas, fisiológicas e estruturais que determinam o aroma, cor, textura, sabor entre outras características organolépticas do fruto. Também foi demonstrado que o ácido abscísico (ABA) pode exercer papel indireto no processo de amadurecimento, uma vez que, o tratamento de frutos de tomateiro com ABA induz a expressão de genes de biossíntese de etileno e, conseqüentemente, induz o amadurecimento (Zang *et al.*, 2009).



Figura 1. Representação temporal resumida dos estágios de frutificação do tomateiro, do período de antese até o amadurecimento. Seta vermelha representa o evento de polinização. Os períodos em que os hormônios (auxina, GA e etileno) atuam estão na região superior da Figura. Modificado a partir de Karlova *et al.*, 2014.

2.4 – Considerações gerais sobre os microRNAs ao longo do desenvolvimento e formação de frutos

MiRNAs em plantas foram primeiramente descritos em 2002 (Reinhart *et al.*, 2002) e desde então, vários avanços foram feitos para o melhor entendimento de sua biogênese e função.

A biogênese de miRNAs é iniciada pela transcrição dos genes *MIR* via RNA Polimerase II. O transcrito primário, ou precursor (pri-miRNA), é um RNA longo fita-simples e poliadenilado que forma estrutura secundária do tipo “*hairpin*”. O pri-miRNA é processado via a ação de diferentes enzimas, incluindo a enzima RNase III DICER-LIKE1 (DCL1), e gera o precursor intermediário ou pré-miRNA (Vaucheret, 2006). O pré-miRNA é clivado novamente pela enzima DCL1, gerando um “duplex” imperfeito de RNA (20-22 nt) que contém tanto o miRNA maduro quanto sua fita complementar, sendo essa última denominada miRNA*.

Antes do “*duplex*” imperfeito ser transportado para fora do núcleo, ele é metilado pela enzima metiltransferase HEN1 (*Hua-Enhancer 1*). O miRNA maduro é posteriormente incorporado ao complexo protéico denominado RISC (*RNA Induced Silencing Complex*) que contém a enzima *ARGONAUTE1* (AGO1), enquanto o miRNA* é geralmente degradado. A AGO1, “guiada” pelo miRNA maduro, cliva mRNAs específicos ou promove a repressão da tradução de genes-alvo (Lee; Feinbaum; Ambros, 1993; Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Reinhardt *et al.*, 2002). Recentemente, Laressergues *et al.* (2015) demonstraram que alguns pri-miRNAs de plantas possuem pequenas ORFs (*Open Read Frames*) capazes de codificar micropeptídeos, denominados miPEPs. Aparentemente, a principal função desses miPEPs seria de controlar

a transcrição de seus pri-miRNAs, gerando um *feedback* positivo de produção dos miRNAs (Figura 2).

Os microRNAs estão envolvidos em uma ampla faixa de processos relacionados ao desenvolvimento de órgãos vegetais. Desta forma, começou-se a correlacionar também o papel funcional desses pequenos RNAs com o desenvolvimento e a padronização dos tecidos constituintes do fruto (Todesco *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2014, Ripoll *et al.* 2015). Entretanto, há poucos exemplos demonstrando o papel funcional de vias reguladas por esses pequenos RNAs no processo de frutificação dos vegetais.

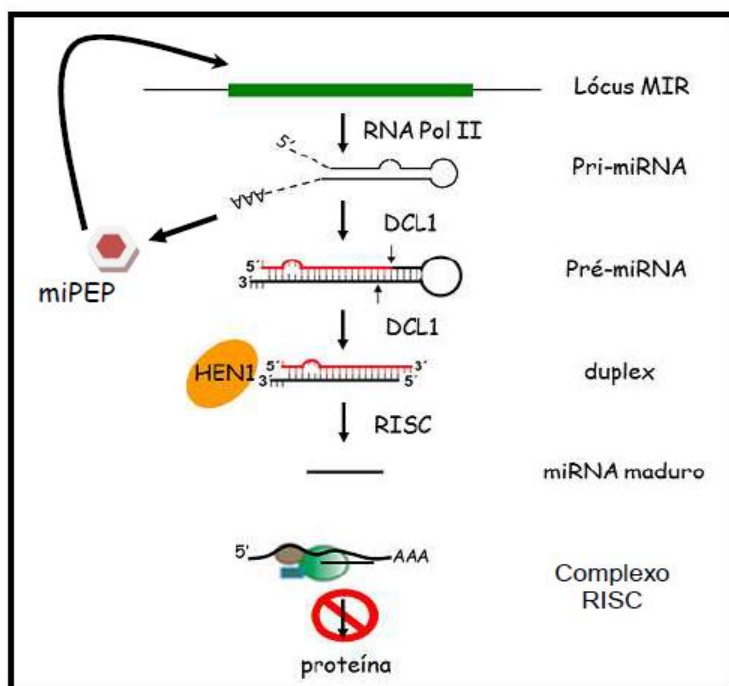


Figura 2: Modelo simplificado da biogênese e modo de ação de miRNAs em plantas. Após ser transcrito, o pri-miRNA é processado pelas enzimas DCL1 e outras enzimas, gerando o pré-miRNA. Em alguns casos, o pri-miRNA pode também gerar pequenos peptídeos (miPEPs) capazes de atuar positivamente na transcrição do locus *MIR*. O pré-miRNA, por sua vez, é processado pela enzima DCL1 em um “duplex” imperfeito de RNA, o qual é metilado pela enzima metiltransferase HEN1. O miRNA maduro é incorporado no complexo RISC, enquanto o miRNA* é geralmente degradado. Dentro do complexo RISC, o miRNA maduro é capaz de “guiar” a clivagem de específicos mRNAs ou regular a tradução de genes-alvo

Algumas vias reguladas por miRNAs e relacionadas à frutificação foram inicialmente caracterizadas em *arabidopsis*. Sabe-se, por exemplo, que o miR167 regula pós-transcricionalmente os fatores de transcrição ARF6 e ARF8 (Axtell e Bartel 2005, Wu *et al.*, 2006) e que essa via é importante para o desenvolvimento floral e, conseqüentemente, dos frutos (Nagpal *et al.*, 2005). Como exemplo, a superexpressão do gene *ARF6* resistente à regulação pelo

miR167 induz à esterilidade feminina, pois essa via é relevante para o correto desenvolvimento dos óvulos (Wu *et al.*, 2006). Em tomateiro, Liu *et al.* (2013) demonstraram que a superexpressão do miR167 leva à repressão dos seus respectivos alvos (*ARF6/8*) e consequentemente, essas linhagens transgênicas produzem flores com pétalas, estames e pistilos encurtados além de não apresentarem formação de frutos, mesmo possuindo pólen viável.

Recentemente, foi demonstrado em *arabidopsis* que o gene do tipo MADS-box *FRUITFULL* (que possui função importante na morfogênese do fruto) e os genes *ARF6/8* interagem fisicamente formando um complexo que induz a expressão do miR172. Este miRNA, por sua vez, reprime seus respectivos alvos (alguns membros da família gênica *APETALA-2*) e consequentemente altera o tamanho do fruto, uma vez que, quando a expressão do miR172 é reduzida, o crescimento do fruto é bloqueado devido à alteração no padrão de divisão e expansão celular (Ripoll *et al.*, 2015).

O miR164 também destaca-se como microRNA importante na regulação do desenvolvimento do ovário e consequentemente do fruto. A utilização de plantas mutantes de tomateiro (cv. M82) com ganho de função (mutantes *Gob-4d/+*) e perda de função (*gob-3*) para o fator de transcrição *GOBLET*, o qual é ortólogo ao gene *CUC2* de *arabidopsis* (Blein *et al.*, 2008; Berger *et al.*, 2009) e alvo do miR164, demonstrou que a via regulada por esse pequeno RNA é funcional ao longo do desenvolvimento do ovário, assim como do fruto. Nos mutantes *Gob-4d/+*, o gene *GOBLET* encontra-se livre da regulação do miR164 devido à presença de uma mutação pontual no sítio alvo deste microRNA. A expressão ectópica do gene *GOBLET* nas flores e ovários promove o desenvolvimento de frutos com carpelos extras no interior do gineceu. Já o mutante de perda de função para o gene *GOBLET* (*gob-3*) apresenta

morfologia do fruto modificada (Berger *et al.*, 2009) (Figura 3). Em *arabidopsis*, foi demonstrado que plantas transgênicas nas quais a atividade do miR164 é reprimida, ocorre o surgimento de tecidos ectópicos ao longo do desenvolvimento do fruto (Todesco *et al.*, 2010).



Figura 3. Frutos de tomateiro apresentando a via de regulação do miR164 alterada. ***gob-3***: mutante perda de função apresenta sua morfologia externa e interna alterada; ***Gob4d/+***: mutante ganho de função, apresenta o surgimento de carpelos ectópicos a partir do fruto Modificado a partir de: Berger *et al.* 2009.

Outro pequeno RNA de grande relevância na padronização do desenvolvimento dos tecidos do gineceu, ovário e consequentemente do fruto é o miR156 (Silva *et al.*, 2014). A superexpressão do *MIR156* em tomateiro gera fenótipo de indeterminação do fruto (Figura 4), sugerindo que a repressão de expressão de alguns alvos do miR156 pode alterar o padrão normal de expressão de genes associados ao desenvolvimento de novos órgãos, tais como os genes *KNOX-I* e *GOBLET*. A expressão acentuada destes genes leva a perda de identidade das células dos tecidos do gineceu e ovário, fazendo com que tecidos meristemáticos desenvolvam-se a partir do fruto. Além disso, análises anatômicas de flores das plantas de tomateiro superexpressando o miR156 demonstraram a presença de carpelos extras e parcialmente fusionados (Silva *et al.*, 2014).

Tais resultados indicam que a via miR156/ *SQUAMOSA promoter-binding protein-like* (*SPL*) também está envolvida com a formação e desenvolvimento inicial dos tecidos associados ao fruto. *SPL* é uma família de fatores de transcrição planta- específico, cujo membros são regulados pelos

microRNAs miR156 e miR157 (os quais são dois microRNAs que compartilham os mesmos alvos e estão envolvidos em diversos eventos do desenvolvimento vegetal (Salinas *et al.*, 2012; Schwab *et al.*, 2005).

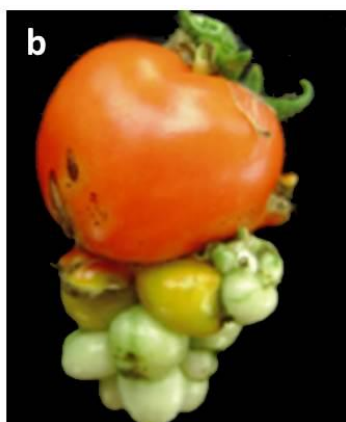
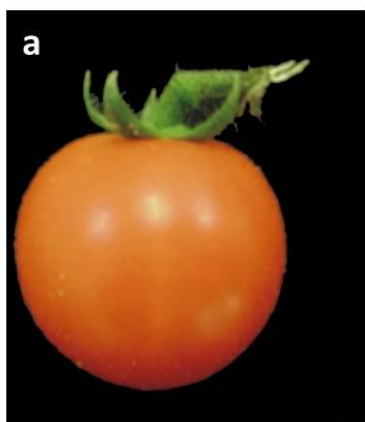


Figura 4. Comparação entre frutos de tomateiro Micro-Tom **(a)** e fenótipo dos frutos de tomateiro que superexpressam o miR156 **(b)** demonstrando o surgimento de estruturas adicionais (semelhantes a frutos) a partir do fruto já formado. Modificado a partir de Silva *et al.*, 2014.

Recentemente, foi demonstrado que a atividade regulatória exercida pelos miR157 e miR156 afeta respectivamente o amadurecimento e a maciez do fruto mesmo após o amadurecimento (Chen *et al.*, 2015). Tal descoberta mostra-se condizente com o papel regulatório que esses microRNAs exercem sobre o gene *CNR* (*COLORLESS NON RIPPENING*), o qual é membro da família gênica *SPL* e crucial no controle do amadurecimento de frutos de tomateiro (Manning *et al.*, 2006; Moxon *et al.*, 2008). Em conjunto, pode-se dizer que vias orquestradas por microRNAs podem exercer um papel extremamente relevante no desenvolvimento e padronização dos frutos, sendo importantes também para morfogênese dos mesmos.

2.5 – Aspectos gerais relacionados à geração de frutos sem sementes com ênfase em partenocarpia

Como citado anteriormente, a polinização e fertilização são processos críticos para a frutificação, uma vez que, após essas etapas, inicia-se a síntese de alguns hormônios que são primordiais para o estabelecimento do fruto. Na ausência da polinização, a tendência é que a flor, ainda que completamente

formada, venha a abortar (O'Neill e Nadeau, 1997). Porém, existem mecanismos que governam a formação de frutos sem sementes, dentre os quais se destaca a partenocarpia o fruto se desenvolve na ausência de fertilização, como é o caso de culturas como abacaxi, algumas cultivares de *Citrus* e banana. Além da partenocarpia, frutos sem sementes podem ser formados por estenospermia, onde a polinização e fertilização são necessárias, porém, o embrião não se desenvolve. O fruto da uva é um exemplo onde ocorre estenospermia (Bouquet *et al.*, 1996; Stout, 1936). Em ambos os casos, a planta deve ser capaz de sustentar o desenvolvimento do fruto na ausência de formação de sementes. Este processo envolve a ação dos hormônios auxina, giberelina e provavelmente etileno (Shinozaki *et al.*, 2015).

A partenocarpia é tida como uma característica de interesse econômico, uma vez que as sementes podem apresentar efeito negativo na palatabilidade do fruto (muitas vezes são amargas e de difícil digestão) (Varoquaux *et al.*, 2000). Adicionalmente, a presença de sementes pode dificultar o processamento do fruto para as diferentes formas de consumo. Do ponto de vista de produtividade, a partenocarpia se torna importante em regiões nas quais as condições climáticas são mais severas. Nestes ambientes, a produção de pólen e polinização pode ser comprometida, interrompendo assim, o processo de frutificação e conseqüentemente limitando o cultivo. Nesses casos, é interessante que o processo de frutificação ocorra independentemente da polinização e fertilização para que se consiga a otimização da produtividade (Stevens, 1986).

Mutações que induzem a formação de frutos partenocárpicos foram inicialmente identificadas em *arabidopsis*. No mutante *fwf* (*fruit without fertilization*), cuja mutação é no fator de transcrição ARF8, a frutificação

encontra-se independente da fertilização, gerando assim frutos partenocárpicos (Vivian-Smith *et al.*, 2001 e Goetz *et al.* 2006). Du *et al.* (2015) demonstraram que o ARF8 está envolvido com partenocarpia também em berinjela (*Solanum melongela*). Curiosamente, o *ARF8* sofre regulação pós-transcricional pelo miR167 (descrito anteriormente), sugerindo que vias orquestradas por esses pequenos RNAs podem estar associada a formação de frutos partenocárpicos. Adicionalmente, a atuação espaço-temporal da via miR167/*ARF6/8* ao longo do processo de frutificação mostra-se importante, uma vez que, plantas transgênicas de *arabidopsis* que superexpressam o *ARF6* insensível à regulação do miR167, também formam frutos sem sementes (Wu *et al.*, 2006).

2.6 Considerações genéticas e moleculares sobre partenocarpia em tomateiro

Em tomateiro, é possível encontrar a geração de frutos partenocárpicos em algumas cultivares específicas. Goetz *et al.* (2007) demonstraram que pelo menos vinte e três cultivares de tomateiro apresentam pré-disposição para formar frutos na ausência de polinização e fertilização. Como citado anteriormente, hormônios possuem papel fundamental nos processos de desenvolvimento e frutificação, assim, eles também podem ser facilmente correlacionados com geração de frutos partenocárpicos. Já foi demonstrado que a aplicação de auxina ou GA em ovários não polinizados de tomateiro tem por consequência a indução da formação de frutos partenocárpicos, demonstrando que a aplicação de hormônios em ovários em pré-antese podem substituir a polinização no processo de frutificação (Garcia Martinez e Hedden, 1997; Gorquet *et al.*, 2005; Srivastava e Handa, 2005, Serrani *et al.*, 2007).

Alguns mutantes naturais de tomateiro também apresentam predisposição para a geração de frutos partenocárpicos, sendo que essas mutações geralmente estão presentes em vias hormonais, ou em vias que interagem com hormônios. De fato, mutantes partenocárpicos passaram a contribuir de maneira significativa para o entendimento dos mecanismos genéticos e moleculares que governam o desenvolvimento de frutos, bem como no entendimento dos fatores genéticos e moleculares que regem a formação de frutos partenocárpicos.

O mutante natural de tomateiro *procera* (*pro*), por exemplo, apresenta mutação (presente no domínio GRAS, o qual é responsável pela interação da proteína com DNA) no gene que codifica a proteína DELLA (tomateiro só possui uma proteína DELLA). Como essa proteína atua na repressão de genes responsivos à GA, esse mutante apresenta resposta constitutiva a esse fito-hormônio. Consequentemente, o processo de frutificação se inicia antes da polinização, induzindo alta taxa de partenocarpia nesse mutante. Adicionalmente, esse mutante também apresenta fenótipo de heteroestilia, o que também contribui para a formação de frutos partenocárpicos (Martí *et al.*, 2007; Bassel *et al.*, 2008; Carrera *et al.*, 2012). Outros exemplos de mutações naturais que induzem partenocarpia relacionada ao hormônio GA são encontradas nos mutantes *pat*, *pat-2*, e *pat-3/pat-4*, nos quais foram verificados altos níveis de GA em ovários não polinizados, além da expressão alterada de genes de metabolismo de GA (Fos *et al.*, 2000, 2001; Olimpieri *et al.*, 2007).

Mutações induzidas também podem ser fontes de partenocarpia. O mutante *iaa9-3* (gerado por tratamento com Etil Metano Sulfonato – EMS) possui códon de parada prematuro no segundo éxon do gene *IAA9* (repressor dos genes que respondem a auxina). Esse mutante apresenta partenocarpia

devido à resposta constitutiva à auxina (Wang *et al.*, 2005; Saito *et al.*, 2011).

Recentemente, foi demonstrado que alguns mutantes para o receptor de etileno, também induzidos por EMS (*Sletr1-1* e *Sletr1-2*) (Okabe *et al.*, 2011), promoveram a formação de frutos partenocárpicos em tomateiro (Shinozaki *et al.*, 2015).

A utilização de linhagens transgênicas também passou a contribuir para o entendimento de mecanismos que atuam na formação de frutos partenocárpicos, principalmente correlacionando vias hormonais com vias moleculares. Plantas transgênicas de tomateiro nas quais a expressão do *ARF7* e *ARF9* é reduzida, apresentam fenótipo de partenocarpia (de Jong *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2005a). A superexpressão do *TIR1* (*Transport Inhibitor Response1*) que é um receptor de auxina, também induz a formação de frutos partenocárpicos (Ren *et al.*, 2011). A geração de plantas transgênicas de tomateiro que apresentam expressão de formas aberrantes do *ARF8* que, como já citado anteriormente, é alvo do miR167, também promove a formação de frutos com ausência de sementes (Goetz *et al.*, 2007). Em conjunto, pode-se dizer que a partenocarpia em tomateiro está intimamente ligada a vias moleculares e hormonais, entretanto, informações correlacionando via reguladas por microRNAs e partenocarpia ainda são incipientes.

2.7 - Considerações gerais sobre os genes *GAMYB-like* e sua regulação pelo miR159 ao longo do desenvolvimento vegetal

Os genes *GAMYB* ou *GAMYB-like* são fatores de transcrição implicados em processos de transdução de sinal de GA (Woodger *et al.*, 2003). O *GAMYB* foi primeiramente descrito em células de aleurona de cereal, nas quais sua expressão é induzida por GA. Essa indução é devido

a presença de sequências que conferem a resposta à GA, denominadas elementos de resposta à GA (GAREs) em seu promotor (Gubler *et al.*, 1995). Posteriormente a sua descrição, tem-se estudado o papel do *GAMYB* em uma série de processos fisiológicos de extrema importância, dentre os quais destaca-se sua atuação na indução da expressão de genes codificantes de enzimas hidrolíticas necessárias para a germinação (Gubler *et al.*, 1997) e no desenvolvimento do endosperma (Diaz *et al.*, 2002).

Também foi demonstrado que o *GAMYB* é expresso nas anteras de cereais, e que sua expressão é acentuada em células do tapete das anteras (Murray *et al.*, 2003; Aya *et al.*, 2009). Interessantemente, foi demonstrado também o envolvimento deste fator de transcrição no processo de apoptose de células do tapete de anteras e em células de aleurona (Tsuji *et al.*, 2006; Aya *et al.*, 2009). Kaneko *et al.* (2004) descreveram que mutantes de arroz (*Oryza sativa*) com perda de função do gene *OsGAMYB* possuem defeitos no alongamento de entrenós e no desenvolvimento das anteras e do pólen. Desta forma, fica claro que o *GAMYB* possui múltiplos papéis no desenvolvimento vegetal (Gocal *et al.*, 2001), o que se deve também à interação deste com outros genes que são regulados por GA. Um exemplo interessante dessa interação ocorre com as proteínas repressoras do tipo DELLA, as quais são ativas na ausência de GA levando conseqüentemente ao bloqueio de genes induzidos por esse fitormônio. Sendo assim, a atividade do *GAMYB* é reprimida por essa proteína em tecidos e estágios de desenvolvimento específicos (Gubler *et al.*, 2002). Recentemente foi demonstrado que a atividade do *GAMYB* é essencial para o amadurecimento do receptáculo do morango (*Fragaria x ananassa*), uma vez

que a redução da expressão desse fator de transcrição impossibilita o amadurecimento do mesmo (Vallarino *et al.*, 2015).

Alguns genes *GAMYB-like* são regulados pós-transcricionalmente pelo microRNA miR159 (Schwab *et al.*, 2005; Tsuji *et al.*, 2006). A superexpressão do gene *MIR159a* em *arabidopsis* promove atraso no florescimento quando comparado com plantas de *arabidopsis* não transgênicas. Foi evidenciado que, devido à regulação realizada pelo miR159 nos transcritos do gene *MYB33* (*GAMYB-like*), ocorre uma redução na expressão do gene *LEAFY* (crucial para a identidade de meristema floral), o que resulta em florescimento tardio (Achard *et al.*, 2004; Blazquez e Weigel 2000; Gocal *et al.*, 2001). O fenótipo de atraso no florescimento também foi demonstrado em linhagens de plantas transgênicas de gloxínia (*Sinningia speciosa*) com expressão ectópica do miR159 (Li *et al.*, 2013).

Alonso-Pereal *et al.* (2010) demonstraram que o miR159 reprime a expressão de genes conservados do tipo *GAMYB-like*, implicados na sinalização de GA em anteras e sementes. Reyes e Chua (2007) mostraram, em *arabidopsis*, que o ácido abscísico (ABA) induz o acúmulo dos transcritos do miR159 para regular a expressão de genes *GAMYB-like* na germinação de sementes sob condições de estresse hídrico. Foi demonstrado também que a via miR159/*GAMYB-like* também é ativa no receptáculo floral do morango (Csukasi *et al.*, 2012). O padrão de expressão do miR159 em gemas axilares já foi demonstrado por experimentos de hibridização *in situ*, sugerindo que este possui um papel nos processos de diferenciação destes tecidos (Ortiz-Morea *et al.*, 2013).

Com a utilização e análise do mutante *7B-1* (mutante de tomateiro macho estéril que é dependente de foto-período), foi sugerido que a via

miR159/*GAMYB-like* possa estar relacionada com o desenvolvimento das anteras (Omidvar *et al.*, 2015). Adicionalmente, foi demonstrado que o miR159 e seus alvos *GAMYB1* e 2 são expressos ao longo do desenvolvimento de fruto (Gong e Bewley, 2008, Mohorianu *et al.*, 2011; Lopez-Gollomon *et al.*, 2012; Karlova *et al.*, 2013), o que levanta a questão sobre participação da via do miR159 durante as etapas de desenvolvimento e formação do fruto e se ela atua interagindo com outros fatores moleculares e fisiológicos durante as diferentes etapas de frutificação.

Portanto, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar funcionalmente a via regulada pelo miR159 durante o processo de frutificação em tomateiro (cv. Micro-Tom), e também avaliar a possível correlação desta via (miR159/*GAMYB-like*) com outras vias moleculares e vias hormonais durante as etapas de desenvolvimento do ovário e do fruto.

A metodologia, bem como os resultados e discussão serão apresentados neste documento no formato de artigo científico.

**microRNA159-targeted *SlyGAMYB1* transcription factor regulates fruit set
in tomato**

Eder Marques da Silva^{1,2}, Fábio Tebaldi S. Nogueira^{1,2}

*¹Instituto de Biociências, State University of Sao Paulo, Botucatu, Sao Paulo
18618–970, Brazil,*

*²Laboratory of Molecular Genetics of Plant Development, Department of
Biological Sciences, Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, University
of Sao Paulo, 13418–900 Piracicaba, Sao Paulo, Brazil.*

microRNA159-targeted *SlyGAMYB1* transcription factor regulates fruit set in tomato

Eder Marques da Silva^{1,2}, Fábio Tebaldi S. Nogueira^{1,2}

¹*Instituto de Biociências, State University of Sao Paulo, Botucatu, Sao Paulo 18618–970, Brazil,*

²*Laboratory of Molecular Genetics of Plant Development, Department of Biological Sciences, Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', University of Sao Paulo, 13418–900 Piracicaba, Sao Paulo, Brazil.*

Abstract

Fruit set, defined as the shift from the quiescent ovary to a fast-growing young fruit, is a key process for fruit production in flowering plants. It has been shown that hormones act in parallel with transcription factors during fruit set. Interestingly, some of these transcription factors are post-transcriptionally regulated by microRNAs (miRNAs). Although miRNAs are important regulatory elements of gene expression, microRNA-regulated genetic pathways associated with tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit set remain poorly exploited. Here, we investigated the functional role of miRNA159/*SlyGAMYB-like* in tomato ovary development and fruit set. miR159-targeted *GAMYB-like* genes were dynamically expressed in developing flowers, ovaries and fruit tissues. Transgenic tomato (cv. Micro-Tom) plants over-expressing the *SlyMIR159* (OE-159 plants) exhibited fruit set earlier than control plants. Strikingly, all transgenic lines presented parthenocarpic fruits. Such developmental modification may be a result of the repression of *SlyGAMYB1* in ovaries. As a consequence of this repression, miR167 node (miR167/*SlyARF8*) was mis-regulated in OE-159 pre-anthesis ovaries. In addition, we observed that the levels of auxin, gibberellin (GA) and abscisic acid (ABA) in pre-anthesis ovaries of several transgenic lines over-expressing the *SlyMIR159* were similar to those of the control. Moreover, our results suggested that auxin and GA may act repressing the miR159 node during fruit set initiation, in order to release the miR167-targeted *SlyARF8A* expression during fruit set. Importantly, our data show how different microRNA nodes (miR159 and miR167) integrate with hormone signalling into a regulatory circuit to coordinate successive steps along ovary and fruit development.

Key words: ovary, parthenocarpy, *Solanum lycopersicum*, gibberellin, Auxin

Introduction

Fruit set, defined as the shift from the quiescent ovary to a fast-growing young fruit, is a key process for fruit production in flowering plants (Jong *et al.*, 2009). Signalling processes triggered by pollination and fertilization are usually necessary to initiate seed and fruit development (Gillaspy *et al.*, 1993, Raghavan, 2003). Subsequent fruit growth depends, in part, on the coordinated action of growth substances produced in the ovary and seeds after pollination and/or fertilization (Gillaspy *et al.*, 1993; Garcia-Martinez and Hedden, 1997). Various phytohormones, such as auxin, cytokinin (CK), and gibberellins (GAs), have been implicated in seed and fruit growth and development (Nitsch, 1960; Garcia- Martinez and Hedden, 1997).

The effect of pollination and fertilization in the induction of fruit grown can be mimicked by hormones application (Vivian-Smith and Koltunow, 1999; Serrani *et al.*, 2007). However, fruits generated without pollination and fertilization are parthenocarpic (seedless) fruits. Gustafson (1936) performed the pioneer experiment demonstrating that the treatment of stigmas from several species including tomato (*Solanum lycopersicum* L.) with substances similar to auxin induced fruit set, but all fruits developed into parthenocarpic fruits. Later, Wittwer *et al.* (1957) demonstrated that other phytohormone, GA, can induce parthenocarpic fruit set. In natural parthenocarpic tomato varieties, these hormones probably reach a threshold amount before pollination, and then those plants are able to produce seedless fruits (Gustafson, 1939; Nitsch *et al.*, 1960; Mapelli *et al.*, 1978, 1979).

It is already known that several natural tomato mutants with parthenocarpy usually show altered expression of genes that are involved in

hormone (e.g. auxin or GA) biosynthesis and/or signalling (Pandolfini *et al.*, 2007). Studies on these mutants have been useful to clarify physiological and molecular characteristics of the fruit set process. For instance, the *entire* mutant shows parthenocarpy due to impairment of the *SlyIAA9* protein function. *SlyIAA9* belongs to *Aux/IAA* transcription factor gene family and mediates plant responses to auxin (Wang *et al.* 2005; Zhang *et al.*, 2007). Moreover, *pat*, *pat2* and *pat-3/pat-4* are natural tomato parthenocarpic mutants and their phenotypes are associated with increases levels of active GA in non-pollinated ovary due to mis-expression of GA metabolism genes (Fos *et al.*, 2000; Olimpieri *et al.*, 2007). The *procera* (*pro*) mutant has a point mutation at the GRAS domain in the unique tomato DELLA protein-coding gene, leading to a constitutive GA response in *pro* plants. As a result, this mutant presents a high rate of parthenocarpic fruits (Bassel *et al.*, 2008; Jasinski *et al.*, 2008).

Parthenocarpy is an interesting feature not only from a developmental perspective, but also as a desirable feature from the agricultural point of view. Given that fruit set initiation depends on pollination and fertilization and both can be affected by environmental conditions (e.g. temperature) (Stevens 1986), a reduced dependency on fertilization might represent an improvement in fruit set and production (Stevens 1986, Varoquaux *et al.*, 2000; Jong *et al.*, 2008). Nevertheless, this requires more knowledge regarding molecular regulatory mechanisms implicated in fruit set and parthenocarpy.

It had been already shown that hormones act in parallel with transcription factors during fruit set, thus, emphasizing the importance of the control of these genes along fruit development (Ma *et al.*, 2014). Interestingly, some transcription factors associated with hormone responses are post-transcriptionally regulated by microRNAs (miRNAs) (Liu *et al.*, 2014). MiRNAs

are a group of small non-coding RNAs (21-24 nt) that act by post-transcriptionally regulating genes in plants and animals (Lee *et al.*, 2003, Lagos-Quintana *et al.*, 2001). These complex gene regulatory networks controlled by microRNAs are highly important for several steps of plant development, including those involved in the patterning of specific tissues and organs (Telfer and Poethig 1998; Jacobsen *et al.*, 1999; Lu and Fedoroff 2000; Silva *et al.*, 2014)

Some microRNA-regulated pathways are tightly associated with fruit development. For example, in the gain-of-function tomato mutant *GOBLET* (*Gob-4d*), which has a point mutation in a *NAC* gene that prevents its miR164 post-transcriptional regulation, produces fruits with extra carpels and fewer seeds (Berger *et al.*, 2009). On the other hand, transgenic tomato lines overexpressing *MIR167* are not capable of generating fruits. This microRNA has as targets the transcription factors *Auxin Response Factors* 6 and 8 (*ARF6/8*), which are involved in auxin signalling during fruit set. These *ARFs* are critical for fruit development (Liu *et al.*, 2014). Furthermore, it was demonstrated that microRNA156-targeted *SPL/SBP* box transcription factors regulate tomato ovary morphology and consequently fruit development (Silva *et al.*, 2014).

Together, these works show that we are beginning to understand the functional roles of microRNA-controlled pathways that operate during ovary development and suggest that possibly other conserved microRNA regulatory circuits might be associated with fruit initiation. Furthermore, it raises the question, whether these pathways could not be implicated with advanced stages of fruit development, given that the knowledge linking microRNAs and fruit set remains poorly exploited.

MiR159 is highly conserved in plants and regulates negatively the *GAMYB-like* transcription factors (Rhoades and Bartel 2002). *GAMYB-like* genes were firstly identified in barley aleurone cells and have been shown to be up-regulated by GA (Gubler *et al.*, 1995). In *Arabidopsis*, miR159-targeted *GAMYB-like* genes are important for the formation of flowers whorls, and are embedded into other microRNA nodes (Alonso-Pereal *et al.*, 2010; Rubio-Somoza and Weigel 2013). Thus far, it has been identified two *GAMYB-like* genes (*SlyGAMYB1* and -2) in tomato (Gong and Bewley 2008) and both were shown to be regulated by the miR159 (Karlova *et al.*, 2013). Nevertheless, there is no information linking the miR159-targeted *GAMYB-like* transcription factors with any step of vegetative and reproductive development.

In this work, we show that miR159-targeted *SlyGAMYB-like* genes are important during ovary development and mainly fruit set. We assessed the spatial-temporal expression of miR159 and *SlyGAMYB1* during flower and fruit development of the tomato cultivar Micro-Tom (MT). The results showed that the miR159 node is expressed during early stages of flower development, including pre-anthesis ovaries. To obtain insights about the possible role(s) of miR159-targeted *SlyGAMYB-like* genes, we initially identified *SlyMIR159* precursor and generated several transgenic lines of tomato MT overexpressing the *SlyMIR159* precursor (hereafter referred to as OE-159 plants). Over-expression of *SlyMIR159* leads to reduction of expression of miR159-targeted *SlyGAMYB1* and -2 in pre-anthesis ovaries. Interestingly, over-expression of *SlyMIR159* induced earlier initiation of fruit grown when compared with MT and control plants. Strikingly, all OE-159 lines displayed parthenocarpic fruits. Such developmental modifications may have occurred as a consequence of the observed mis-regulation of the miR167/*SlyARF8* pathway. Interestingly, we

observed that the levels of auxin, GA and ABA in pre-anthesis ovaries of OE-159 lines were similar to those of control plants. Thus, we evaluated the expression of miR159 and its targets in transgenic line and mutant displaying parthenocarpic fruits due to high levels de GAs and constitutive response to this hormone, respectively. The results suggested that GA might act upstream of miR159 pathway during fruit set process. Additionally, we analysed transcript levels of the miR159 and miR167 nodes in response to pollination and fertilization. These experiments showed that after pollination, the *SlyGAMYB1* expression is reduced, probably to reduce the expression of the miR167 and release *SlyARF8A* expression for fruit set initiation. Altogether, these results unveiled new functions of the miR159 node and showed that a coordinated molecular circuit involving miRNA nodes and hormones is crucial to control tomato fruit set.

Material and Methods

Plant Material and Growth Conditions

Tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) was used as the wild-type, and transgenic plants were generated in the MT background. Tomato cv. M82 was also used in the pollination experiments. The transgenic line overexpressing *GIBBERELLIN 20-OXIDASE* cv MT (García-Hurtado *et al.*, 2012) was kindly provided by professor Isabel Lopez from UPV (Universitat Politècnica de València). The *procera* mutant in MT background was kindly provided by professor Lazaro Peres (ESALq/USP, Brazil). Tomato MT plants were grown as described by Lombardi-Crestana *et al.* (2012). Ovary and fruit tissues were collected based on flower developmental stages (Brukmihin *et al.*, 2003).

Identification of *SlyMIR159* precursor in tomato genome

To search potential miR159 precursors in Tomato genome (Tomato Genome Consortium, 2012), the mature miR159 sequences from *Arabidopsis* (miR159a,b and c) were retrieved from miRbase Database (Release 21.; <http://www.mirbase.org>) and used as a reference set. BLAST search analyses with the three AtmiR159 mature sequences were done using the Solanaceae Genome Network Database (<http://solgenomics.net/>) according to parameters described by Zanca *et al.* (2010). After identifying the potential *SlyMIR159* precursor, its secondary structure was predicted by the mFOLD software (<http://unafold.rna.albany.edu>).

Identification of potential GAMYB binding sites in miR167 precursors

To search potential *SlyGAMYB1* binding sites in upstream region of the miR167 precursors, we extracted upstream sequences from tomato genome

(Tomato Genome Consortium, 2012) and performed an analysis as described in Rubio-Somoza and Weigel 2013.

Generation of Transgenic Tomato cv. MT Plants Over-expressing the *SlyMIR159* Precursor

A 940 bp fragment encompassing the *SlyMIR159* precursor was amplified from tomato cv. MT genomic DNA. The PCR product was cloned into pENTR/D Topo (Invitrogen) and sequenced. The confirmed *SlyMIR159* precursor was recombined into the binary vector pk7WG2.0 using Gateway system (according with fabricant's instructions). The binary vector carrying the *SlyMIR159* was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404. The empty vector pk7WG2.0 was also used in order to generate transgenic control plants (hereafter refer to as pk2 plants). Genetic transformation of tomato cv. MT plants was performed as described by Pino *et al.* (2010). To confirm the fruit phenotype observed in plants over-expressing the *SlyMIR159* (OE-159 plants), genetic transformation was performed three times, including the control plants carrying the empty vector (pk2 plants). In total, fifty-eight independent OE-159 lines and twenty four lines carrying the empty vector (pk2 plants) were generated in this work.

***In Situ* Hybridization**

Developing pre-anthesis ovaries from MT plants were used for *in situ* hybridization as described by Javelle and Timmermans (2012). Locked nucleic acid (LNA) probes with sequences complementary to miR159 (5'-TAGAGCTCCCTTCAATCCAAA) and a negative control (scrambled miR, 5'-GTGTAACACGTCTATACGCCCA-3') were synthesized by Exiqon (<http://www.exiqon.com/>), and digoxigenin-labeled using a DIG oligonucleotide 3'end labeling kit (Roche Applied Science, <https://www.roche-applied->

science.com). Ten picomoles of each probe were used for each slide. Probe for *SlyGAMYB1* (Soly11g072060) was used as described by Javelle and Timmermans (2012) at 0.5 ng $\mu\text{L}^{-1}\cdot\text{kb}^{-1}$. Hybridization and washing steps were performed at 55°C as described by Javelle and Timmermans (2012).

RNA extraction and Stem-loop pulsed quantitative RT–PCR

Total RNA was extracted from developing ovaries, flower bud and young fruits using Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, and treated with DNase I (Invitrogen). DNase I-treated RNA (2.0 μg) was reverse-transcribed to generate first-strand cDNA, as described previously (Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007).

First-strand cDNA was transcribed as described in Varkonyi- Gasic *et al.* (2007). SYBR Green PCR was performed using a Step-OnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems, www.appliedbiosystems.com). Briefly, 5 μl of 1:80 v/v cDNA dilutions were added to 12.5 μl of Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen). The tomato *TUBULIN* (Soly04g081490) and *SAND* (Soly03g115810) genes were tested and used as internal controls (Mounet *et al.*, 2009, Exposito-Rodrigues 2008). The PCR products for each primer set was subjected to melt-curve analysis, confirming the presence of only one peak on thermal dissociation generated by the thermal denaturing protocol. Three technical replicates were analyzed for each of three biological samples (each comprising at least four ovaries), together with template-free reactions as negative controls. The threshold cycle (CT) was determined automatically by the instrument, and fold changes for each gene was calculated using the equation $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

Auxin application

Flower emasculation was carried out two days before anthesis (day -2) to prevent self-pollination. Application was performed according to Serrani *et al.*, (2007). Treatments and the control (Mock) consisted of forty ovaries from 20 MT plants.

Determination of parthenocarpic capacity

To determine parthenocarpic capacity, ten flowers per plant were selected from five independent transgenic lines of OE-159 and 10 flowers from MT and pk2 flowers. These flowers were emasculated 2 days before anthesis to prevent self-pollination and the fruit set capacity was evaluated.

Pollination experiments

Ten flowers per plant were selected from five independent transgenic lines of OE-159. These flowers were emasculated 2 days before anthesis to prevent self-pollination and were pollinated with pollen from tomato cultivars MT and M82. In total, 30 flowers were pollinated with MT pollen and ten flowers were fertilized with M82 pollen.

Hormones quantification

Pre-anthesis ovaries from each transgenic line were used. Material was frozen immediately in liquid N₂ before storage at -70°C, until further analysis. The extraction procedure was performed as following. Aliquots of 100 mg fresh weight was homogenized and suspended in 80% methanol-1% acetic acid, containing deuterated-labeled hormones as internal standards, mixed by shaking during one hour at 4°C and kept at -20°C overnight. The extract was passed through an Oasis HLB (reverse phase) cartridge as described in Seo *et al* (2011). The dried eluate was dissolved in 5% acetonitrile-1% acetic acid, and the hormones separated by UPLC chromatography (Accucore RP-MS column 2.6 µm, 50x2.1 mm, Thermo Scientific) with a 5 to 50% acetonitrile gradient

containing 0.05% acetic acid, at 400 μ L/min over 14 min. The concentrations in the extracts was analyzed with a Q-Exactive mass spectrometer (Orbitrap detector; ThermoFisher Scientific) by targeted SIM using embedded calibration curves and the Xcalibur 2.2 SP1 build 48 and TraceFinder programs.

Statistical methods

Statistical treatments were made in the hormone quantification data using the Assistat program release 7.7 for Windows. Data were analyzed by using Student's t-Test and one-way ANOVA for $p < 0.05$.

Histological Analysis

Samples of developing ovaries were fixed in Karnovsky solution (Karnovsky, 1965), dehydrated in an increasing ethanol series (10–100%), and subsequently infiltrated with synthetic resin using a Histoiresin embedding kit (Leica, www.leica-microsystems.com), according to the manufacturer's instructions. Tissue sections were obtained using a rotary microtome (Leica) and stained with toluidine blue 0.05% (Sakai, 1973). Permanent slides were mounted with synthetic resin (Entellan^R, Merck, www.merck.com).

Results and Discussion

Expression Patterns of *SlyGAMYB-like* Genes and miR159 During Flower and Ovary Development

Although it has been shown that miR159 node regulates some aspects of plant development (Gubler *et al.*, 1997; Murray *et al.*, 2003; Aya *et al.*, 2009; Achard *et al.*, 2004; Blazquez and Weigel 2000; Gocal *et al.*, 2001), the possible role (s) of miR159 pathway on fruit development and more specifically on fruit set remains poorly understood. To initially addressing the possible functions of miR159 and miR159-targeted *SlyGAMYB-like* genes on tomato fruit set, we evaluated the expression profiles of miR159, *SlyGAMYB1* and

SlyGAMYB2 during ovary and fruit development. They were expressed throughout ovary development and also in fruits, though at variable levels (Figure 1). For instance, miR159 accumulated at high levels in pre-anthesis ovaries, while it was barely detected in post-anthesis ovaries and fruits at breaker stage (Figure 1a). *SlyGAMYB1* was steadily expressed in flower buds, ovaries and fruits, though *SlyGAMYB2* transcripts seemed to accumulated at higher levels in flower buds when comparing with developing ovaries and fruits at breaker stage (Figure 1b, c).

Given that miR159 and targets were expressed in flower buds and developing ovaries (Figure 1a-c), we decided to evaluate in greater detail their spatial/temporal expression in early stages of flower development by *in situ* hybridization. miR159 transcripts were localized in developing carpel, stamen primordia, pollen mother cell tissues and ovule primordia (Figure 1d). Similarly, *SlyGAMYB1* mRNA was detected, though at low levels, in developing carpel and pollen mother cell tissues of young buds (Figure 1e). At later stages of flower development, miR159 transcripts were localized in developing ovules, stigma and pollen grains (Figure 1g). Curiously, at similar developmental stages, *SlyGAMYB1* was detected specifically in pollen grains and developing ovules (Figure 1h), suggesting a possible role of this transcription factor during the development of germ cells. No signal from the control probe was detected (Figure 1f, i), which confirms the specificity of the observed expression patterns. These results complement previous report (Mohorianu *et al.*, 2011) which showed a dynamic miR159 expression pattern during early fruit development. Taken together, our expression analyses in developing ovaries suggested that the miR159 node may have functional role(s) in ovary and ovule development and consequently on tomato fruit set.

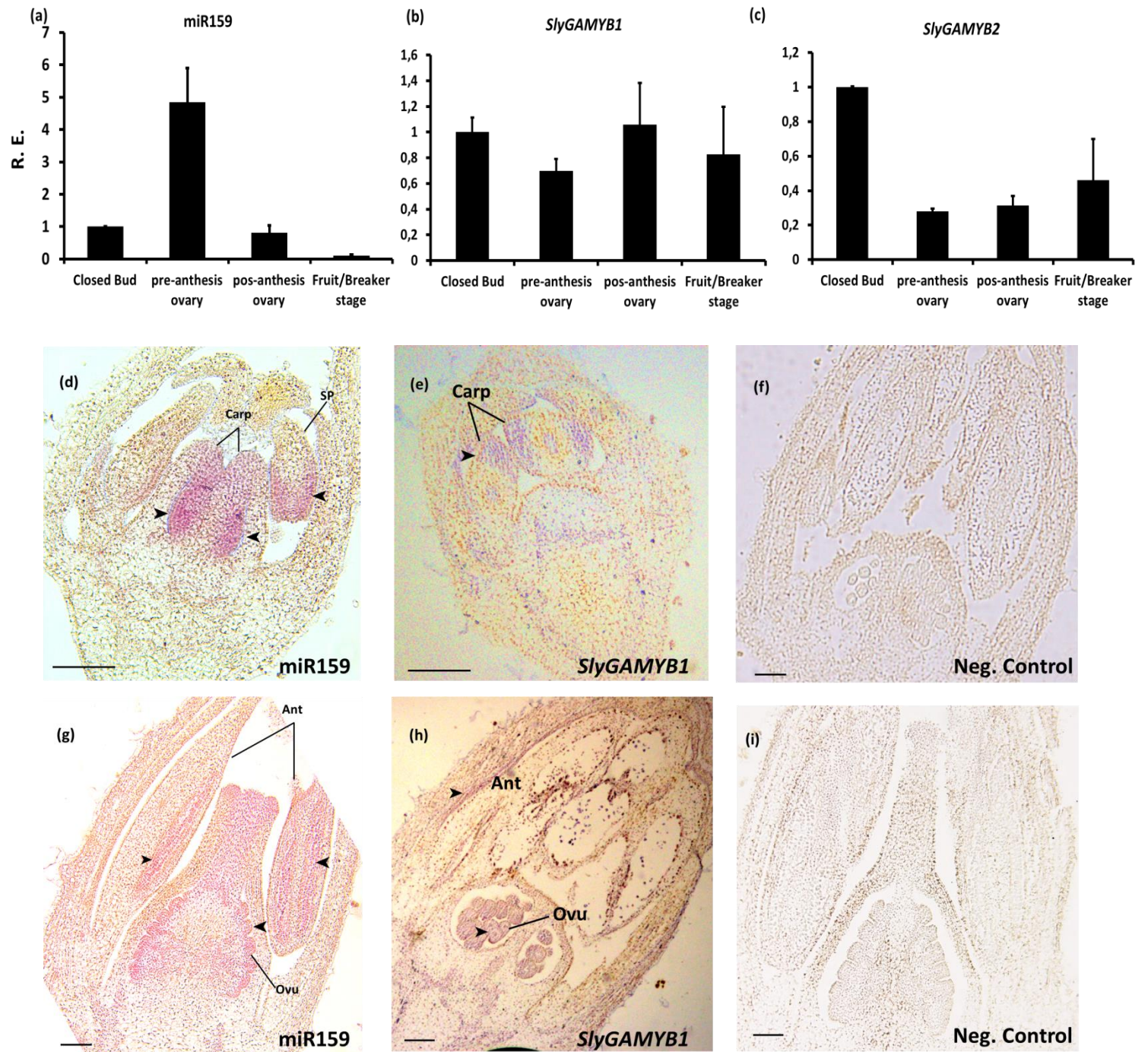


Figure 1. Expression patterns miR159 (a) and *SlyGAMYB*-like genes (b, c) in flower buds, developing ovaries and fruit at breaker stage. Quantitative RT-qPCR experiments used tissues from closed floral buds as the reference sample. Error bars indicate standard deviation of three biological samples. **RE**, relative expression. (d) A 3'-labeled LNA-modified oligonucleotide detecting miR159 was hybridized with longitudinal sections of MT flowers at developmental stage 2-6 (e) A digoxigenin-labeled probe detecting *SlyGAMYB1* transcripts was hybridized with longitudinal sections of MT flowers at developmental stage 2-6 (g) A 3'-labeled LNA-modified oligonucleotide detecting miR159 was hybridized with longitudinal sections

of MT flowers at developmental stage 6-10 **(h)** A digoxigenin-labeled probe detecting *SlyGAMYB1* transcripts was hybridized with longitudinal sections of MT flowers at developmental stage 6-10. Purple staining shows probe localization (arrowheads). **(f, i)** Negative controls. **Scale bars** = 100 μ m (c,d) and 20 μ m (e,f,g and h). **Carp**, carpel; **Ant**, anther; **Ovu**, ovule; **Sp**, Stamen primordia . Flower were collected based on flower developmental stages described in Brukhin et al. 2003.

Over-expression of *SlyMIR159* Alters Tomato Flower Pattern and induces Parthenocarpy

MiR159 family is highly conserved in land plants. *Arabidopsis* has three miR159 precursors, and each of them generates a different mature sequence (miR159a, -b and -c) (Rhoades and Bartel 2006). To identify miR159 precursors in tomato, we searched in the tomato genome using *Arabidopsis* miR159 mature sequences as query and BLAST algorithm allowing no mismatches (Schwab et al. 2005; Zanca et al., 2010). We found only one precursor in tomato, which is the same as deposited in miRbase version 21 (<http://www.mirbase.org>). This precursor shows the potential to produce a 21-nt mature sequence identical to *Arabidopsis* miR159a (Figure 2a) and was named *SlyMIR159*.

The presence of several EST transcripts matching *SlyMIR159* indicated that this tomato precursor is transcribed (data not shown). Next, we aligned the precursor to tomato genome and identified the coordinates of this precursor in the chromosome 3 (Figure 2b). Our data is well supported by the fact that in the same coordinates that we mapped the miR159 precursor was already described a cluster of microRNAs genes (The tomato genome consortium 2012).

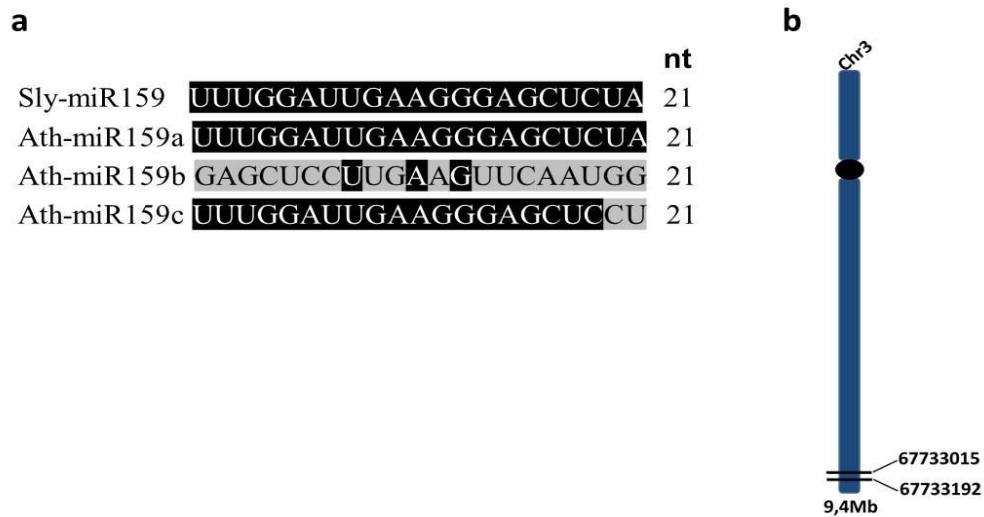


Figure 2. (a) Alignment of miR159 mature sequence from tomato (Sly) and *Arabidopsis* (Ath). **b:** Scheme mapping the *SlyMIR159* in the chromosome 3 (Chr3) from tomato (tomato genome version SL2.40). The numbers (67733015-67733192) represents the coordinates in the chromosome 3. Mb: Megabases

Over-expression of *AthMIR159a* reduces the expression of *AthMYB33* and *AthMYB65* and as a consequence, plants display delayed flowering. In addition, the *AthMIR159a* plants were associated with a progressive increase in the size of anthers, and with a darkening of anther colour (Palatnik *et al.*, 2003; Achard *et al.*, 2004). To investigate the functional role(s) of miR159-targeted *SlyGAMYB-like* genes during ovary development and fruit set, we generated several independent transgenic lines of tomato cv. MT overexpressing *SlyMIR159* under control of the CaMV35S promoter (hereafter referred to as OE-159). To evaluate flower and fruit phenotypes in plants at T0 generation, we generated empty-vector control plants as well (Figure 3; see Material and Methods).

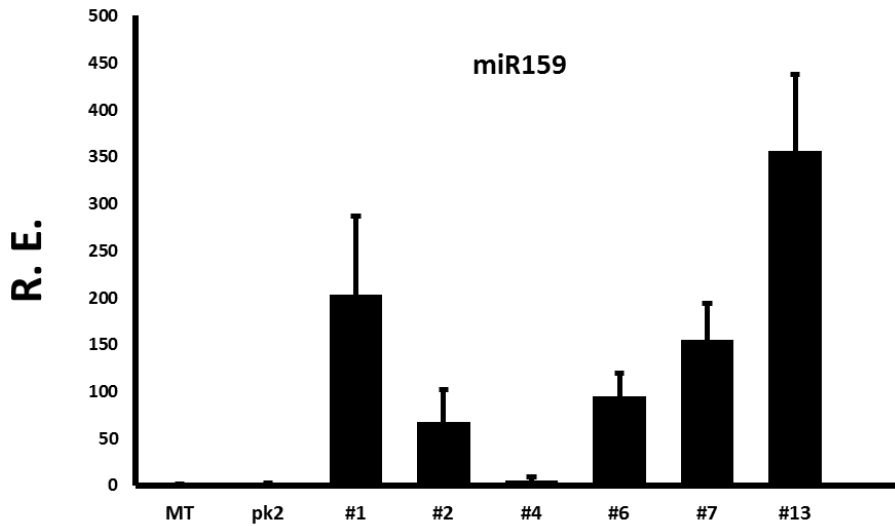


Figure 3. Quantitative RT–PCR to detect mature miR159 in pre-anthesis ovaries tissues from different transgenic lines over-expressing *SlyMIR159* with MT as the reference sample. Error bars indicate standard deviation of three biological samples. **MT:** Micro-Tom, **RE:** relative expression. # OE-159 transgenic line. **pk2:** Transgenic plant genetically transformed with empty binary vector pk7WG2.

In agreement with previous reports (Palatnik *et al.*, 2003; Achard *et al.*, 2004), OE-159 plants showed reduced expression of miR159-targeted *SlyGAMYB1* and 2 genes (Figure 4a). Similarly to the over-expression of *MIR159a* in *Arabidopsis*, tomato OE-159 plants displayed dark anthers (Figure 4f and g) and little pollen release when comparing with MT and pk2 plants (data not shown). Interestingly, tomato OE-159 plants displayed earlier fruit set when comparing with the pk2 (Figure 5) and MT plants (data not shown). Importantly, these phenotypes were not previously associated with the miR159 node (*miR159/GAMYB-like*) and suggest a link between miR159-targeted *SlyGAMYB-like* genes and tomato fruit set.

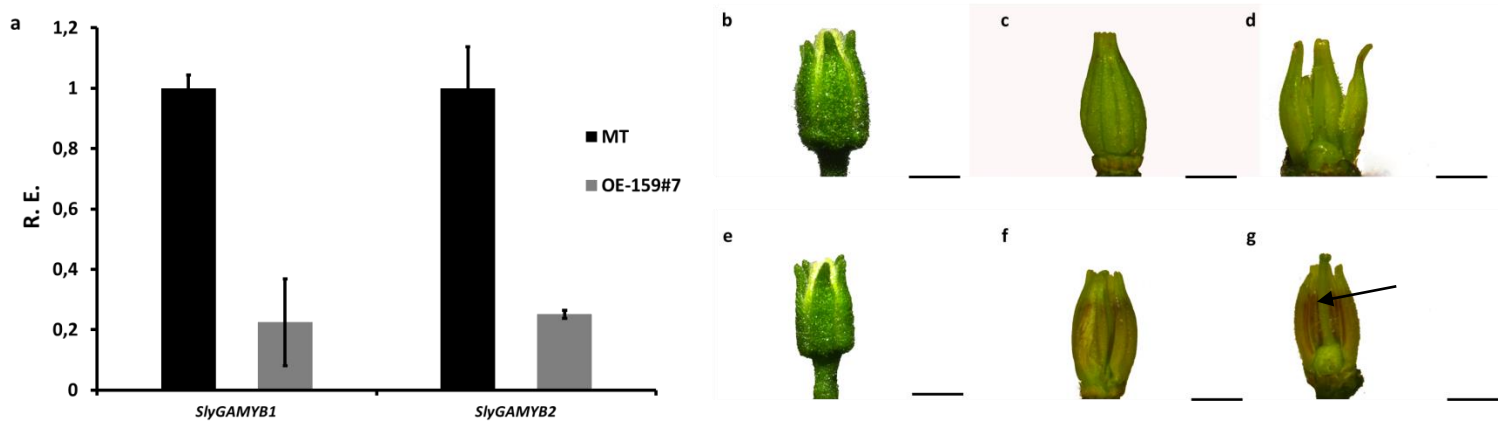


Figure 4. (a) *SlyGAMYB1* and 2 expression patterns in pre-anthesis ovaries from OE-159#7 . Error bars indicate standard deviation of three biological samples. **RE**, relative expression. **(b,c, d)** pk2 anthers. **(e,f, g)** OE-159#7 anthers gradually darkened (arrows) in the pre-anthesis stage . **Scale bars:** 200 μ m. #: transgenic line used.

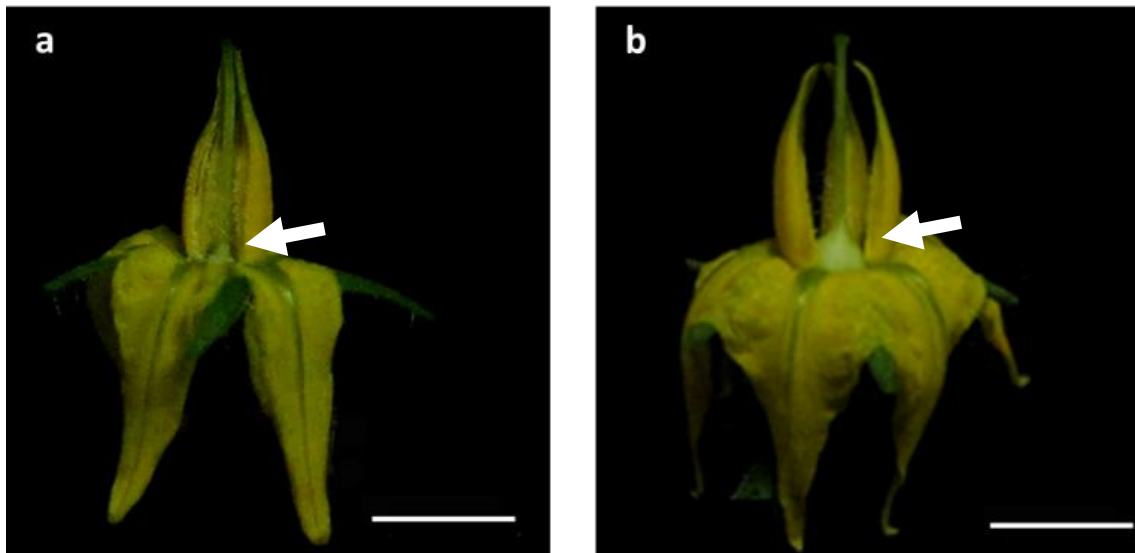


Figure 5. Flowers at anthesis of control pk2 **(a)** and OE-159 plants**(b)** showing that the ovary (arrows) is larger in OE-159 plants at the same stage of development. **Scale bars:** 500 mm.

Over-expression of *SlyMIR159* Induces parthenocarpy in tomato

Although all OE-159 lines had fruits displaying normal morphology, comparable with control fruits (Figure 6), they were seedless fruits (Figure 7). This observation suggests that miR159-targeted *SlyGAMYB-like* genes are implicated in seed formation. Two main mechanisms are responsible for the formation of seedless fruits (1): (i) parthenocarpy, where the fruit develops in

the absence of fertilization; and (ii) stenospermy, where pollination and fertilization are required, but embryos either do not form or they abort before completion of seed formation (Bouquet *et al.*, 1996). To evaluate these possibilities, we emasculated several OE-159, pk2 and MT flowers at pre-anthesis stage to determine whether ovary growing in OE-159 flowers depends on fertilization. While all transgenic ovaries were able to grow out and produce fruit (Figure 8), none pk2 and MT flowers were not able to generate any fruit, which suggests the fruit set on OE-159 plants is uncoupled from pollination and fertilization processes, as fruit set takes place in these plants even in the absence of pollination. Therefore, we concluded that OE-159 seedless fruits were generated by parthenocarpy.

Given that fruit set is initiated by the pollination process (O'Neill and Nadeau, 1997) and the OE-159 plants show little pollen release, we carried out experiments to clarify whether parthenocarpy was facultative, obligatory or a consequence of the little pollen release. We performed pollination of OE-159 and pk2 flowers with pollen from MT (Figure 9) and M82 flowers (data not shown). While 100% of the fruits generated by OE-159 flowers were parthenocarpic, 100% of the fruits from pk2 flowers produced normal seeds with pollen from both cultivars (MT and M82), indicating that parthenocarpy in OE-159 plants is obligatory.

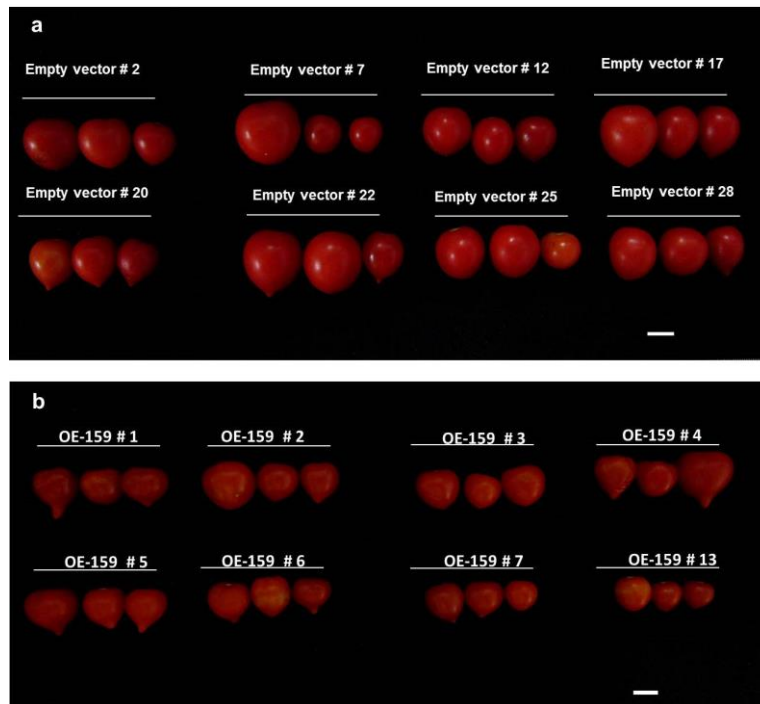


Figure 6. Comparative fruit morphology from different lines transformed with the empty binary vector **(a)** and *p35S::SlyMIR159* **(b)**. # transgenic line. **Scale bars:** 500 μ m.

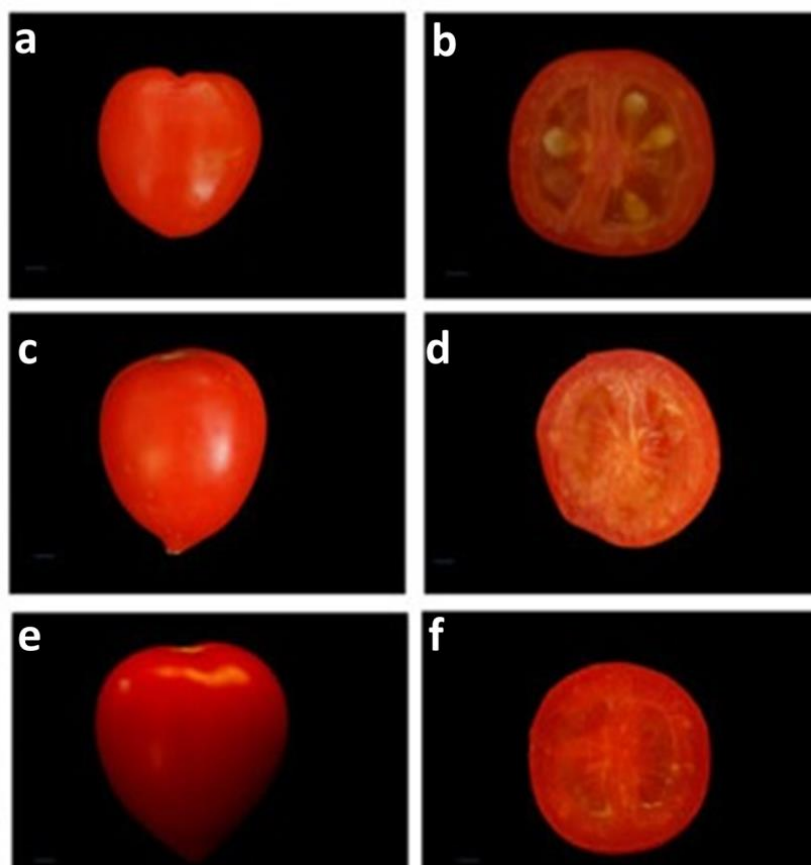


Figure 7. **(a, b)** Representative fruit from pk2 control plants. **(c, d,)** Representative fruit from a mild transgenic line# 4. **(e, f).** Representative fruit from a stronger transgenic line fruit #7.

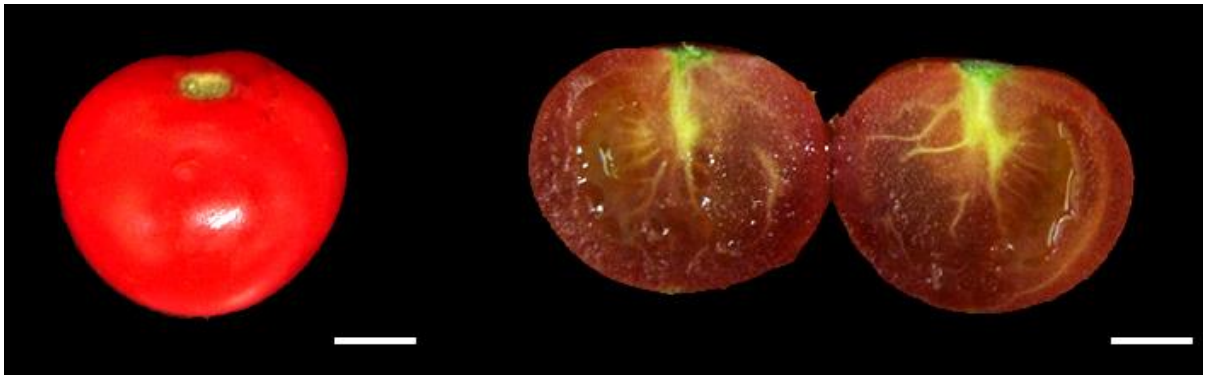


Figure 8. Parthenocarpic fruit from emasculated flower (2 days before anthesis) from transgenic lines OE-159 # 7. Emasculated flowers from pk2 and MT plants were not able to generate any fruits. # transgenic line, Scale bar 500mm.

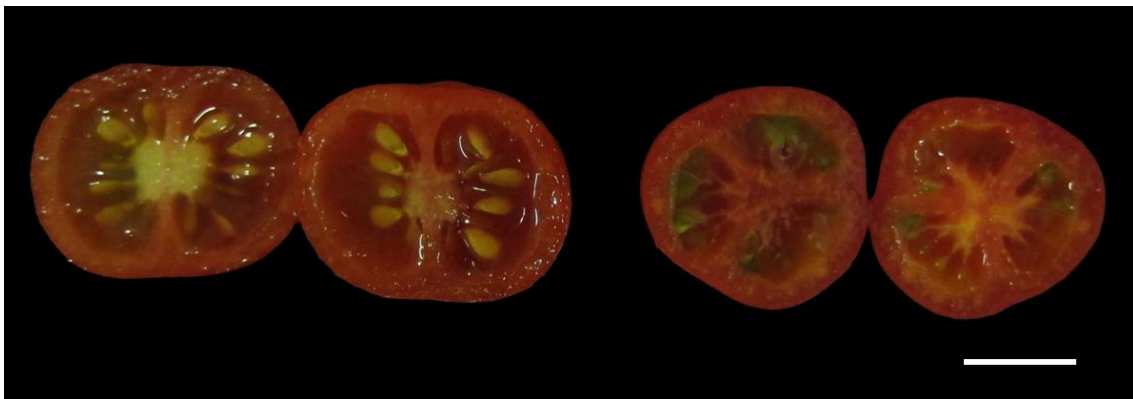


Figure 9. Pollinated fruits with MT pollen: pk2 control fruits on the left (with seeds) and OE-159 on the right (seedless parthenocarpic fruit). **Scale bar**, 1cm. n = 30

Ovary development is closely related to fruit organogenesis (Wang *et al* 2009). To shed some light on the possible origin of parthenocarpy of OE-159 fruits, we analysed tissue sections of pre-anthesis ovaries from transgenic and MT plants. Our data revealed that the ovules from OE-159 ovaries have somehow a different morphology and that the embryo sac is larger than those from MT ovules (Figure 10). The ovules are key organs to seed development and fruit set. They are derived from meristematic regions of the placenta tissues (Skinner *et al.*, 2004; Gallois *et al.*, 2002). Thus, we decide to check the expression of *SlyGAMYB1* in the placenta tissues of MT pre-anthesis ovaries by

in situ hybridization. Surprisingly, its transcripts were found to be confined in the region of the placenta, which will give rise to ovule formation (Figure 11). This supports the idea that *SlyGAMYB1* and perhaps their downstream targets contribute to ovule development in tomato ovaries.

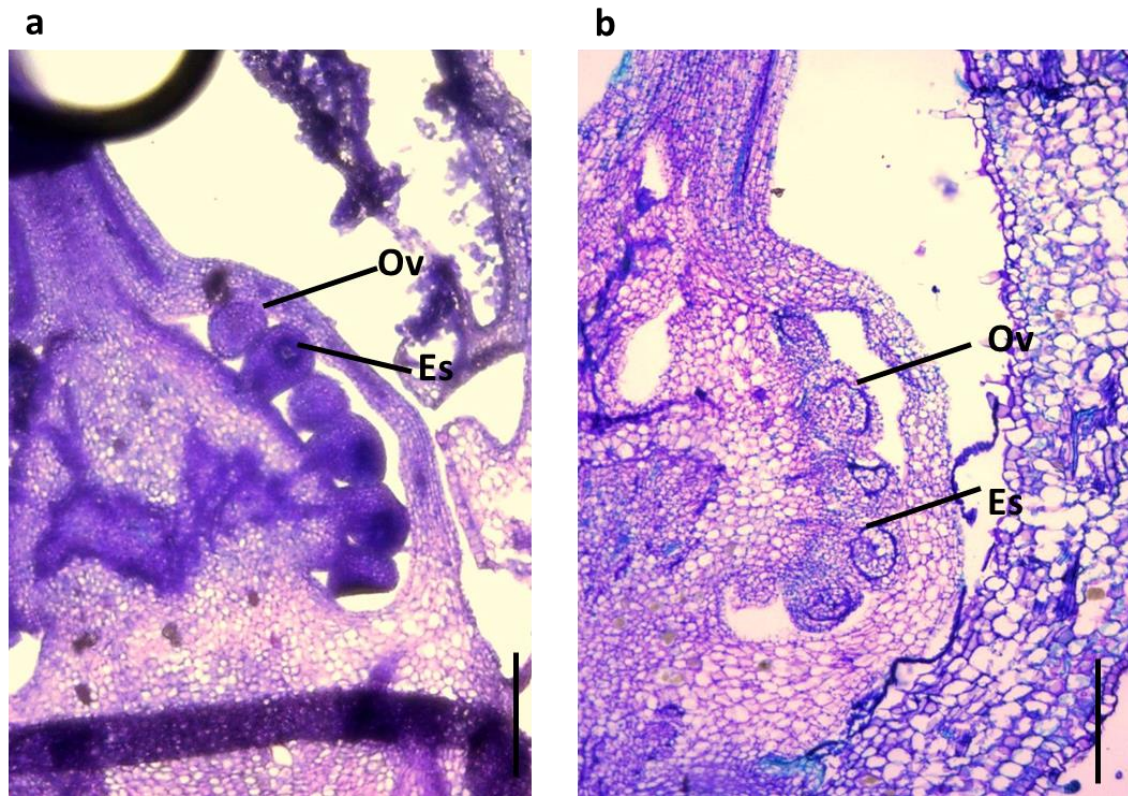


Figure 10. Longitudinal sections of flowers at developmental stage 10 **(a)** MT ovary **(b)** OE-159-7. **Scale bars:** 500 μ m **Ovu:** ovule; **ES:** Embryo sac, **7:** transgenic lines used for the anatomy. Flowers were collected based on flower developmental stages described in Brukhin *et al.* 2003.

Additionally, ovule development is under control of specific genetic pathways (Skinner *et al.*, 2004; Gallois *et al.*, 2002). Given that *SlyGAMYB1* is expressed early in placenta tissues (mainly in placenta margins from where the ovules rise) and in the developing ovule of MT flowers (Figures 1h and 11), our data support a possible function of this gene in the patterning of ovule development. It is possible that the down-regulation of *SlyGAMYB1* in OE-159

ovaries has compromised ovule and thereafter, seed formation. Nonetheless, OE-159 ovaries were still able to grow out and generate parthenocarpic fruits.

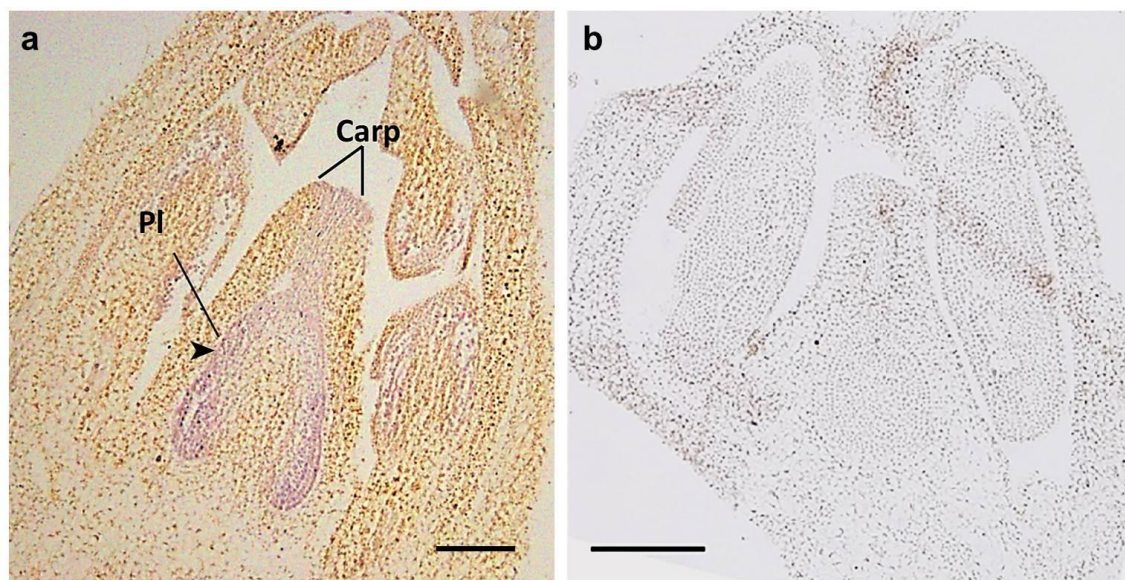


Figure 11. (a) A digoxigenin-labeled probe detecting *SlyGAMYB1* transcripts was hybridized with longitudinal sections of MT flowers at developmental stage. Purple staining shows probe localization (arrowheads). **(b)** Negative controls. **Scale bars** = 50 μm (a) and 100 μm (b). **Carp**, carp; **Pl**, Placenta. Flowers were collected based on flower developmental stages described in Brukhin *et al.* 2003.

Auxin, GA and ABA levels are not altered in OE-159 ovaries

As mentioned before, phytohormones such as auxin and GA are associated with fruit set and parthenocarpy (Gorquet *et al.*, 2005; Srivastava and Handa, 2005; Serrani *et al.*, 2007). Therefore, we performed auxin, ABA, and GA quantifications in several pre-anthesis ovaries of independent OE-159 transgenic lines. Interestingly, no significant changes in hormone levels were observed in OE-159 compared with control (pk2 ovaries) (Figure 12). Auxin and ABA levels did not present any significant change (Figure 12a, b). Similar results were observed for active GA levels (Figure 12c, d). These results indicate that down-regulation of *SlyGAMYB-like* genes did not affect significantly the biosynthesis of auxin, ABA or GA in pre-anthesis OE-159

ovaries, even if parthenocarpic fruits are generated (Figure 7). It is possible that such hormones (mainly auxin and GA) interact with miR159 node by regulating its components during pre-anthesis and perhaps, during post-anthesis stages of fruit development to fine-tune hormone signalling.

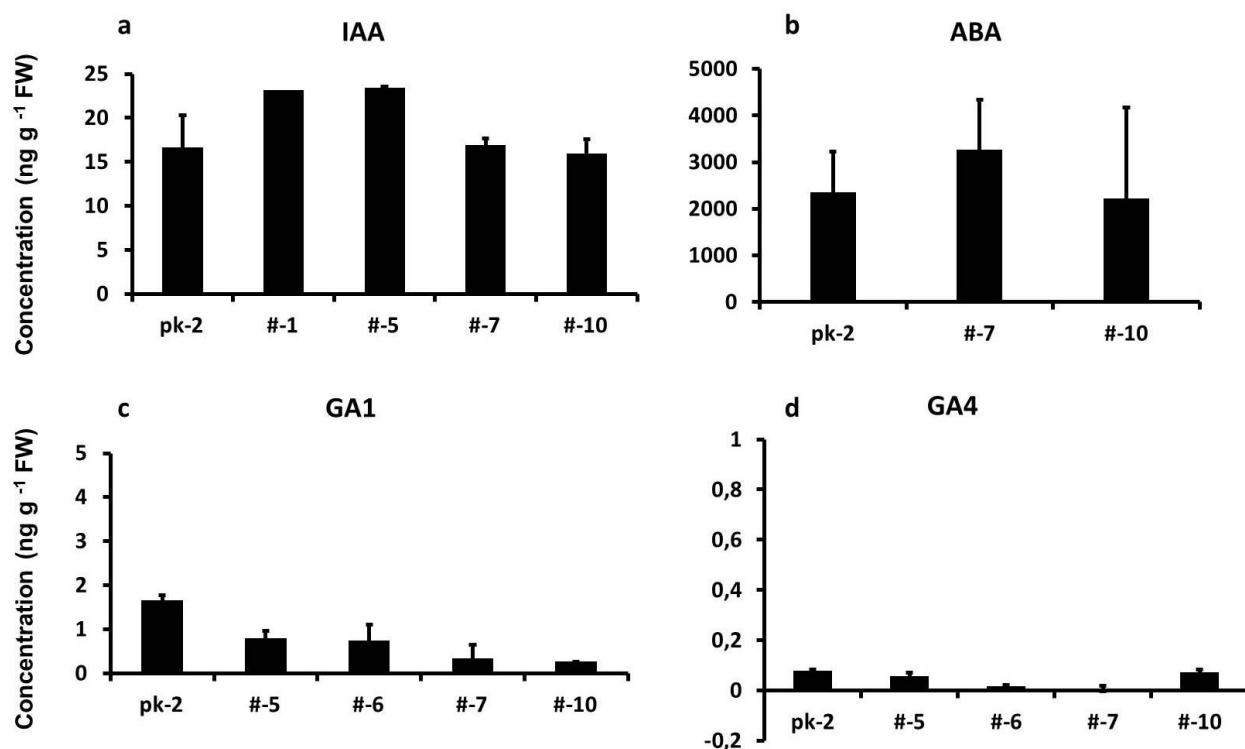


Figure 12. Hormones levels in OE-159 pre-anthesis ovaries. Pk2 transgenic plants were used as a control, showing no significant changes in hormone amount. Results are the mean of three biological replicates ($p < 0.05$). The numbers (#) represent different transgenic lines of OE-159. **IAA**: Indole - 3 - acetic acid. **GA1** and **GA4**: Active forms of GA. **ABA**: abscisic acid. Error bars indicate standard deviation of biological samples.

GA pathway regulates miR159 node in pre-anthesis tomato ovaries

Considering that *GAMYB* functions in GA-mediated gene regulation during seed germination (Gubler *et al.*, 1995), we decided to check if GA could regulate miR159 and *SlyGAMYB-like* transcript levels during ovary development. Plants overexpressing *GIBBERELLIN 20-OXIDASE* (*GA20ox-OE*) gene display high levels of active GAs and parthenocarpic fruit formation (García-Hurtado *et al.*, 2012). *GA20ox* is one of the enzymes that catalyses the

last steps of the biosynthesis pathways of active GAs (Yamaguchi, 2008). Therefore, we evaluated transcript levels of miR159 and *SlyGAMYB-like* genes in pre-anthesis ovaries from *GA20ox-OE* transgenic lines. Interestingly, while miR159 was slightly up-regulated, *SlyGAMYB1* was down-regulated in pre-anthesis ovaries (Figure 13). Conversely, *SlyGAMYB2* did not present obvious changes in expression in developing ovaries from *GA20ox-OE* overexpression lines when comparing with control ovaries. Since this gene is also a target of miR159, an inverse correlation between microRNA and *SlyGAMYB2* transcript levels was expected, similarly to what was shown for *SlyGAMYB1* (Figure 13). This apparent paradox was already showed for some *GAMYB-like* genes that are targeted by miR159 in *Arabidopsis* (Achard *et al.*, 2004). Moreover, it is possible that *SlyGAMYB2* acts in GA-independent pathways, though it remains to be demonstrated.

Although *GAMYB-like* genes are known to be induced by GA in seed germination, it has been already demonstrated that GA does not release *SlyGAMYB-like* gene expression from miR159 regulation during flowering in *Arabidopsis* (Alonso-Pereal *et al.*, 2010). The observed up-regulation of miR159 and down-regulation of *SlyGAMYB1* in *GA20ox-OE* pre-anthesis ovaries suggest that GA pathway acts upstream of the miR159 node during the fruit set process. Thus, high levels of parthenocarpic fruit formation observed in *GA20ox-OE* plants (García-Hurtado *et al.*, 2012) may be, at least in part, a result of low expression levels of *SlyGAMYB1*, similarly to what is observed in our OE-159 plants (Figure 13).

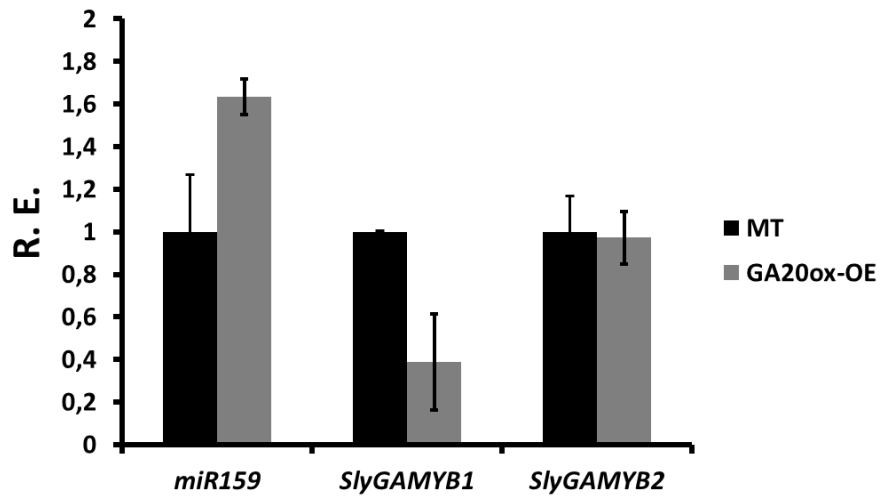


Figure 13. Quantitative RT-qPCR experiments performed with pre-anthesis ovaries from MT and *p35S::GA20ox* (GA20ox-OE) plants. MT was used as the reference sample. Error bars indicate standard deviation of three biological samples. **RE**, relative expression.

GA-regulated processes are frequently controlled by DELLA protein. This protein is usually a repressor of GA response (Richards *et al.*, 2001). However, it had been shown that, in some cases, GA signalling during fruit set can take place via DELLA-independent pathways (Fuentes *et al.*, 2012). To check whether the interaction between GA and miR159 node in tomato developing ovaries is DELLA-dependent, we evaluated the expression patterns of miR159, *SlyGAMYB1/2* in pre-anthesis ovaries of recessive *pro* mutant. This mutant has a point mutation in the VHID motif of the *SlyDELLA* gene (*PROCERA*), leading to a single amino acid change, consequently showing low activity of DELLA protein and presenting high levels of parthenocarpy. It has been proposed that in the recessive tomato *pro* mutant, the mutation in *SlyDELLA* may lead to lower activity of the repressor protein, causing reduced or no interaction with downstream targets (Bassel *et al.*, 2008; Jasinski *et al.*, 2008).

In *pro* developing ovaries, miR159 transcript levels were slightly reduced, while *SlyGAMYB2* did not present significant change. Conversely, *SlyGAMYB1* transcript levels were strongly reduced in *pro* pre-anthesis ovaries (Figure 14).

This result indicates that a correct expression of *SlyGAMYB1* is important during early stages of ovary development to prevent parthenocarpy, as *SlyGAMYB1* expression was severely reduced in both *GA20ox-OE* and *procera* as well as in OE-159 pre-anthesis ovaries (Figures 4, 13 and 14).

The *pro* ovaries have the capacity to develop parthenocarpically. However, *pro* parthenocarpy is facultative, because fruits with a certain number of seeds could be obtained by manual self-pollination (data not shown; Carrera et al., 2012). *pro* parthenocarpy is mostly caused by the absence of seeds due to the long-style phenotype (preventing self-pollination) and reduced number of pollen grains. In our OE-159 transgenic plants, parthenocarpy is likely caused by malformation of ovules (Figure 10), though these plants also displayed reduced production of pollen grains (data not shown).

Our data along with other group's data suggest that successful reproductive development (seed production) in tomato requires restriction of the GA response in early developing ovaries. This restriction may be achieved by the maintenance of a fine-tune *SlyGAMYB1* expression in crucial stages of ovary development, which could be through DELLA-dependent or DELLA-independent pathways.

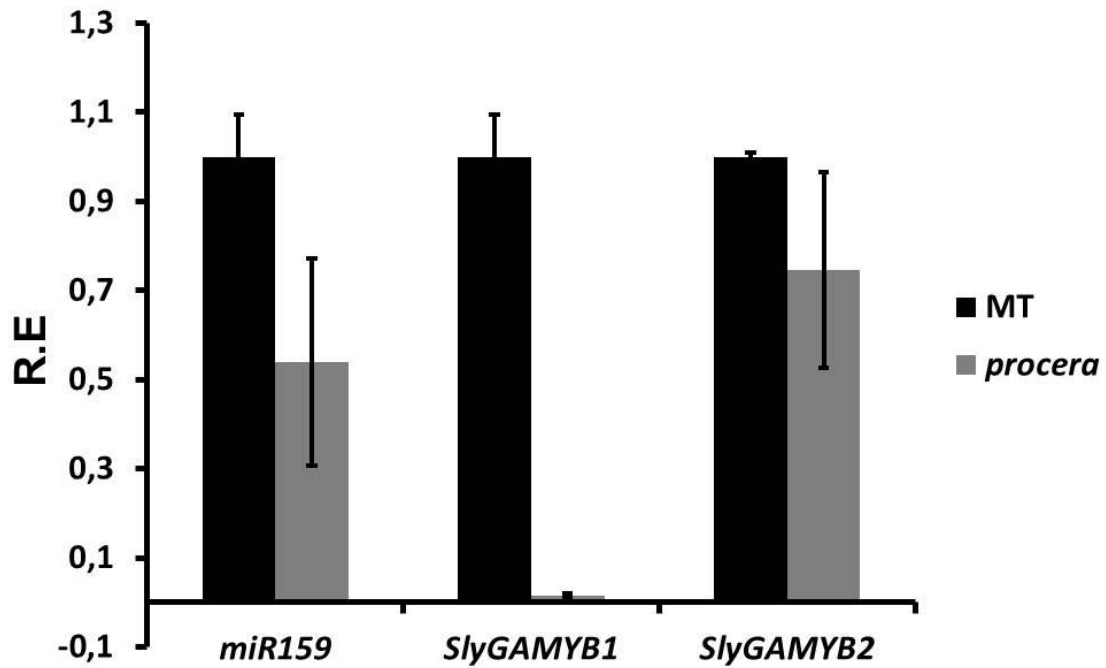


Figure 14. Quantitative RT–qPCR experiments performed with pre-anthesis ovaries from MT and *procera* plants. MT ovaries were used as reference sample. Error bars indicate standard deviation of three biological samples. **RE**, relative expression.

Response of miR159 and its target transcript levels to auxin and pollination treatments

Auxin is a key regulator of fruit development and fruit set and it is tightly implicated with parthenocarpic fruit formation in several species (Gorquet *et al.*, 2005; Srivastava and Handa, 2005, Serrani *et al.*, 2007). To evaluate auxin effect on the miR159 node, we performed auxin (2,4-D) treatment in pre-anthesis ovaries of MT plants (Figure 15). Similarly to previous reports (Serrani *et al.*, 2007), 2,4-D treatment of unpollinated ovaries led to fruit set. Conversely, mock-treated unpollinated MT ovaries remained essentially unchanged (Figure 15a). In line with the observed ovary phenotype, auxin treatment repressed *SlyGAMYB* gene expression. Interestingly, miR159 transcript levels were also severely reduced in 2,4-D treated unpollinated ovaries (Figure 15b).

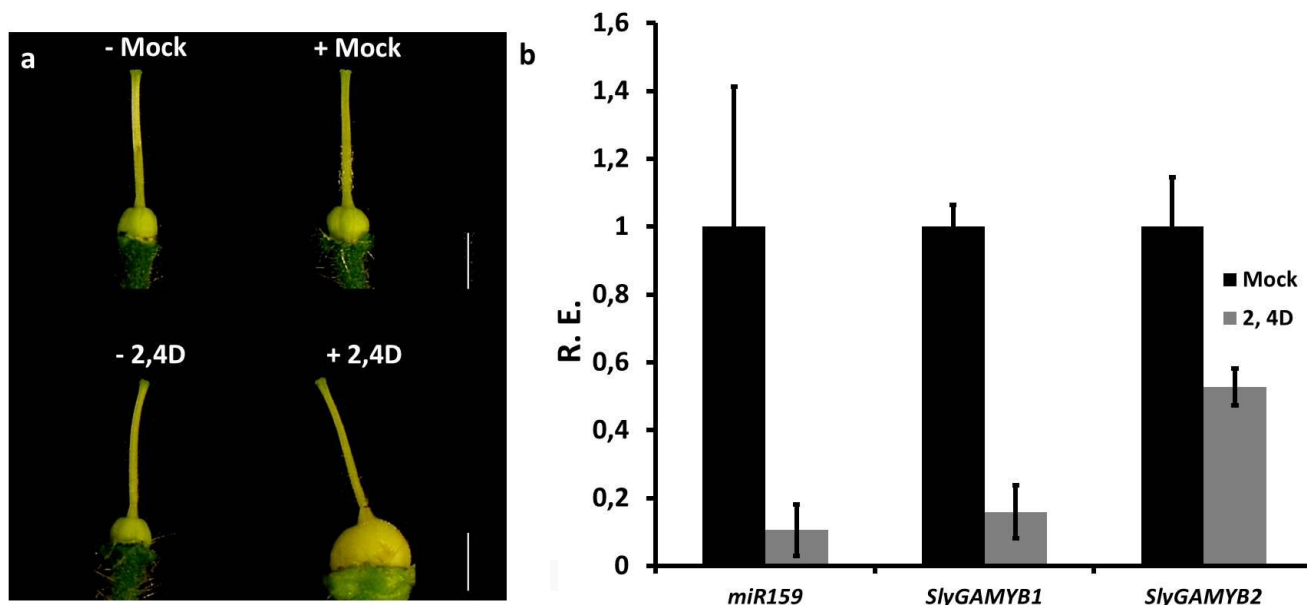


Figure 15. (a) Phenotypic effects of 2,4-D treatment in pre-anthesis, unpollinated ovaries of MT. Scale bar: 500mm. **(b)** Expression analyses of miR159 and its target genes in pre-anthesis, unpollinated ovaries treated with 2,4-D and mock (control). Quantitative RT-PCR experiments used tissues from ovaries treated with mock as reference sample. Error bars indicate standard deviation of three biological samples. **RE**, relative expression.

In normal conditions, fruit set initiation depends upon pollination and fertilization (O'Neill and Nadeau 1997), and its effect is associated with an increase in auxin levels after the pollination/fertilization (Sundberg and Østergaard 2009). Thus, we carried out an experiment in which we pollinated MT flowers with MT pollen (wild-type × wild-type crosses). The ovaries were collected at anthesis (0 DAP) and five days after pollination (5 DAP). As expected, pollinated ovaries were able to grow out after 5 DAP (Figure 16a). Transcript levels of miR159 and its targets were reduced in 5 DAP pollinated ovaries compared with ovaries at 0 DAP or unpollinated ovaries (Figure 16b), indicating that pollination and likely fertilization repress the miR159 node to promote fruit set in tomato.

Together, our results suggest that both auxin treatment and pollination negatively act on the *SlyGAMYB* gene expression during initiation of fruit set, perhaps independently of miR159 regulation. Considering that the increase in

auxin content after pollination is important for fruit set (Sundberg and Østergaard 2009), it is plausible to propose that negative regulation of *SlyGAMYB1/2* gene expression after pollination (Figure 16b) is crucial for the control of downstream molecular mechanisms that take place during fruit set.

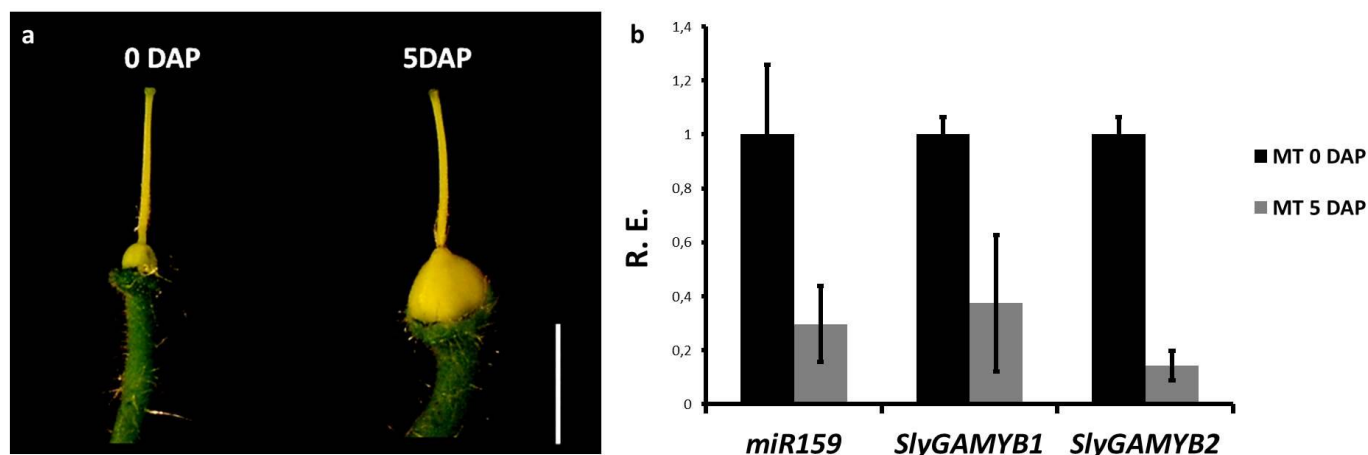


Figure 16. (a) MT ovaries at anthesis (0 DAP) and five days after handed pollinated (5 DAP). Scale bar: 1cm, **DAP**: Days After pollination. **(b)** Expression analyses of *miR159* and its target genes in unpollinated (0 DAP) and pollinated (5 DAP) MT ovaries. Quantitative RT-qPCR experiments used tissues from ovaries at 0 DAP as reference sample. Error bars indicate standard deviation of three biological samples. **RE**, relative expression.

miR167 node is mis-regulated in OE-159 developing ovaries

It had already been shown that the *miR159*-targeted *GAMYB-like* genes directly regulate *miR167*, and indirectly, *ARF6/8* expression. This crosstalk is important for *Arabidopsis* sepal, petal and stamen development (Rubio-Somoza and Weigel, 2013). *MiR167* negatively regulates *ARF6* and *ARF8* expression. Both *ARF* genes are implicated in fruit development and fruit set, including parthenocarp (Axtell and Bartel 2005, Wu *et al.*, 2006; Vivian-Smith *et al.*, 1999). Thus, we decided to investigate whether these microRNAs nodes (*miR159* and *miR167* node) could interact during ovary development.

The tomato genome contains four putative precursor (pri-miRNA) genes that could generate a conserved *miR167* mature sequence and *ARF6* and two

ARF8 homologs (Liu *et al.*, 2013; Zouine *et al.*, 2014). We initially performed a survey on the upstream regions of all tomato miR167 precursors, looking for potential motifs for the GAMYB-like transcription factors (TAACAAA). As showed previously in *Arabidopsis* (Rubio-Somoza and Weigel 2013), we were able to identify putative binding sites for GAMYB-like (Gubler *et al.*, 2005) in *SlyMIR167A* and *SlyMIR167B* precursors (Liu *et al.*, 2013; Figure 17).

This result raised the possibility that these microRNA nodes (i.e., miR159/ *SlyGAMYB1/2* and miR167/*SlyARF6/8*) may interact during early steps of tomato ovary development. In addition, it has been shown that miR167 node is involved in tomato ovary development and fruit set (Liu *et al.*, 2013). In order to test this hypothesis, we began to evaluate the expression patterns of miR167 and its target *SlyARF8A* in OE-159 and MT pre-anthesis ovaries.

Interestingly, miR167 was down-regulated while *Sly-ARF8A* was induced in OE-159 pre-anthesis ovaries when comparing with MT ovaries (Figure 18), indicating that the interaction between these miRNA nodes may be relevant not only for sepal, petal and stamen development, but also for carpel and ovary development.

These results led us to conclude that miR159 node is crucial at pre-anthesis stages of fruit set to modulating the expression of miR167 in order to keep the expression of *SlyARF8A*, and perhaps *SlyARF8B* and *SlyARF6* genes at low levels, which is important to prevent fruit set initiation before pollination. This idea is supported by earlier fruit set and the high levels of parthenocarpy presented by our OE-159 plants (Figure 5 and 7), which also show down-regulation of miR167 (Figure 18). In addition, it had been already demonstrated that *ARF6/8* mis-regulation led to parthenocarpy phenotype in *Arabidopsis* and eggplant (Vivian-Smith *et al.*, 2001 e Goetz *et al* 2006; Du *et al.*, 2015).

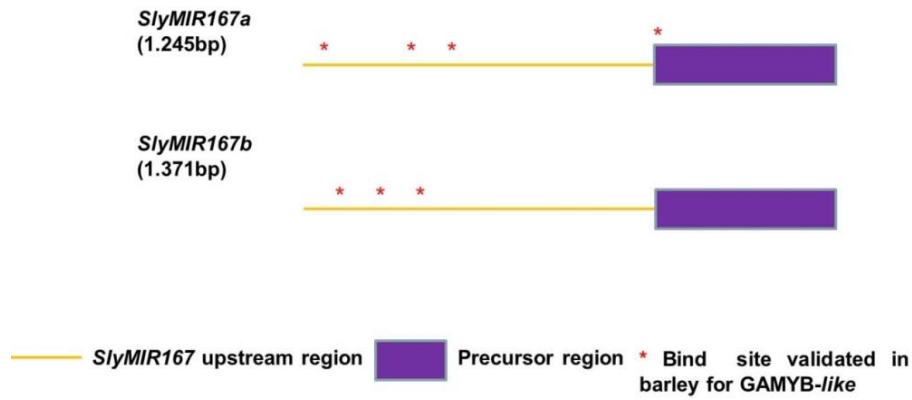


Figure 17. Computational analysis of putative binding sites for SlyGAMYB-like proteins in tomato genomic sequences.

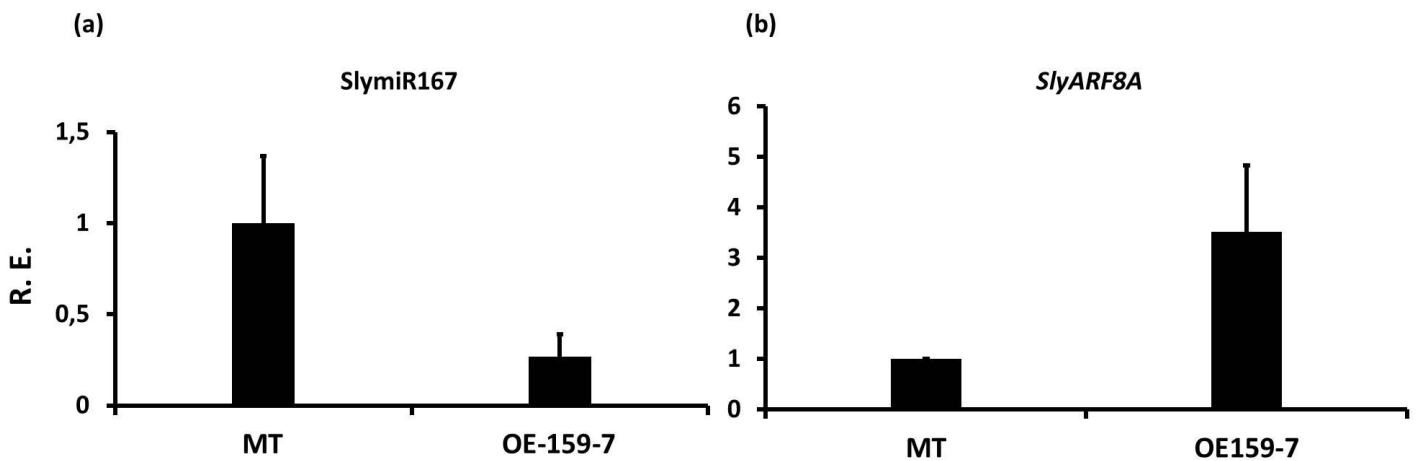


Figure 18. Expression analyses of miR167 (a) and *Sly-ARF8A* (b) in pre-anthesis ovaries of OE-159 (3 days before pollination) transgenic line and MT plants. Error bars indicate standard deviation of three biological samples. RE, relative expression. 7: Transgenic line OE-159. Quantitative RT-qPCR experiments used tissues from MT pre-anthesis ovaries as the reference sample.

To reinforce our hypothesis regarding the crosstalk between miR159 and miR167 nodes during tomato fruit set, we assessed the expression patterns of the miR167 and *SlyARF8A* in ovaries at anthesis (0 DAP) and in younger fruits (5 DAP) from MT plants. Strikingly, miR167 transcript level was reduced after pollination and the *SlyARF8A* was up-regulated in 5 DAP ovaries (Figure 19). These results can be explained by the fact that the miR159 node is down-regulated in fruits at 5 DAP (Figure 16b). Since the expression of *SlyGAMYB1*

is reduced after pollination/fertilization, this could lead to reduced levels of miR167 transcripts and released *SlyARF8A* expression. Recently, Liu *et al.* (2016) showed that *SlyARF8* is induced by pollination and achieve its highest levels 14-16 days after pollination, which support the importance of the ARFs expression for the fruit set process.

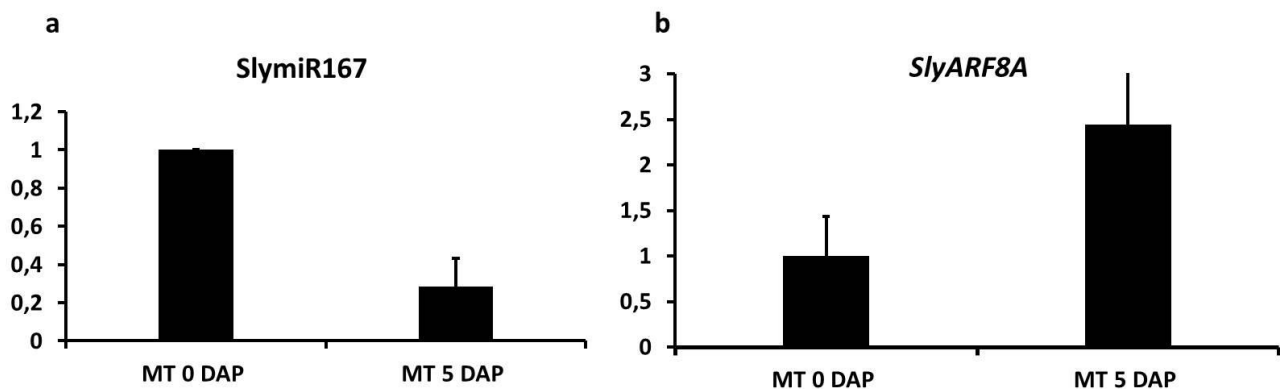


Figure 19. (a) Comparative expression analysis of miR167 **(b)** *Sly-ARF8A* in MT ovaries at anthesis (0 DAP) and hand pollinated (5 DAP). Error bars indicate standard deviation of three biological samples. RE, relative expression. The quantitative RT-qPCR experiments used tissues from ovaries at 0 DAP as the reference sample.

Furthermore, the spatial and temporal pattern of transcripts of *SlyGAMYB1* are localized in ovules and anthers (Figure 1g), similarly to what was previously observed for *Sly-ARF6* and *Sly-ARF8* (Liu *et al.*, 2013). This reinforces our idea of a regulatory circuit in which miR159 targeted *SlyGAMYB*-like positively regulate the expression levels of miR167 to modulate the expression of its targets during ovary development and more specifically fruit set. In this context, we propose a model integrating the miR159, miR167 nodes and their interaction with auxin and GA signalling during tomato ovary development and also in the fruit set (Figure 20).

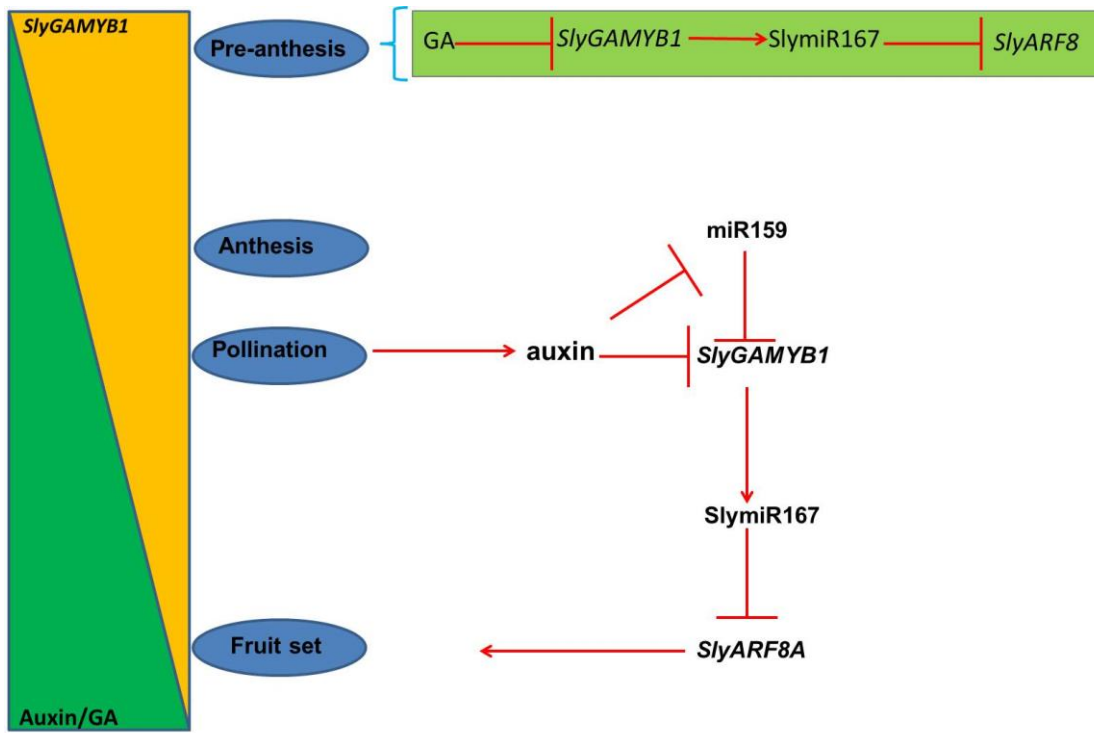


Figure 20. Hypothetic model representing the network between miR159 pathway and miR167 node integrated with pollination/fertilization, auxin and GA signalization during ovary development and fruit set. In pre-anthesis (green box) the *SlyGAMYB1* expression is relevant to induce the miR167 in order to repress the *SlyARF8A* to prevent fruit set without pollination. Once the pollination take place, the miR159 node is repressed, thus, the fruit set process starts.

Conclusões gerais da tese

Com base em todos os resultados apresentados nesta tese de doutoramento, podemos concluir que:

- I. A via de regulação *miR159/SlyGAMYB1* é importante para a padronização do desenvolvimento do ovário em tomateiro e consequentemente da frutificação;
- II. A redução da expressão do fator de transcrição *SlyGAMYB1* em ovários em pré-antese, por intermédio do *miR159* ou via GA induz a formação de frutos partenocárpico em tomateiro;
- III. Os dois fatores de transcrição (*SlyGAMYB1* e 2) parecem não apresentar funções redundantes em tomateiro;
- IV. É possível que a via *miR159/SlyGAMYB1* atue também na padronização do desenvolvimento do óvulo;
- V. A superexpressão do *SlyMIR159* não altera a concentração dos hormônio ABA, GA e auxina nos ovários das linhagens transgênicas;
- VI. O *crosstalk* entre as vias moduladas pelo *miR159* e *miR167* é importante para o processo de frutificação em tomateiro;
- VII. É provável que a aumento na produção de auxina em resposta aos eventos de polinização/fertilização atue reprimindo a via *miR159/SlyGAMYB1*, iniciando assim o processo de frutificação.

5 - Referências bibliográficas

- Achard P, Herr A, Baulcombe DC, Harberd N, P (2004). Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. **Development** 131, 3357–3365.
- Alonso-Pereal MM, Li J, Li Y, Allen RS, Schnippenkoetter W, Ohms S, White RG, Millar AA (2010) The microRNA159-regulated GAMYB-like genes inhibit growth and promote programmed cell death in Arabidopsis. **Plant Physiology** 154, 757–771.
- Axtell MJ, Bartel DP (2005). Antiquity of microRNAs and their targets in land plants. **The Plant Cell**, 17(6), 1658–1673.
- Aya K, Ueguchi-Tanaka M, Kondo M, Hamada K, Yano K, Nishimura M, Matsuoka M (2009) Gibberellin modulates anther development in rice via the transcriptional regulation of *GAMYB*. **Plant Cell** 21: 1453–1472.
- Bassel G W, Mullen RT, Bewley JD (2008) procera is a putative DELLA mutant in tomato (*Solanum lycopersicum*): effects on the seed and vegetative plant. **Journal of Experimental Botany**. 59, n. 3, pp. 585–593
- Bergougnoux V (2014). The history of tomato: From domestication to biopharming. **Biotechnology Advances**, 32(1), 170–189.
- Berger Y, Harpaz-Saad S, Brand A, Melnik H, Sirding N, Alvarez JP, Zinder M, Samach A, Eshed Y, Ori N (2009) The NAC-domain transcription factor GOBLET specifies leaflet boundaries in compound tomato leaves. **Development**, 136, 823-832.
- Biale JB (1964) Growth, maturation and senescence in fruits. **Science** 146: 880-888.
- Bishop GJ, Nomura T, Yokota T, Harrison K, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Jones JDG, Kamiya Y (1999) The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. **Proceeding National Academy Science USA** 96: 1761–1766
- Blazquez MA, Weigel D(2000) Integration of floral inductive signals in Arabidopsis. **Nature** 404, 889–902.
- Blein T, Pulido A, Vialette-Guiraud A, Nikovics K, Morin H, Hay A, Johansen IE, Tsiantis M, eLaufs P (2008). A Conserved Molecular Framework for Compound Leaf Development. **Science** 322, 1835-1839.
- Brukhin, V., Hernould, M., Gonzalez, N., Chevalier, C. and Mouras, A. (2003) Flower development schedule in tomato *Lycopersicon esculentum* cv. Sweet Cherry. **Sexual Plant Reproduction** 15, 311–320.
- Bouquet A, Danglot Y (1996) Inheritance of seedlessness in grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Vitis** 35:35–42.
- Campos ML, Carvalho RF, Benedito V A, Pereira Peres LE (2010). Small and remarkable, **Plant Signaling & Behavior** 5(3), 267–270.
- Carvalho RF, Campos ML, Pino LE, Crestana SL, Zsögön A, Lima JE, Peres LE (2011). Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: “Micro-Tom” as an effective toolkit for plant development research. **Plant Methods**, 7(1), 18.
- Carrera E, Ruiz-Rivero O, Peres LE, Atares A, Garcia-Martinez JL (2012) Characterization of the procera tomato mutant shows novel functions of the SIDEELLA protein in the control of flower morphology, cell division and expansion, and the auxin-signaling pathway during fruit-set and development. **Plant Physiology**. 160(3):1581-96.
- Chen W, Kong J, Lai T, Manning K, Wu C, Wang Y, Hong Y (2015). Tuning LeSPL-CNR expression by SlymiR157 affects tomato fruit ripening. **Scientific Reports**, 5, 7852.
- Csukasi F, Donaire L, Casañal A, Martínez-Priego L, Botella MA, Medina-Escobar N, Llave C, Valpuesta V. (2012) Two strawberry miR159 family members display developmental-specific expression patterns in the fruit receptacle and cooperatively regulate Fa-GAMYB. **New Phytologist** 195(1):47-57
- De Jong M, Mariani C, Vriezen WH (2009). The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. **Journal of Experimental Botany**, 60(5), 1523–1532.
- Diaz I, Vicente-Carbajosa J, Abraham Z, Martinez M, Isabel- Lamoneda I, Carbonero P (2002) The *GAMYB* protein from barley interacts with the DOF transcription factor BPBF and activates endosperm-specific genes during seed development. **Plant Journal** 29:453–464.
- Du L, Bao C, Hu T, Zhu Q, Hu H, He Q, & Mao W. (2015). SmARF8, a transcription factor involved in parthenocarpy in eggplant. **Molecular Genetics and Genomics**. <http://doi.org/10.1007/s00438-015-1088-5>
- Eyal E, Levy AA (2002) Tomato mutants as tools for functional genomics. **Current Opinion Plant Biology** 5:112–117.
- Exposito-Rodríguez M, Borges AA, Borges-Perez A, Perez JA (2008) Selection of internal control genes for quantitative real-time RT- PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biology** 8:131.
- Franco-Zorrilla JM, Valli A, Todesco M, Mateos I, Puga MI, Rubio-Somoza I, Leyva A, Weigel D, Garcia JA, Paz-Ares J (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. **Nature genetics**. 39:1033-1037.
- Fos M, Nuez F, García-Martínez J L (2000). The gene pat-2, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. **Plant Physiology**, 122(2), 471–480.
- Fuentes S, Ljung K, Sorefan K, Alvey E, Harberd, NP and Østergaarda L (2012) Fruit Growth in Arabidopsis Occurs via DELLA-Dependent and DELLA-Independent Gibberellin Responses **The Plant Cell** 24: 3982–3996

- Gallois JL, Woodward C, Reddy GV, Sablowski R (2002) Combined SHOOT MERISTEMLESS and WUSCHEL trigger ectopic organogenesis in Arabidopsis. **Development** 129, 3207-3217.
- García-Martínez JL, Hedden P (1997) In gibberellins and fruit development. In *Phytochemistry of Fruit and Vegetables* (Tomas-Barberán, F.A. and Robins, R.J., eds). Oxford: Clarendon Press, pp. 263–286.
- García-Hurtado N, Carrera E, Ruiz-Rivero O, López-Gresa MP, Hedden P, Gong F, García-Martínez JL (2012). The characterization of transgenic tomato over-expressing gibberellin 20-oxidase reveals induction of parthenocarpic fruit growth, higher yield, and alteration of the gibberellin biosynthetic pathway. **Journal of Experimental Botany** 63, 5803–5813.
- Gillaspy G, Bendavid H, Gruissem W. (1993). Fruits: a developmental perspective. **Plant Cell** 5:1439–51
- Giovannoni J. 2001. Molecular biology of fruit maturation and ripening. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 52, 725-749.
- Giovannoni JJ (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. **The Plant Cell**, 16 Suppl, S170–S180.
- Goetz M, Hooper LC, Johnson SD, Rodrigues JCM, Vivian-Smith A, Koltunow AM. (2007) Expression of aberrant forms of AUXIN RESPONSE FACTOR8 stimulates parthenocarp in Arabidopsis and tomato. **Plant Physiology** 145, 351–366
- Gocal GFW, Sheldon CC, Gubler F, Moritz T, Bagnall DJ, Macmillan CP, Li SF, *et al.* (2001). *GAMYB-like* Genes, Flowering, and Gibberellin Signaling in Arabidopsis 1. **Society**, 127 p. 1682-1693.
- Gong X, Bewley D. (2008). A GAMYB-like gene in tomato and its expression during seed germination. **Planta** 228: 563–572
- Gorquet B, Van Heusden, AW, Lindhout P (2005) Parthenocarpic fruit development in tomato. **Plant Biology** 7, 131–139.
- Gubler F, Kalla R, Roberts J, Jacobsen J (1995) Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for *Myb* transactivation of a high-pl alpha-amylase gene promoter. **Plant Cell**, 7 p. 1879-1891
- Gubler F, Watts RJ, Kalla R, Matthews P, Keys M, John V (1997) Cloning of a Rice cDNA Encoding a Transcription Factor Homologous to Barley *GAMYB*. **Plant Cell**, 38(3), 362-365.
- Gubler F, Chandler PM, White RG, Llewellyn DJ, Jacobsen JV (2002). Gibberellin signaling in barley aleurone cells: Control of *SLN1* and *GAMYB* expression. **Plant Physiology** 129, 191–200.
- Gustafson FG. 1936. Inducement of fruit development by growth-promoting chemicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA** 22, 628–636.
- Jacobsen SE, Running MP, Meyerowitz EM. (1999) Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in Arabidopsis causes unregulated cell division in floral meristems. **Development**;126(23):5231-43.
- Javelle, M. and Timmermans, M.C.P. (2012) In situ localization of small RNAs in plants by using LNA probes. **Nature Protocols**, 7, 533-541
- Jasinski S, Tattersall A, Piazza P, Hay A, Martínez-García JF, Schmitz G, Theres K, McCormick S, Tsiantis M. 2008. PROCERA encodes a DELLA protein that mediates control of dissected leaf form in tomato. **The Plant Journal** 56, 603–612.
- Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., & Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. **Annual Review of Plant Biology**, 57, 19–53.
- Kaneko M, Inukai Y, Ueguchi-Tanaka M, Itoh H, Izawa T, Kobayashi Y, Hattori T, Miyao A, Hirochika H, Ashikari M, *et al* (2004). Loss-of-function mutations of the rice *GAMYB* gene impair α -amylase expression in aleurone and flower development. **Plant Cell** 16: 33–44.
- Karlova R, van Haarst JC, Maliepaard C, van de Geest H, Bovy AG, Lammers M, Angenent GC, Maagd RA (2013) Identification of microRNA targets in tomato fruit development using high-throughput sequencing and degradome analysis **Journal Experimental Botany** 64(7): 1863–1878.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science** 294(5543):853-8.
- Larry R, Joanne L, Genetic resources of tomato. In: Razdan MK, Mattoo AK, editors. Genetic improvement of solanaceous crops. Vol. 2. Enfield, NH: Science Publishers; 2007. *Tomato*.
- Lauressergues D, Couzigou JM, Clemente HS, Martinez Y, Dunand C, Bécard G, Combier JP (2015) Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides. **Nature** 520: 90-93.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**;75(5):843-54.
- Li X, Bian H, Song D, Ma S, Han N, Wang J, *et al.* (2013) Flowering time control in ornamental gloxinia (*Sinningia speciosa*) by manipulation of miR159 expression. **Annals Botany**, 111(5):791-9.
- Lifshitz E, Ayre BG and Eshed Y (2014) Florigen and anti-florigen—a systemic mechanism for coordinating growth and termination in flowering plants **Frontiers in Plant Science** doi: 10.3389/fpls.2014.00465
- Lima JE, Carvalho RF, Neto AT, Figueira A, Peres LEP. 2004. Micro-MsK: a tomato genotype with miniature size, short life cycle, and improved in vitro shoot regeneration. **Plant Science** 167, 753–757.
- Liu N, Wu S, Van Houten J, Wang Y, Ding B, Fei Z, Clarke TH, Reed JW, Esther van der Knaap E. (2014) Down-regulation of AUXIN RESPONSE FACTORS 6 and 8 by microRNA 167 leads to floral development defects and female sterility in tomato **Journal of Experimental Botany** doi:10.1093/jxb/eru141.
- Liu X, T Xu, X Dong, Y Liu Z. Liu, Z Shi, Wang Y, M Qi, T Li, (2016) The role of gibberellins and auxin on the tomato cell layers in pericarp via the expression of ARFs regulated by miRNAs in fruit set *Acta Physiologiae Plantarum* doi 10.1007/s11738-016-2091-0.
- Lombardi-Crestana, S., Azevedo, M.d.S., Ferreira e Silva, G.F., Pino, L.E., Appezzato da Gloria, B., Figueira, A., Silveira Nogueira, F.T. and Pereira Peres, L.E. (2012) The tomato (*Solanum lycopersicum*

- cv. Micro-Tom) natural genetic variation Rg1 and the DELLA mutant procera control the competence necessary to form adventitious roots and shoots. **Journal of Experimental Botany**. 63, 5689–5703
- Lopez-Gomollon S, Mohorianu I, Szittyá G, Moulton V, Dalmay T. (2012). Diverse correlation patterns between microRNAs and their targets during tomato fruit development indicates different modes of microRNA actions. **Planta**, 236(6), 1875–1887.
- Lu C, Fedoroff N. (2000). A mutation in the Arabidopsis HYL1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin. **The Plant Cell** 12, 2351–2365.
- Ma, N., Feng, H., Meng, X., Li, D., Yang, D., Wu, C., & Meng, Q. (2014). Overexpression of tomato SINAC1 transcription factor alters fruit pigmentation and softening. **BMC Plant Biology**, 14(1),
- Manning, K., Tor, M., Poole, M., Hong, Y., Thompson, A.J., King, G.J., Giovannoni, J.J. e Seymour, G.B. 2006 A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBPbox transcription factor inhibits tomato fruit ripening. **Nature Genetics**, 38, 948-952.
- Mapelli S, Frova C, Torti G, Soressi GP. (1978). Relationship between set, development and activities of growth regulators in tomato fruits. **Plant and Cell Physiology** 19, 1281–1288.
- Mapelli S, Torti G, Badino M, Soressi GP. 1979. Effects of GA3 on flowering and fruit-set in a mutant of tomato. **Horticulture Science** 14, 736–737.
- Matsuo S, Kikuchi K, Fukuda M, Honda I, Imanishi S (2012) Roles and regulation of cytokinins in tomato fruit development. **Journal Experimental Botany**, 63 (15), 5569-5579.
- Martí E, Gisbert C, Bishop GJ, Dixon MS, García-Martínez JL (2006). Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. **Journal of Experimental Botany**, 57(9), 2037–2047.
- Martí C, Orzáez D, Ellul P, Moreno V, Carbonell J, Granell A (2007) Si- lencing of DELLA induces facultative parthenocarp in tomato fruits. **Plant Journal** 52: 865–876.
- Meissner R, Jacobson Y, Melamed S, Levyatuv S, Shalev G, Ashri A, Levy A (1997). A new model system for tomato genetics. **Plant Journal** 12(6), 1465-1472.
- McGarry RC, Ayre BG. (2012) Manipulating plant architecture with members of the CETS gene family **Plant Science** 188–189 (2012) 71–81.
- McMurchie EJ, Me Glasson WB, Eaks IL. (1972) Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene, - **Nature** 237: 235-236.
- Millar, AA, Gubler, F. (2005) The Arabidopsis GAMBY-like genes, MYB33 and MYB65, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development. **The Plant Cell** 17, 705–721.
- Monforte AJ, Diaz AI, Cano-Delgado A, Van Der Knaap E (2014). The genetic basis of fruit morphology in horticultural crops: lessons from tomato and melon. **Journal Experimental Botany** :4625-37.
- Mohorianu I, Schwach F, Jing R, Lopes-Gomollon S, Moxon S, Szittyá G, Sorefan K, Moulton V, Dalmay T. (2011) Profiling of short RNAs during fleshy fruit development reveals stage-specific sRNAome expression patterns. **Plant journal**, Oxford, v 67, n 2 p 232-246.
- Moxon S, Jing R, Szittyá G, Schwach F, Pilcher RLR, Moulton V, Dalmay T (2008) Deep sequencing of tomato short RNAs identifies microRNAs targeting genes involved in fruit ripening. **Genome Research**, 18, 1602-1609.
- Mounet F, Moing A, Garcia V et al. (2009) Gene and metabolite regulatory network analysis of early developing fruit tissues highlights new candidate genes for the control of tomato fruit composition and development. **Plant Physiology**. 149, 1505–1528.
- Murray F, Kalla R, Jacobsen JV, Gubler F (2003). A role for HvGAMBY in anther development. **Plant Journal**. 33, 481-491.
- Nagpal, P, Ellis CM, Weber H, Ploense SE, Barkawi LS, Guilfoyle TJ, Hagen G, Alonso JM, Cohen, JD, Farmer, EE, Ecker JR, and Reed JW (2005). Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. **Development** 132, 4107–4118.
- Nitsch JP, Pratt C, Nitsch C, Shaulis NJ. (1960). Natural growth substances in Concord and Concord Seedless grapes in relation to berry development. **American Journal of Botany** 47, 566–576.
- Nitsch LM, Oplaat C, Feron R, Ma Q, Wolters-Arts M, Hedden P, Mariani C, Vriezen WH (2009). Absciscic acid levels in tomato ovaries are regulated by *LeNCED1* and *SICYP707A1*, **Planta**. 229(6):1335-46.
- Okabe Y, Asamizu E, Saito T, Matsukura C, Ariizumi T, Bres C, Rothan C, Mizoguchi T and Ezura H (2011) Tomato TILLING technology: development of a reverse genetics tool for the efficient isolation of mutants from Micro-Tom mutant libraries. **Plant Cell Physiology**. 52, 1994–2005.
- O'Neill SD, Nadeau JA (1997) Post-pollination flower development. **Horticulture Reviews** 19: 1–58
- Olimpieri I, Siligato F, Caccia R, Mariotti L, Ceccarelli N, Soressi GP, Mazzucato A (2007) Tomato fruit set driven by pollination or by the parthenocarpic fruit allele are mediated by transcriptionally regulated gibberellin biosynthesis. **Planta** 226: 877–888
- Omidvar V, Mohorianu I, Dalmay T, Fellner, M (2015). Identification of miRNAs with potential roles in regulation of anther development and male-sterility in 7B-1 male-sterile tomato mutant. **BMC Genomics**, 16(1), 878. <http://doi.org/10.1186/s12864-015-2077-0>
- Ortiz-Moreno FA, Vicentini R, Silva GFF, Silva EM, Carrer H, Rodrigues AP, Nogueira FTS (2013) Global analysis of microtranscriptome reveals a unique composition of small RNAs associated with vegetative axillary bud outgrowth. **Journal Experimental Botany** 64(8):2307-20.
- Pandolfini, T., Molesini, B., and Spena, A. (2007). Molecular dissection of the role of auxin in fruit initiation. **Trends Plant Science**. 12: 327–329.
- Peralta IE, Spooner DM, History, origin and early cultivation of tomato (Solanaceae) In: Razdan MK, Mattoo AK, editors. Genetic improvement of solanaceous crops. Vol. 2. Enfield, NH: Science Publishers; 2007. pp. 1–27. *Tomato*.

- Pino LE, Lombardi-Crestana S, Azevedo MS, Scotton DC, Borgo L, Quecini V, Figueira A, Peres LEP (2010) The Rg1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato 'Micro-Tom' model system. **Plant Methods**, 6:23
- Pnueli L, Carmel-Goren L, Hareven D, Gutfinger T, Alvarez J, Ganai M, Zamir D, Lifschitz E. (1998). The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1. **Development** 125, 1979–1989
- Pnueli L, Gutfinger T, Hareven D, Ben-Naim O, Ron N, Adir N, Lifschitz E. (2001). Tomato SP-interacting proteins define a conserved signaling system that regulates shoot architecture and flowering. **The Plant Cell** 13, 2687–2702
- Ranjan A, Ichihashi Y, Sinha NR (2012). The tomato genome: implications for plant breeding, genomics and evolution. **Genome Biology**, 13(8), 167.
- Raven, P.H., Evert, R.F. & Eicchhorn, S.E. (2007). **Biologia Vegetal**, 7^a. ed. Coord. Trad. J.E.Kraus. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP (2002) MicroRNAs in plants **GENES & Development** 16:1616–1626.
- Reyes J, Chua N (2007) ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. **The Plant Journal** 49, n. 4, p. 592–606.
- Richards, D. E., King, K. E., Ait-ali, T. and Harberd, N. P. (2001). How gibberellin regulates plant growth and development: a molecular genetic analysis of gibberellin signaling. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 52, 67–88
- Ripoll J, Bailey LJ, Mai QA, Wu, SL, Hon CT, Chapman EJ, Yanofsky MF (2015) microRNA regulation of fruit growth. **Nature Plants**, 1(4), 15036.
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. (2002) Prediction of plant microRNA targets. **Cell**. 110(4):513–20.
- Palatnik, J.F., Allen, E., Wu, X.L., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J.C. and Weigel, D. (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. **Nature**, 425, 257–263
- Rubio-Somoza, I., & Weigel, D. (2013). Coordination of Flower Maturation by a Regulatory Circuit of Three MicroRNAs. **PLoS Genetics**, 9(3).
- Saito T, Ariizumi T, Okabe Y, Asamizu E, Hiwasa-Tanase K, Fukuda N, Ezura H (2011) TOMATOMA: A novel tomato mutant database distributing micro-tom mutant collections. **Plant and Cell Physiology**, 52(2), 283–296.
- Salinas M, Xing S, Hohmann S, Berndtgen R and Huijser, P. (2012) Genomic organization, phylogenetic comparison and differential expression of the SBP-box family of transcription factors in tomato. **Planta**, 235, 1171–1184
- Schwab R, Palatnik J, Riester M, Schommer C, Schmid M, Weigel D. (2005) Specific effects of MicroRNAs on the plant transcriptome. **Development Cell** v. 8, n. 4, 517–527
- Serrani JC, Fos M, Atare's A, Garcia-Martinez JL (2007a) Effect of gibberellin and auxin on parthenocarpic fruit growth induction in the cv. Micro-Tom of tomato. **Journal of Plant Growth Regulation** 26, 211–221.
- Serrani JC, Sanjuan R, Ruiz-Rivero O, Fos M, Garca-Martinez JL (2007b) Gibberellin regulation of fruit-set and growth in tomato. **Plant Physiology**. 145, 246–257.
- Seymour, G.B., Ostergaard, L., Chapman, N.H., Knapp, S. and Martin, C. (2013) Fruit development and ripening. **Annual Review Plant Biology**. 64, 219–241.
- Silva, G F F E, Silva, E M, Da Silva Azevedo, M, Guivin M A C, Ramiro D, Figueiredo C R Nogueira F T S. (2014). MicroRNA156-targeted SPL/SBP box transcription factors regulate tomato ovary and fruit development. **Plant Journal**, 78(4), 604–618.
- Y Shinozaki, Shuhei Hao, M Kojima, H Sakakibara, Y Ozeki-lida, Y Zheng, Z Fei S Zhong, J J Giovannoni³, JKC.Rose, Y Okabe, Y Heta, H Ezura, T Ariizumi (2015) Ethylene suppresses tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit set through modification of gibberellin metabolism **Plant Journal** 83, 237–251
- Skinner DJ, Hill TA, Gasser CS (2004) Regulation of ovule development. **Plant Cell** 16
- Srivastava A, Handa AK (2005) Hormonal regulation of tomato fruit development: a molecular perspective. **Journal of Plant Growth Regulation**. 24, 67–82.
- Stevens MA, Rick CM: Genetic and breeding. In: Atherton JG, Rudich J (eds) *The Tomato Crop: A Scientific Basis for Improvement*, pp. 35–109. Chapman and Hall, New York (1986).
- Stout, A.B. 1936. Seedlessness in grapes. New York State Agr. Expt. Sta. (Geneva) Tech. Bul. 238.
- Sundberg, E., & Østergaard, L. (2009). Distinct and dynamic auxin activities during reproductive development. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 1(6), 1–15
- Tanksley SD (2004) The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. **The Plant Cell**, 16, S181–S189.
- Telfer A, Poethig RS. 1998. HASTY: a gene that regulates the timing of shoot maturation in *Arabidopsis thaliana*. **Development** 125:1889–98
- Todesco M, Rubio-Somoza I, Paz-Ares J, Weigel D (2010). A Collection of Target Mimics for Comprehensive Analysis of MicroRNA Function in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS Genetics** 6(7)
- Tomato Genome Consortium (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. **Nature** 485: 635–641
- Tsuji H, Aya K, Ueguchi Tanaka M, Shimada Y, Nakazono, M Watanabe R, Nishizawa N, Gomi K, Shimada A, Kitano H (2006) GAMBY controls different sets of genes and is differentially regulated by microRNA in aleurone cells and anthers. **The Plant Journal**, 47, n. 3, p. 427–444.

- Varkonyi-Gasic, E, Wu R, Wood M, Walton E F, Hellens R P. (2007) Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. **Plant Methods**, New York, v. 3, n. 12, p. 1-12.
- Varoquaux F, Blanvillain R, Delseny M, Gallois P (2000) Less is better: new approach for seedless fruit production. **Trends in Biotechnology** 18, 233-242.
- Vallarino JG, Osorio S, Bombarely A, Casañal A, Cruz-Rus E, Sánchez-Sevilla JF, Valpuesta, V (2015). Central role of FaGAMYB in the transition of the strawberry receptacle from development to ripening. **New Phytologist** doi: 10.1111/nph.13463
- Vaucheret H (2006) Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. **Genes Development** 20:759-771.
- Vida WN, Vidal MRR (2006) **Botânica Organográfica** 4 edição Editora UFV Viçosa
- Vivian-Smith A, Koltunow AM. 1999. Genetic analysis of growth- regulator-induced parthenocarpy in Arabidopsis. **Plant Physiology** 121, 437–451.
- Wang H, Jones B, Li Z, Frasse P, Delalande C, Regad, F, Bouzayen M (2005). The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. **The Plant Cell**, 17(10), 2676–2692.
- Wang L, Li J, Zhao J, He C (2015). Evolutionary developmental genetics of fruit morphological variation within the Solanaceae. **Frontiers in Plant Science**, 6 1–10.
- Wang H, Schauer N, Usadel B, Frasse P, Zouine M, Hernould M, Latche A, Pech JC, Fernie AR, Bouzayen M (2009) Regulatory features underlying pollination-dependent and -independent tomato fruit set revealed by transcript and primary metabolite profiling. **Plant Cell** 21:1428–1452
- Wittwer SH, Bukovac MJ, Sell HM, Weller LE. (1957). Some effects of gibberellin on flowering and fruit setting. **Plant Physiology** 32, 39–41
- Woodger F, Millar A, Murray F, Jacobsen J, Gubler F (2003) The role of GAMYB transcription factors in GA-regulated gene expression. **Journal of Plant Growth Regulation**, 22, n. 2, p. 176-184.
- Wu MF, Tian Q, Reed JW. (2006). Arabidopsis microRNA167 controls patterns of ARF6 and ARF8 expression, and regulates both female and male reproduction. **Development** 133:4211–4218.
- Yamaguchi S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. **Annual Review of Plant Biology** 59, 225–251
- Zanca AS, Vicentini R, Ortiz-Morea AF, Del Bem LEV, Silva MJ, Vicentz M, Nogueira FTS Identification and expression analysis of microRNAs and targets in the biofuel crop sugarcane (2010) **BMC Plant Biology** 10:260
- Zhang J, Chen R, Xiao J, Qian C, Wang T, Li, H, Ye Z. (2007). A single-base deletion mutation in SLIAA9 gene causes tomato (*Solanum lycopersicum*) entire mutant. **Journal of Plant Research**, 120(6), 671–678.
- Zhang M, Yuan B, Leng P. (2009) The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. **Journal of Experimental Botany** 60, 1579–1588.
- Zouine M, Fu Y, Bouzayen M (2013) Characterization of the tomato ARF gene family uncovers a multi-levels post-transcriptional regulation including alternative splicing. **pLOS ONE** 1-12.
- ZUKER M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction **Nucleic Acid Research**, 1;31(13):3406-15.

Anexos: Produção científica e pedagógica durante o período de doutorado.
Tabela de prêmios utilizados no presente trabalho

**Functional and evolutionary analyses of the miR156 and miR529 families
in land plants**

Edna Gicela Ortiz Morea, **Eder Marques da Silva**, Geraldo Felipe Ferreira e Silva,
Guilherme Targino Valente, Carlos Hernan Barrera Rojas, Michel Vincentz and Fabio
Tebaldi Silveira Nogueira.

**microRNA156-targeted SPL/SBP-box transcription factors regulate tomato
ovary and fruit development**

Geraldo Felipe Ferreira e Silva, **Eder Marques Silva**, Mariana da Silva Azevedo, Mike Anderson Corazon Guivin, Daniel Alves Ramiro, Cassia Regina Figueiredo, Helaine Carrer, Lazaro Eustaquio Pereira Peres and Fabio Tebaldi Silveira Nogueira.

Global analysis of the sugarcane microtranscriptome reveals a unique composition of small RNAs associated with axillary bud outgrowth

Fausto A. Ortiz-Morea, Renato Vicentini, Geraldo F.F. Silva, **Eder M. Silva**,
Helaine Carrer, Ana P. Rodrigues and Fabio T.S. Nogueira

MicroRNAs e desenvolvimento vegetal

Eder Marques da Silva, Edna Gicela Ortiz Morea, Carlos Hernán Barrera Rojas, Fábio Tebaldi Silveira Nogueira.

Tabela de oligonucleotídeos utilizados na realização do presente trabalho

Primer	Sequence 5' -> 3')	Utilization	Access	Reference
SlyMIR15 F	CACCGGATCCACCCCTCTCCTCCATCATTT	Construct		
SlyMIR159 R	GCACAAAGATCAAGAATCAAGA	Construct	SL2.40Ch03:617 85401-61787100	This Work
M13 F	GTTTTCCTCAGTCACGAC	Sequencing		
M13 R	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequencing	PROMEGA	PROMEGA
SlyGAMYB1 F	ACCAGACAGAGAACTGGGGT			
SlyGAMYB1 R	GTCATAGCTGTTTCCTG	In situ	Solyc01g009070	This work
miR159 probe		In situ		
SlyTUBULIN F	AACCTCCATTCAGGAGATGTTT	qPCR		
SlyTUBULIN R	TCTGCTGTAGCATCCTGGTATT	qPCR	DQ205342.1	Silva et al., 2014
SlySAND F	TTGCTTGGAGGAACAGACG	qPCR		
SlySAND R	GCAAACAGAACCCCTGAATC	qPCR	Solyc03g115810	Exposito- Rodriguez et al., 2008
SlyGAMYB1 F	ACTCCTCTTCAGAGCCCACA	qPCR		

SlyGAMYB1 R	AATGAAGGAAGAGCCGAATG	qPCR	Solyc01g009070	This work
SlyGAMYB2 F	TCCTTGGGTGTAATTCCTGGC	qPCR		
SlyGAMYB2 R	ACAGCGTCCAACAGACCAC	qPCR	Solyc06g073640	This work
SlyARF8A F	TGACATCGAATGGAAATTCAG	qPCR		
SlyARF8A R	GTCTCTTAGCACTAACAAACAC	qPCR	Solyc03g031970	
miRNA159 F Mature	GCGGCGTTGGATTGAAGGG	qPCR		
miRNA159 RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATAC	RT-PCR/qPCR cDNA synthesis	MI0009974	
miR167 F	CCTGATGAAGCTGCCAGCAT	RT-PCR/qPCR		This work
miRNA167 RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGAGATC	RT-PCR/qPCR cDNA synthesis	MIMAT0007917	This work
Reverse	GTGCAGGGTCCGAGG			Varkonyi-gasic et al., 2007

