

Maria José de Oliveira

Caracterização dos genes que codificam proteínas que contém domínio B-
BOX (BBX) em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)

Characterization of genes encoding B-BOX domain-containing proteins
(BBX) in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)



São Paulo

2022

Maria José de Oliveira

Caracterização dos genes que codificam proteínas que contém domínio B-
BOX (BBX) em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)

Characterization of genes encoding B-BOX domain-containing proteins
(BBX) in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São Paulo, para a
obtenção de Título de Mestre em Ciências, na
Área de Botânica.

Orientadora: Maria Magdalena Rossi

Coorientador: Bruno Silvestre Lira

São Paulo

2022

Ficha Catalográfica

Oliveira, Maria José

Caracterização dos genes que codificam
proteínas que contém domínio B-BOX
(BBX) em tomateiro (*Solanum lycopersicum*
L.)

85 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São Paulo.
Departamento de Botânica.

1. proteínas BBX 2. tomateiro 3. *Solanum*
lycopersicum 4. luz. 5. domínio B-box

I. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biotecnologia. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Maria Magdalena Rossi
Orientadora

Dedicatória

Dedico este trabalho a todas as pessoas que não puderam, por dificuldades da vida, estudar e alcançar seus sonhos.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”

- Marie Curie

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”

-Simone de Beauvoir

Agradecimentos

Em primeiro lugar à Deus, aquele que acredito ser a fonte da vida, sem ele nada disso teria acontecido. Por ter me concedido saúde ao longo do mestrado, e não me desamparaste nos momentos mais difíceis.

A minha excelente orientadora, **Prof^a. Dra. Maria Magdalena Rossi**, pela confiança, e empenho ao longo destes anos. Sempre esteve de prontidão em ajudar e me guiar nesta jornada. Muito obrigada por sempre querer o melhor para mim e este trabalho, por todos os ensinamentos e conselhos. Agradeço por ter me estimulado a pensar criticamente e por ter contribuído para meu amadurecimento profissional, teve grande relevância nesse processo. Tenho orgulho de ser sua aluna e fazer parte de sua carreira, que é e será de grande sucesso.

Ao Dr. Bruno Lira, meu co-orientador, pelas ideias e por tudo o que foi compartilhado, desde a realização dos experimentos até sua disposição em dividir seus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Luciano Freschi, por aceitar ser TT3 em seu laboratório e auxiliar em inúmeras atividades. Gratidão eterna pela indicação da Prof^a Magda como minha orientadora.

Aos colaboradores: Prof. Eduardo Purgatto com as análises de açúcares, ao Prof Tebaldi por conceder o espaço e auxiliar no desenho experimental de floração e a Prof^a Eny por permitir as análises de auxina.

A Prof^a. Gladys, por disponibilizar o microscópio óptico, pela amizade e entusiasmo sempre presente.

A Prof^a. Marie_Anne, pela disponibilidade dos equipamentos multiusuários.

À Silvia, por manter o funcionamento do laboratório impecável, pela ajuda e por todas as conversas e risadas. Ao Grilo, por todo o ensinamento, pelas conversas e conselhos. À Dani, por compartilhar seus conhecimentos. À Lumi, pela troca de experiência, conversas e ajudas diárias. Aos ICs Raquel, Marcelo e Júlia que abraçaram todos os desafios sem perder a alegria e o equilíbrio; ao Gabriel que se juntou ao grupo das BBX, “BOA SORTE”, obrigada pelos momentos que dividimos. Ao Bruno Navarro e a Egle, pelas ajudas nas horas de desespero com o equipamento da Real Time. Ao Marcos Marchesi, pelo auxílio em várias situações, pelos ensinamentos e amizade.

A todos os colegas e ex do GMP; Biocel; Lignin, em especial ao Leydson pela ajuda, conversas e desabafos; da Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal, em especial ao Rafael e Fred, pelas valiosas trocas de informações, conversas e risadas.

À Camila Maluche, por toda a atenção e ensinamento. À Ana Maria, por nossa amizade sincera e pelos momentos que dividimos. Ao Norberto e Camila Neri pelos cafés, conversas e convívio amigável.

A secretária Érika, pelo auxílio nos processos burocráticos.

A todos (as) os funcionários da portaria, que sempre fizeram companhia durante esse período de pandemia e pelos cafés.

Ao pessoal da limpeza por manter o ambiente sempre limpo.

A todo o corpo de funcionários do Departamento de Botânica do IB/USP.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e com bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Agradeço a todos, cada um colaborou de alguma forma com meu crescimento e amadurecimento científico.

A minha avó (in memoriam), que carrego no coração e que foi exemplo de determinação, simplicidade e dignidade. Por ter ensinado que a educação é o melhor caminho. A minha mãe, por me incentivar a estudar e a ser perseverante. Aos meus irmãos, por todo o apoio incondicional. Ao meu esposo, pelo companheirismo, compreensão, e por me ajudar nas horas de estresse. Divido essa dissertação com vocês. Meus méritos vêm dos esforços de vocês em investir, acreditar e incentivar a ir mais longe.

Meus sinceros agradecimentos!

Índice

1. Introdução.....	12
1.1. Sinalização luminosa	12
1.2. O efeito da manipulação da sinalização luminosa sobre a produtividade e qualidade nutricional de frutos de tomateiro	13
1.3. Proteínas BBXs	15
2. Hipóteses e Objetivos	21
3. Capítulo I	22
3.1. Material e Métodos	23
3.1.1. Material vegetal	23
3.1.2. Análise de perfil transcricional	24
3.1.3. Análises dos dados	25
3.2. Resultados	26
3.2.1. Perfil de expressão dos genes <i>SIBBXs</i> dos grupos IV e V	26
3.3. Discussão	35
4. Capítulo II.....	32
4.1. Material e Métodos	33
4.1.1. Cepas bacterianas e vetores	39
4.1.2. Construção do vetor.....	33
4.1.3. Transformação de tomateiro via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	35
4.1.4. Genotipagem das linhagens transgênicas	35
4.1.5 Análise de perfil transcricional.....	36
4.1.6. Condições de crescimento e amostragem.....	37
4.1.7.Avaliação de fluorescência da clorofila.....	39
4.1.8. Abundância plastidial	40
4.1.9. Quantificações de pigmentos por HPLC	40
4.1.10. Quantificação de tocoferóis	41
4.1.11. Quantificações de amido, açúcares solúveis e °BRIX	42
4.1.12 Quantificação hormonal	43
4.1.13. Análises dos dados	44
4.2. Resultados	45
4.2.1. Obtenção das plantas transgênicas.....	45
4.2.2. O silenciamento de <i>SIBBX28</i> afeta o desenvolvimento vegetativo e a floração	47

4.2.3. SIBBX28 atua positivamente sobre o metabolismo e sinalização de auxinas.....	52
4.2.4. O silenciamento do gene SIBBX28 afeta a floração.	56
4.3. Discussão	59
5. Referências	63
6. Anexo 1.....	71
7. Anexo 2.....	85

Resumo

A importância da luz para o desenvolvimento das plantas vai muito além da fotossíntese. Este estímulo ambiental controla desde a germinação até a senescência. Desde a sua percepção, por meio de fotorreceptores, até o desencadeamento da resposta fisiológica, diversos fatores participam da transdução do sinal luminoso. Dentre eles, recentemente, foram identificadas as proteínas portadoras do domínio B-BOX (BBXs). As proteínas BBXs, são fatores de transcrição do tipo dedos de zinco, quase exclusivamente estudadas em *A. thaliana*, que pertencem a uma família que está subdividida em cinco grupos de acordo com o número de domínios B-BOX e à presença de domínio CCT (CONSTANS, CONSTANS-LIKE e TIMING OF CAB1). As proteínas BBX que foram funcionalmente caracterizadas até o momento mostraram ser reguladores de diversos processos tais como fotomorfogênese, regulação fotoperiódica da floração, evitação de sombra e respostas a estresses bióticos e abióticos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo geral, caracterizar os genes que codificam as proteínas que contêm domínio BBX presentes no genoma de *Solanum lycopersicum*. Para isso, foi realizado um detalhado perfil transcricional dos genes *SIBBXs* dos grupos IV e V em folhas e frutos em diferentes estágios de desenvolvimento e em hipocótilos crescidos sob diferentes condições de luminosidade. Os resultados mostraram que os genes *SIBBXs* são modulados transcionalmente pela luz e pelo estado de desenvolvimento dos plastídios (cloroplastos e/ou transição de cloroplasto a cromoplastos). Para aprofundar a compreensão do papel dessas proteínas na fisiologia da planta, foi realizada a caracterização fenotípica do gene *SIBBX28*. O silenciamento constitutivo de *SIBBX28* utilizando a estratégia de RNAi, resultou em plantas de menor porte e com menos flores por inflorescência. Além disso, a deficiência de *SIBBX28* reduziu o alongamento de hipocótilos crescidos no escuro. Utilizando diversas abordagens experimentais, foi possível demonstrar que *SIBBX28* participa do controle do crescimento, floração e estiolamento por meio da regulação do metabolismo e sinalização de auxinas.

Abstract

The importance of light for plant development goes far beyond photosynthesis. This environmental stimulus controls from germination to senescence. From photoreceptors-mediated towards the triggering of the physiological response, several factors participate in the transduction of the light signal. Among them, proteins carrying the B-BOX domain (BBXs) were recently identified. The members of the BBX protein family are zinc finger transcription factors, almost exclusively studied in *A. thaliana*, that cluster into five groups according to the number of B-BOX domains and the presence of a CCT domain (CONSTANS, CONSTANS-LIKE and TIMING OF CAB1). The BBX proteins that have been functionally characterized so far have shown to be regulators of several processes such as photomorphogenesis, photoperiodic regulation of flowering, shade avoidance and responses to biotic and abiotic stresses. In this context, the present work aimed to characterize the genes that encode BBX domain containing proteins present in *Solanum lycopersicum* genome. For this, a detailed transcriptional profile of the *SIBBX* genes of groups IV and V was carried out in leaves and fruits at different stages of development and in hypocotyls grown under different light conditions. The results showed that the *SIBBX* genes are transcriptionally modulated by light and by the developmental state of plastids (chloroplasts and/or chloroplast-to-chromoplast transition). To deepen the understanding of the role of these proteins in plant physiology, we performed the functional characterization of *SIBBX28* gene. The RNAi-mediated constitutive silencing of *SIBBX28* resulted in smaller plants with fewer flowers per inflorescence. Furthermore, *SIBBX28* deficiency reduced dark-grown hypocotyl elongation. By using several experimental approaches, it was possible to demonstrate that *SIBBX28* participates in the control of growth, flowering and etiolation by regulating auxin metabolism and signaling.

1. Introdução

1.1. Sinalização luminosa

A luz é um fator essencial para o crescimento, desenvolvimento e reprodução vegetal, controlando diversos processos tais como a germinação, fotossíntese, fototropismos, estabelecimento e manutenção de ritmos circadianos e floração (Quail 2002; Jiao *et al.* 2007). A percepção do sinal luminoso ocorre por meio de fotorreceptores, tais como fitocromos, UVR8, fototropinas e criptocromos (Gyula *et al.* 2013). Após a percepção, desencadeia-se uma complexa cascata de sinalização, a qual culmina na expressão diferencial de genes e, por fim, na indução de uma dada resposta fisiológica (Demotes-Mainard *et al.* 2016). Os primeiros fotorreceptores identificados foram os fitocromos (PHYs) (Mohr 1972), sendo atualmente os mais extensivamente caracterizados (Butler *et al.* 1959; Clack *et al.* 1994). Os PHYs são compostos por uma apoproteína ligada a um cromóforo (Hahn *et al.* 2006) e atuam como homodímeros, possuindo duas formas de acordo com a luz incidente. A luz vermelha (665 nm) converte os PHYs da forma Pr para Pfr, que é o estado biologicamente ativo. Essa alteração é reversível, pois a luz vermelho-distante (730 nm) pode reverter a forma Pfr à Pr (Inoue *et al.* 2017). A conversão entre as formas se dá devido à isomerização do cromóforo de acordo com o comprimento de onda absorvido que, por sua vez, acarreta em alterações conformacionais na apoproteína. Esta mudança, altera a exposição do domínio de localização nuclear, o qual somente encontra-se exposto na forma Pfr, a qual é, conseqüentemente, a única forma capaz de ser translocada para o núcleo das células (Quail 2002; Nagatani 2004; Chen *et al.* 2005; Fankhauser e Chen 2008).

No núcleo, o Pfr é capaz de regular diversas proteínas através de sua atividade de quinase (Chen e Chory 2011; Shin *et al.* 2016). Um exemplo é a inativação do complexo proteico formado por CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1 (COP1), DETIOLATED1 (DET1), DAMAGE DNA BINDING1 (DDB1) e CULLIN4 (CUL4) (Chory *et al.* 1989). Este complexo, na ausência de luz, induz a degradação proteossômica de diversos fatores promotores da fotomorfogênese, como é o caso do fator de transcrição ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5) (Lau e Deng 2012; Hoecker 2017). Já na presença de luz, o Pfr inibe a COP1, a qual migra para o citoplasma deixando livre o regulador positivo do sinal luminoso HY5 (Hoang *et al.* 2019). Desta

forma, com a inativação do complexo COP1:DET1:DDB1:CUL4, HY5 se liga a motivos regulatórios específicos no DNA, induzindo a expressão de diversos genes envolvidos em processos como alongamento e proliferação celular, desenvolvimento plastidial, acúmulo de pigmentos e assimilação de nutrientes (Gangappa e Botto 2016). Outros reguladores negativos do sinal luminoso são os fatores de transcrição PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR (PIFs). As proteínas PIFs são degradadas na presença de PHYs ativos e se acumulam na ausência de luz regulando negativamente a transcrição de diversos genes envolvidos na fotomorfogênese (Leivar e Quail 2011).

1.2. O efeito da manipulação da sinalização luminosa sobre a produtividade e qualidade nutricional de frutos de tomateiro

O tomateiro, *Solanum lycopersicum* L., pertence à família Solanaceae, seção Lycopersicon, a mesma de diversas outras espécies de importância agrônômica tais como a batata (*Solanum tuberosum*), o tabaco (*Nicotiana tabacum*) e a berinjela (*Solanum melongena*). O fruto desta planta é altamente consumido em todo o mundo tanto em sua forma in natura, como processada. Particularmente, pela importância para a nutrição humana e a biologia dos frutos, *S. lycopersicum* se consolidou como modelo para o estudo da fisiologia de frutos carnosos (Carrari & Fernie 2006). Durante o amadurecimento do fruto, os cloroplastos fotossinteticamente ativos são convertidos em cromoplastos, sendo esse processo marcado pela desorganização do sistema interno de membranas e intensa alteração metabólica. Este processo é acompanhado da degradação de clorofila e do acúmulo de diversos compostos nutracêuticos antioxidantes, tais como vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (VTE, tocoferóis) e carotenoides. Dentre estes últimos, predomina o licopeno, pigmento que determina a característica cor vermelha dos frutos maduros; e a pró- vitamina A, o β -caroteno (Klee & Giovannoni 2011; Egea *et al.* 2010). Desta forma, a importância nutricional do fruto está intimamente ligada à atividade plastidial que, por sua vez, está fortemente regulada pela luz a qual tem papel fundamental na divisão, desenvolvimento e metabolismo dos cloroplastos (Azari *et al.* 2010; Powell *et al.* 2012).

Como mencionado acima, as proteínas SIDET1 (ou HP2) e SIDDB1 (ou HP1) são reguladores negativos da resposta à luz. A perda de função ou a redução da expressão destes fatores resulta no aumento do número e do volume dos cloroplastos,

assim como de maiores teores de clorofilas em frutos verdes, resultando em maiores quantidades de carotenoides, tocoferóis, flavonoides e fenilpropanoides nos frutos maduros (Davuluri *et al.* 2004; Enfissi *et al.* 2010). De forma semelhante, a repressão dos transcritos de outros dois reguladores negativos da transdução do sinal luminoso, o SICUL4 e o SICOP1, resulta no maior acúmulo de carotenoides em frutos maduros de tomateiro (Wang *et al.* 2008; Liu *et al.* 2004).

A modulação da expressão das proteínas SIPIF também afeta a qualidade dos frutos. Foi demonstrado que SIPIF1a e SIPIF4 inibem a expressão de genes envolvidos na carotenogênese reduzindo o acúmulo de carotenoides nos frutos (Llorente *et al.* 2016; Rosado *et al.* 2019). Já a proteína SIPIF3 modula o acúmulo de tocoferóis durante o amadurecimento por meio da inibição transcricional do gene *GERANILGERANIL DIFOSFATO REDUTASE (GGDR)* (Gramegna *et al.* 2018).

Não somente reguladores negativos do sinal luminoso afetam a qualidade nutricional dos frutos de tomateiro, mas também os positivos e fotorreceptores. Foi reportado que os PHYs são essenciais nesse cenário, regulando tanto o acúmulo de açúcares e carotenoides (Bianchetti *et al.* 2018), quanto de vários outros antioxidantes promotores da saúde tais como, tocoferóis e flavonoides (Alves *et al.* 2020). O fator de transcrição GOLDEN2-LIKE 2 (SIGLK2), o qual é essencial para a correta diferenciação e manutenção da atividade plastidial, mostrou exercer um efeito positivo sobre o acúmulo de carotenoides e tocoferóis em frutos (Powell *et al.* 2012; Nguyen *et al.* 2014; Lupi *et al.* 2019). Por fim, o silenciamento constitutivo por RNAi de *SIHY5* reduz os teores de clorofilas e a formação de tilacoides nos cloroplastos de frutos imaturos, bem como diminuiu o conteúdo de carotenoides totais em frutos maduros (Liu *et al.* 2004). O perfil de expressão gênica de plantas mutantes para *SIHY5*, demonstrou que esse regulador controla o amadurecimento e qualidade nutricional por meio da regulação transcricional e traducional de seus genes alvo (Wang *et al.* 2021).

A manipulação do sinal luminoso também tem sido proposta como uma estratégia para aumentar a produtividade em algumas culturas (Xu *et al.* 2020). Alguns exemplos foram reportados para arroz e batata (Tan *et al.* 2016; Sheng *et al.* 2016; Abelenda *et al.* 2016). Particularmente em tomateiro, foi descrito que o silenciamento de *SIPIF4* compromete a produção de frutos devido a sua participação no controle do florescimento (Rosado *et al.* 2019).

No entanto, a maioria destas abordagens manipulam fatores que atuam no início da cascata de percepção e transdução do sinal luminoso, o qual acarreta diversos efeitos

pleiotrópicos. Assim, a intervenção em etapas mais a jusante da sinalização luminosa pode permitir resultados mais precisos. Nesse sentido, as proteínas pertencentes à família de fatores de transcrição BBX (B-BOX), as quais foram caracterizados como reguladores da sinalização luminosa, se apresentam como interessantes alvos para o estudo e eventual manipulação com fins biotecnológicos (Talar e Kielbowicz-Matuk 2021).

Em *Arabidopsis thaliana*, diversas BBXs foram descritas como reguladores do fator de transcrição HY5 ou reguladas por ele. Particularmente interessante é o caso da AtBBX28, um regulador negativo da sinalização luminosa induzido pela luz. Na ausência de luz, AtCOP1 ubiquitina AtHY5 e AtBBX28, resultando na degradação de ambas proteínas pelo proteossoma 26S. Na presença de luz, AtBBX28 interage fisicamente com AtHY5, reduzindo sua capacidade promotora da fotomorfogênese. Desta forma, AtBBX28 atua atenuando a transdução do sinal luminoso dependente de AtHY5 (Lin *et al.* 2018).

Embora haja um crescente acúmulo de informações acerca do papel das BBXs como parte da transdução de sinal luminoso, a maioria está restrita aos processos de estiolamento e desestiolamento de plântulas em *A. thaliana*, sendo escassas as informações em outros processos, e em outras espécies, tema que pretende abordar o presente trabalho.

1.3. Proteínas BBXs

As proteínas BBXs são fatores de transcrição do tipo dedos de zinco que atuam em diversos processos fisiológicos como a fotomorfogênese, regulação fotoperiódica da floração, evitação de sombra e respostas a estresses bióticos e abióticos (Lin *et al.* 2018; Min *et al.* 2015; Crocco *et al.* 2010; Luo *et al.* 2018; Liu *et al.* 2020; Xu *et al.* 2022). Estas proteínas são caracterizadas pela presença de um ou dois domínios B-BOX e pela presença ou ausência do domínio CCT (CONSTANS, CONSTANS-like, TIMING OF CAB1) no extremo C terminal (Khanna *et al.* 2009). A topologia de domínios é o critério utilizado para a subdivisão desta família de fatores de transcrição em cinco grupos estruturais (Grupos I-V). Os membros do grupo I e do grupo II são caracterizados pela presença de dois domínios B-BOX e um domínio CCT. O Grupo III contém um único domínio B-BOX e um CCT. O grupo IV é caracterizado pela presença de dois domínios B-BOX, mas sem domínio CCT. Por fim, o grupo V é composto por

proteínas com apenas um domínio B-BOX (Khanna *et al.* 2009; Gangappa e Botto 2014).

Funcionalmente, tanto o domínio B-BOX quanto o CCT já foram caracterizados como domínios importantes para a atividade de regulação da transcrição gênica das BBXs. Além disto, o B-BOX também é responsável por mediar interações proteína-proteína (Gangappa e Botto 2014), inclusive com COP1 (Song *et al.* 2020), além do sinal de localização nuclear já ter sido identificado neste domínio (Min *et al.* 2015). Já o domínio CCT é importante para o transporte para o núcleo das proteínas de grupo I, II e III (Gendron *et al.* 2012). O motivo VP (VALINA-PROLINA) presente em algumas proteínas BBXs, foi descrito como mediador da interação física com COP1 (Holm *et al.* 2001; Datta *et al.* 2006).

Inicialmente descritas em *A. thaliana*, as proteínas BBXs desta espécie são as mais extensamente caracterizadas, com informação funcional para 26 das 32 AtBBXs identificadas no genoma. Interessantemente, enquanto os membros dos grupos I e II estão maiormente envolvidos no controle da floração, os membros dos grupos IV e V estão mais associados à regulação da fotomorfogênese (Gangappa e Botto 2014; Yadukrishnan *et al.* 2018). O grupo IV inclui 8 membros (AtBBX18-AtBBX25). AtBBX20 (Fan *et al.* 2012; Wei *et al.* 2016), AtBBX21 (Datta *et al.* 2007; Holtan *et al.* 2011), AtBBX22 (Datta *et al.* 2008) e AtBBX23 (Chang *et al.* 2008; 2011) são reguladores positivos da resposta à luz; enquanto AtBBX18 (Wang *et al.* 2013; Zhang X e Lin R 2017), AtBBX19 (Wang *et al.* 2014; 2015), AtBBX24 (Yan *et al.* 2011) e AtBBX25 (Gangappa *et al.* 2013) são reguladores negativos da fotomorfogênese. Essa função antagonica está associada com a capacidade de interagir com HY5 e o efeito que dita interação produz sobre a atividade de HY5 (Gangappa e Botto 2016). Por exemplo, mutações nos domínios BBX de AtBBX21, AtBBX22, AtBBX24 e AtBBX25 impedem a interação com AtHY5. A interação de AtBBX21 e AtBBX22 aumenta a capacidade dos complexos de induzir a expressão dos genes alvo (Datta *et al.* 2007; 2008; Bursch *et al.* 2020). Pelo contrário, a interação de AtBBX24 e AtBBX25 com HY5 gera heterodímeros inativos reduzindo a capacidade dos mesmos de regular a transcrição (Gangappa e Botto 2013). Análises de epístase entre proteínas BBX e COP1 mostraram que AtBBX20, AtBBX21 e AtBBX22 reprimem a ação de COP1; enquanto que AtBBX24 e AtBBX25 a estimulam (Datta *et al.* 2007; 2008; Fan *et al.* 2012; Gangappa *et al.* 2013). O grupo V abrange cinco membros (AtBBX28-AtBBX32), todos reguladores negativos da fotomorfogênese (Song *et al.* 2020; Holtan *et al.* 2011).

AtBBX28 e AtBBX29 interagem fisicamente com HY5 reduzindo sua atividade de indutor transcricional. Por sua vez, HY5 reprime a expressão de *AtBBX30* e *AtBBX31* os quais induzem a expressão de *AtBBX28* e *AtBBX29* (Song *et al.* 2020). Ainda, AtBBX32 interage com o regulador positivo AtBBX21, inativando-o e, reduzindo assim, a capacidade de HY5 de regular a expressão de seus genes alvo (Holtan *et al.* 2011).

Nos últimos anos, o papel das proteínas BBX em outras espécies tem sido investigado. Buscas em escala genômica permitiram a identificação e análise da família BBX em espécie como videira (Wei *et al.* 2020), banana (Chaurasia *et al.* 2016), amendoim (Jin *et al.* 2020), soja (Wu *et al.* 2014), orquídeas (Cao *et al.* 2019), batata (Talar *et al.* 2017), beterraba açucareira (Chia *et al.* 2008), algodão (Cai *et al.* 2017), cinco espécie de Poaceae (*i.e.* milho, arroz, sorgo, *Brachypodium distachyon* e painço; Shalmani *et al.* 2019), e sete espécies de Rosaceae (*i.e.* rosa, pêssigo, maçã, pera, morango, cereja e framboesa; Shalmani *et al.* 2018). Dados de transcriptoma e RT-qPCR em videira indicaram que as proteínas VvBBX desempenham um importante papel no desenvolvimento e amadurecimento dos frutos modulando diversos sinais hormonais (Wei *et al.* 2020). Recentemente, a expressão de genes codificantes para proteínas BBXs regulados pela luz foi associada ao acúmulo de carotenoides em *Cucumis sativus* (Obel *et al.* 2022).

Em *S. lycopersicum*, inicialmente foram identificados 29 genes *SIBBXs*, dos quais alguns foram descritos como responsivos a estresse abiótico e fitohormônios (Chu *et al.* 2016). Em 2019, a proteína SIBBX codificada pelo *locus* Solyc01g110180, chamada de SIBBX20, foi caracterizada funcionalmente. A sobre-expressão do gene resultou em frutos verdes com cloroplastos mais desenvolvidos e conseqüentemente, em frutos maduros com maiores quantidades de carotenoides. Experimentos de transativação, um híbrido e retardo em gel demonstraram que SIBBX20 induz diretamente a transcrição do gene *PHYTOENE SYNTHASE1 (SIPSY1)*, o qual codifica a primeira enzima envolvida na carotenogênese (Xiong *et al.* 2019). A SIBBX20 também mostrou promover o acúmulo de antocianinas em diversos tecidos e órgãos por meio da regulação transcricional do gene codificante da DIHIDROFLAVONOL REDUTASE (Luo *et al.* 2021). Finalmente, o produto do *locus* Solyc01g110180, mostrou também ser responsável pela indução do gene HY5 em resposta à UV-B (Yang *et al.* 2022). Por outro lado, foi descrito que a proteína SIBBX19, codificada pelo *locus* Solyc01g110370, regula o acúmulo de açúcares em frutos uma vez que foi demonstrado

que a mesma interage com o promotor da *ADP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE LARGE SUBUNIT 1*, enzima limitante para a síntese de amido (Veltkamp 2021). Recentemente, a *SlBBX17* codificada pelo *locus* Solyc07g052620, foi caracterizada como um regulador negativo do crescimento vegetativo e que aumenta a tolerância ao calor em tomateiro (Xu *et al.* 2022).

Um estudo recente do nosso grupo realizou uma nova busca por proteínas BBXs codificadas no genoma de tomateiro, identificando 31 genes *SlBBXs* (Lira *et al.* 2020). Uma análise filogenética com sequências de *S. lycopersicum* e *A. thaliana* revelou a distribuição dos genes em cinco grupos, de forma semelhante ao reportado para as BBXs de *A. thaliana*. Interessantemente, foi identificado no grupo II um sub-grupo, nomeado grupo VI, que divergiu perdendo o domínio CCT, embora vestígios do mesmo possam ainda ser identificados (Figura 1). Através de uma análise filogenética mais ampla com sequências de *S. lycopersicum*, *A. thaliana*, Chlorophytas (*Volvox carteri*, *Volvox carteri f. nagariensis*, *Ostreococcus tauri*, *Ostreococcus lucimarinus* CCE9901, *Micromonas pusilla* CCMP1545, *Micromonas commoda*, *Coccomyxa subellipsoidea* C-169, *Chlorella variabilis*, *Chlamydomonas reinhardtii*) e proteínas de *Homo sapiens* com domínio B-BOX como grupo externo, foi sugerido um modelo para explicar a história evolutiva das proteínas BBX (Figura 2). Segundo este, o ancestral dos organismos fotossintetizantes possuiria um gene com somente um domínio B-BOX. Antes da divergência de Chlorophyta, houve uma duplicação deste gene ancestral, adquirindo um segundo domínio no clado que originou as sequências de estrutura IV e adquirindo o domínio CCT no clado ancestral dos outros quatro grupos. Após a divergência de Chlorophyta, um evento de duplicação gênica com ganho de um segundo domínio B-BOX originou o grupo estrutural I. Posteriormente, o grupo estrutural III divergiu sem aquisição de novos domínios, enquanto que um segundo domínio-BOX surgiu independentemente no ancestral dos grupos II e V, sendo que neste último, tanto o domínio CCT quanto o segundo B-BOX foram perdidos após divergência do grupo II (Lira *et al.* 2020).

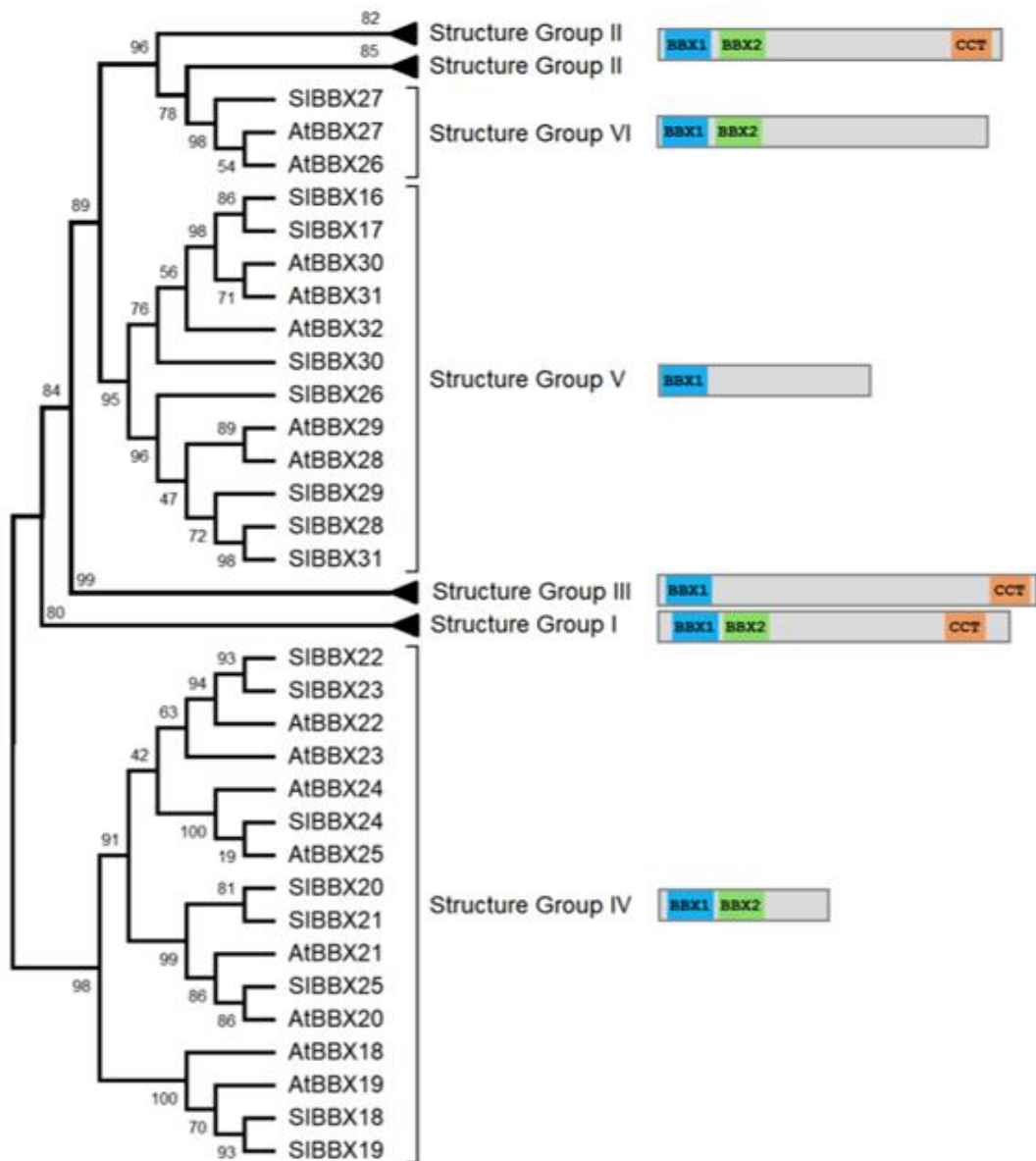


Figura 1: Análise filogenética das proteínas BBX de *A. thaliana* e *S. lycopersicum*. Reconstrução filogenética obtida a partir do alinhamento das proteínas BBX de *A. thaliana* e *S. lycopersicum*. Os grupos foram nomeados de acordo com os grupos de estrutura descritas em *A. thaliana* e a distribuição dos domínios de cada clado foi determinada usando a sequência consenso. Estão detalhados os grupos IV e V que possuem o maior número de proteínas BBXs descritas como reguladoras do sinal luminoso. Retirado de Lira *et al.* (2020).

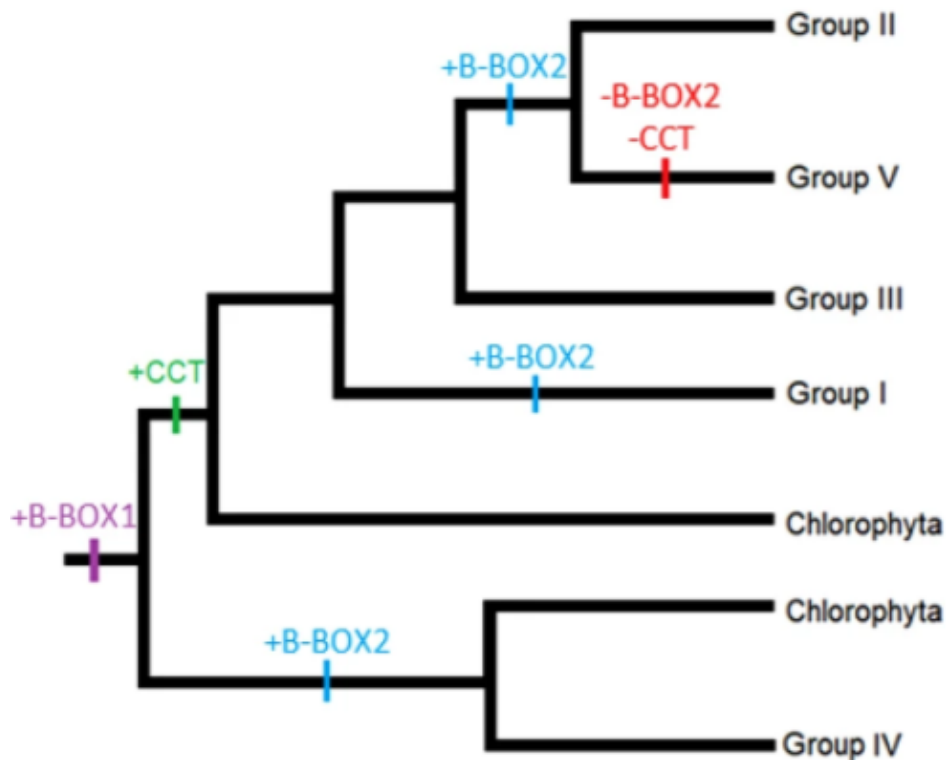


Figura 2: Modelo proposto para explicar a história evolutiva da família de proteínas BBX. Os domínios B-BOX1 e CCT mostram terem origens únicas, enquanto que o domínio B-BOX2 tem origens independentes em três diferentes clados, sendo perdido juntamente com o domínio CCT no grupo estrutural V. Retirado de Lira *et al.* (2020).

A partir dos dados da árvore filogenética (Figura 1), foi possível identificar os genes *SIBBXs* pertencentes aos grupos IV e V, os quais agrupam a maior parte das BBXs caracterizadas como integrantes da transdução do sinal luminoso, bem como possíveis ortólogos para a proteína AtBBX28, genes estudados no presente trabalho. Assim, considerando a importância da transdução do sinal luminoso para a determinação da qualidade nutricional e produtividade em tomateiro, e das proteínas BBXs nesta rota de sinalização, o aprofundamento da caracterização destas proteínas nesta espécie é um campo promissor de estudos capazes de fornecer subsídios para futuras estratégias biotecnológicas.

2. Hipóteses e Objetivos

Este trabalho tem como hipótese que as proteínas que contém domínio B-BOX (BBX) pertencentes aos grupos IV e V participam da sinalização luminosa afetando o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de tomateiro. Desta forma, objetiva-se:

i) Caracterizar o perfil de expressão dos genes *SIBBX* de grupo IV e V durante o estiolamento e desestiolamento de plântulas, em folhas fonte e dreno, e durante o desenvolvimento e amadurecimento de frutos.

ii) Obter e caracterizar fenotipicamente plantas transgênicas silenciadas para o gene *SIBBX28*.

3. CAPÍTULO I

Caracterização do perfil de expressão dos genes *SIBBX* de grupo IV e V durante o estiolamento e desestiolamento de plântulas, em folhas fonte e dreno, e durante o desenvolvimento e amadurecimento de frutos.

Os resultados deste capítulo compõem parte da publicação:

- Lira BS, **Oliveira MJ**, Shiose L, Wu RTA, Rosado D, Lupi ACD, Freschi L, Rossi M (2020). Light and ripening-regulated BBX protein-encoding genes in *Solanum lycopersicum*. *Scientific Reports* DOI: 10.1038/s41598-020-76131-0 (Anexo 1).

Em particular, os dados produzidos neste trabalho estão apresentados no tópico: “The expression pattern of groups IV and V *SIBBX* genes is influenced by the stage of plastid development in both vegetative and fruit tissues” (Figura 3, Figura Suplementar 2 e 3, e Tabela Suplementar 3 e 4).

3.1. Material e Métodos

3.1.1. Material vegetal

O trabalho foi desenvolvido utilizando a espécie *S. lycopersicum* cv Micro-Tom, portadora do alelo selvagem do gene *SIGLK2* (chamado de *wild type*, WT). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação de nível 1 de biossegurança (NBI) no Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, em vasos de 2 L contendo terra vegetal e vermiculita (1:1) suplementado com NPK 10:10:10, calcário dolomítico e termofosfato magnésiano (Yoorin[®]), sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 3^\circ\text{C}$) e naturais de iluminação ($250\text{-}350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), bem como irrigação manual diária por capilaridade.

Para analisar o perfil transcricional dos 15 genes *SIBBX* dos grupos IV e V (Lira *et al.* 2020) foram coletados folhas, frutos e plântulas descritos a seguir. Folhas foram obtidas do 4° (fonte) e 8° (dreno) fitômero contando da base para o ápice de plantas com 40 dias de idade. Frutos em seis estágios de desenvolvimento foram coletados: dois estágios de verde imaturo (IG3: 8 dias após a antese e IG5: 15 dias após a antese); verde maduro (MG: quando a placenta apresenta aspecto gelatinoso, 26 dias após a antese); *breaker* (BR: início do processo de amadurecimento, quando o fruto apresenta os primeiros sinais de amarelamento, aproximadamente 32 dias após a antese); BR 3 (3 dias após BR, os frutos apresentam coloração alaranjada); e BR 5 (5 dias após BR). Os frutos foram seccionados em 3 partes, a porção media foi descartada e foram coletadas as regiões pedicelar, onde os cloroplastos estão mais desenvolvidos, também conhecida como "ombro verde" e; estilar, com cloroplastos pouco desenvolvidos. Ao menos quatro réplicas biológicas consistindo em um *pool* de material de no mínimo, cinco folhas ou frutos de diferentes plantas foram coletadas para todos os experimentos. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, e armazenadas em freezer -80°C até o processamento.

Para o ensaio com plântulas, sementes WT foram inoculadas em meio MS (Murashige e Skoog 1962) e mantidas em sala de cultivo em frascos com tampa, sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$). Os frascos foram mantidos no escuro por 4 dias para germinação, então, metade permaneceram na ausência de luz e outra metade foram mantidas em fotoperíodo (12/12). Após 4 dias, foram coletados os

hipocótilos e os cotilédones de ambas as condições. A coleta do experimento na luz foi realizada na metade do período luminoso. A coleta do experimento mantido no escuro, foi feita em ambiente iluminado com luz verde. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, e armazenadas em freezer -80°C até o processamento.

3.1.2. Análise de perfil transcricional

Extração de RNA total e síntese de DNA complementar (cDNA)

Alíquotas de 100 mg de material vegetal fresco macerado em nitrogênio líquido foram submetidas a extração de RNA total utilizando o kit ReliaPrep™ RNA Miniprep System (PROMEGA), seguindo protocolo recomendado pelo fabricante. As amostras de RNA foram ressuspensas em 30µL de água livre de RNase e, sua concentração e integridade foram avaliadas por espectrofotômetro Nanodrop e eletroforese em gel de agarose 1% com TBE 0,5 X, respectivamente. Foram selecionadas amostras de alta qualidade, com razão de OD maior ou igual a 1,8 (260/280 nm) e 1,9 (260/230 nm). Para eliminação de DNA genômico contaminante, 1µg de cada amostra de RNA foi submetido a tratamento com DNase I (Life Technologies).

A síntese de cDNA foi realizada com o kit SuperScript® IV Reverse Transcriptase (Life Technologies) utilizando *random primers* como iniciadores, de acordo com as recomendações do fabricante.

A presença ou ausência de contaminação genômica foi verificada por PCR, utilizando iniciadores para o gene *SIEXPRESSED* (Anexo 2) que anelam em éxons diferentes. Para essas reações, foram utilizados 0,4 nM de cada dNTP, 0,4 µM de cada iniciador, 50 ng de cDNA, 2,5 mM de MgCl₂ e 1X PCR buffer e 1 U de enzima Taq DNA polimerase® (Invitrogen). As condições de amplificação utilizadas foram de 94°C por 10 min: 35 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 56°C, 1 min a 72°C; e uma extensão final a 72°C por 10 min. O tamanho esperado do fragmento correspondente ao DNA genômico é de 300 pb e do cDNA de 200 pb, desta forma é possível verificar a presença de contaminação após eletroforese em gel de agarose 2% com TBE 0,5 X dos produtos de amplificação. Por fim, as amostras de cDNA foram diluídas na proporção 1:10, obtendo-se a concentração final de aproximadamente 5 ng de RNA transcrito-reverso/µL.

Análise por PCR quantitativa de produtos de transcriptase reversa (RT-qPCR)

As reações foram feitas com 2 μ L da diluição 1:10 de cDNA, 0,2 μ M de cada iniciador e 1X POWER SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) em volume final de 10 μ L, utilizando o QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR system (Applied Biosystems). O programa de amplificação foi 95°C por 10 min; e 40 ciclos de 95°C por 15 s, 56°C por 30 s e 72°C por 30 s (momento no qual ocorre a aquisição do sinal emitido pelo SYBR Green). Para obter os valores do ciclo de quantificação (Cq) e calcular a eficiência de cada par de iniciadores, os dados de fluorescência absoluta foram analisados com o software LinRegPCR (Ruijter *et al.* 2009). Para a normalização, foi utilizada a média geométrica dos genes constitutivos, *SIEXPRESSED* e *SITIP41* (Anexo 2), e os cálculos de normalização, foram feitos conforme descrito por Quadrana *et al.* (2013).

3.1.3. Análises dos dados

As diferenças nos parâmetros foram avaliadas estatisticamente utilizando o software Infostat (www.infostat.com). A distribuição normal dos dados foi averiguada pelo teste de Shapiro-Wilks. Quando normal, a comparação entre os genótipos foi realizada através do teste t-Student ($P < 0,05$). Caso contrário, a comparação foi realizada pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis ($P < 0,05$).

3.2. Resultados

3.2.1. Perfil de expressão dos genes *SIBBXs* dos grupos IV e V

Para investigar a ligação entre as proteínas *SIBBX* e a sinalização luminosa foi analisado o perfil transcricional dos 15 genes *SIBBX* pertencentes aos grupos de estrutura IV e V (Lira *et al.* 2020) em vários órgãos que possuem plastídios em diferentes estágios de desenvolvimento regulados pela luz: folhas fonte e dreno, plântulas estioladas e desestioladas, e frutos em diferentes estágios de desenvolvimento (Rosado *et al.* 2019; Melo *et al.* 2016; Bianchetti *et al.* 2017).

O padrão de expressão mostrou níveis maiores de mRNA nas folhas fonte do que nas folhas dreno para ambos os grupos, com exceção dos genes *SIBBX25* e *SIBBX30*, para os quais não houve diferença (Figura 3).

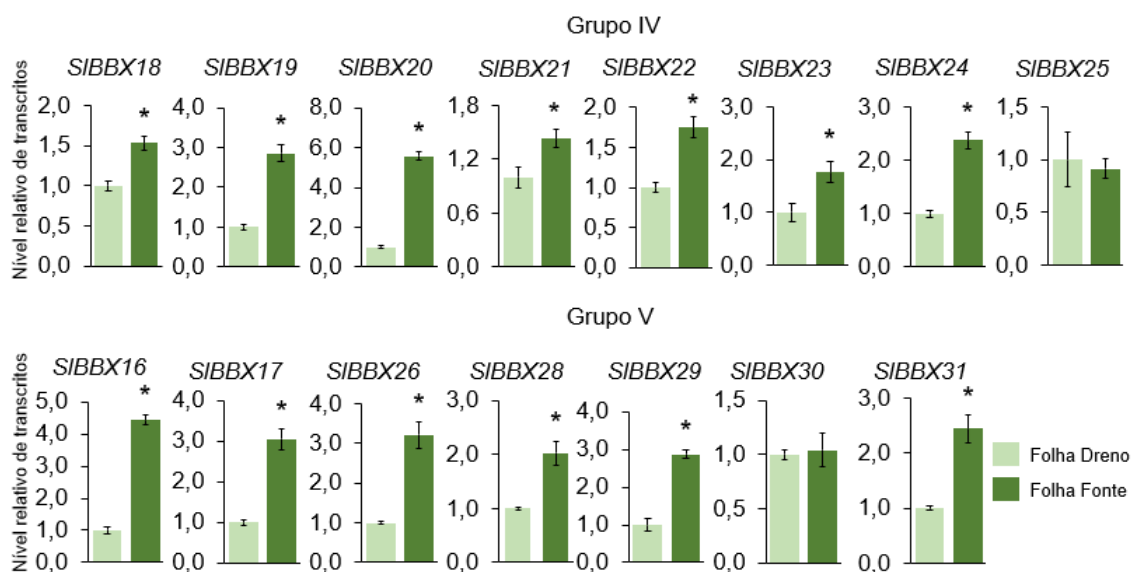


Figura 3. Expressão dos genes *SIBBXs* dos grupos de estrutura IV e V em folhas. Representação gráfica do nível relativo de transcritos dos genes *SIBBXs* dos grupos IV e V em folhas fonte (4° fitômero) e dreno (8° fitômero) de plantas com 40 dias de idade. Os valores são médias \pm EP de pelo menos quatro réplicas biológicas normalizadas em relação à amostra de folha dreno. Asteriscos representam diferenças estatísticas significativas em relação à amostra de folha dreno ($P < 0,05$).

O perfil de mRNA durante o estiolamento e o desestiolamento de plântulas mostrou diferentes padrões (Figura 4). Os genes *SIBBX18* e *SIBBX24* (grupo IV), e *SIBBX16*, *SIBBX17*, *SIBBX28*, *SIBBX29*, *SIBBX30* e *SIBBX31* (grupo V), apresentaram indução pela luz em hipocótilos e/ou cotilédones. Já os genes *SIBBX19*, *SIBBX20*, *SIBBX22* e *SIBBX25* (grupo IV) foram reprimidos pela luz em hipocótilos e/ou cotilédones. Os genes *SIBBX21* (grupo IV) e *SIBBX26* (grupo V) apresentaram padrão

inverso em resposta à luz, ou seja, redução em hipocótilo e indução em cotilédone. Apenas o gene *SIBBX23* não foi responsivo ao tratamento luminoso, se comparando ambos os órgãos na luz e escuro. Finalmente, os únicos genes que mostram incrementos dos níveis de mRNA em ambos os órgãos em respostas à luz foram os genes *SIBBX18* (grupo IV) e *SIBBX28* (grupo V).

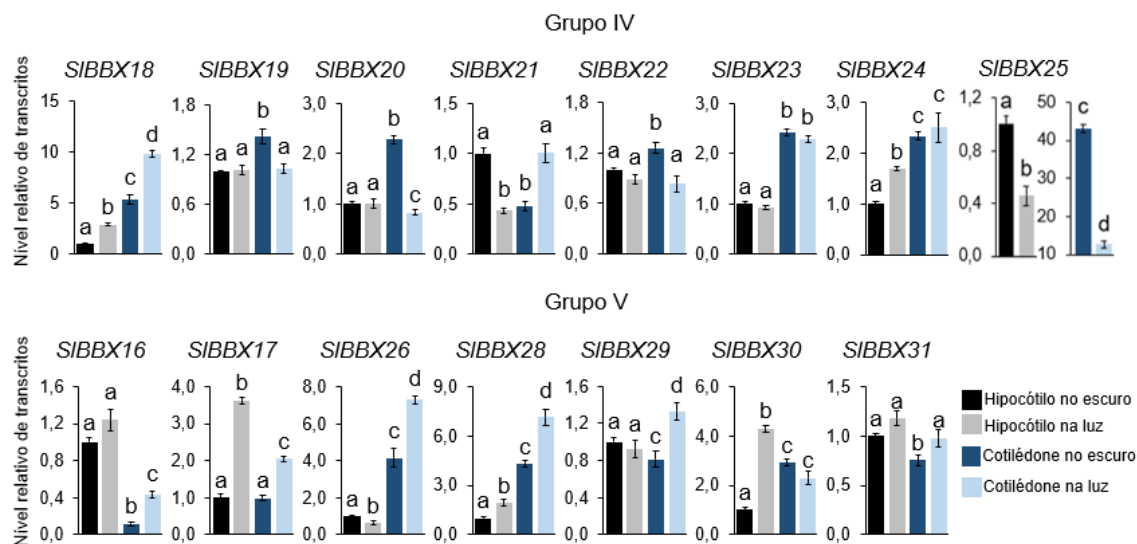


Figura 4. Expressão dos genes *SIBBXs* dos grupos de estrutura IV e V em plântulas. Representação gráfica do nível relativo de transcritos dos *SIBBXs* em hipocótilos e cotilédones estiolados e desestiolados. Os valores são médias \pm EP de pelo menos quatro réplicas biológicas normalizadas em relação à amostra de hipocótilo no escuro. Diferentes letras, representam diferenças estatísticas significativas em relação à amostra de hipocótilo no escuro ($P < 0,05$).

Por último, verificou-se o padrão de expressão dos genes *SIBBXs* ao longo do desenvolvimento e amadurecimento dos frutos. O genótipo utilizado possui o alelo selvagem do gene *SIGLK2*, o qual apresenta um gradiente de expressão e, conseqüentemente, de desenvolvimento de cloroplastos da região pedicelar em direção a base do fruto (Powell *et al.* 2012). Desta forma, os frutos foram seccionados em três porções: pedicelar (com maior número e desenvolvimento de cloroplastos), media (região de transição) e estilar (com menor número e desenvolvimento de cloroplastos). O perfil de mRNA foi analisado nas porções pedicelar e estilar.

De forma geral, o padrão de expressão foi semelhante em ambas as porções dos frutos (Figura 5). O gene *SIBBX31* (grupo V) teve redução dos níveis de mRNA nos estágios verdes, e apresenta um aumento acentuado a partir do estágio verde maduro, não ultrapassando os níveis detectados nos estágios imaturos. De forma contrária, a expressão de *SIBBX17* e *SIBBX30* (grupo V) apresentou aumento nos estágios verdes, diminuindo ao longo do amadurecimento. Interessantemente, os genes *SIBBX19* (grupo IV), *SIBBX20* (grupo IV) e *SIBBX26* (grupo V) apresentaram um aumento claro da

expressão no início do amadurecimento a partir do estágio verde maduro; enquanto que os níveis de mRNA de *SIBBX16* (grupo V), *SIBBX28* (grupo V) e *SIBBX29* (grupo V) foram maiores nos frutos imaturos, declinando gradativamente conforme progressão do amadurecimento.

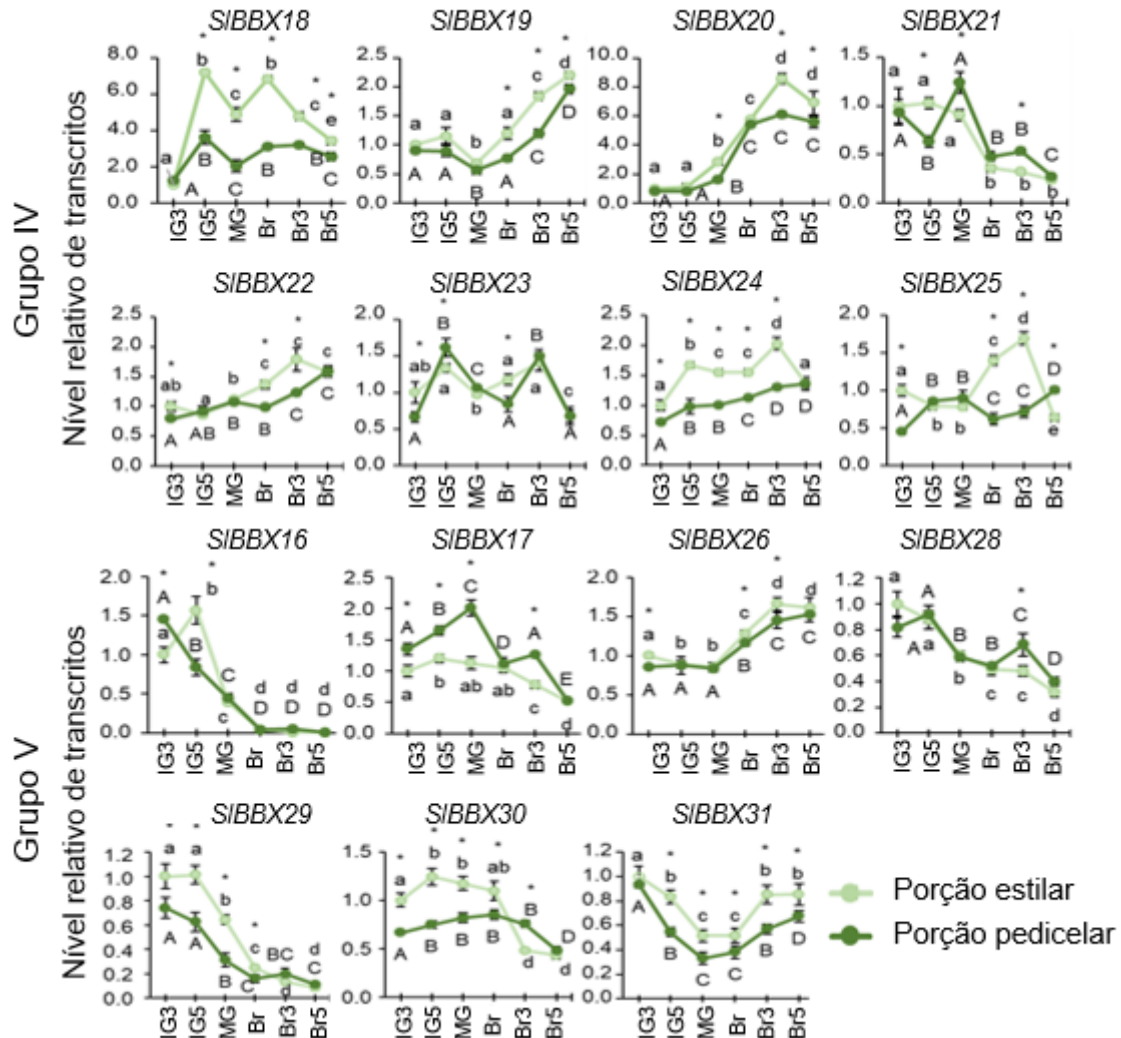


Figura 5. Expressão dos genes *SIBBXs* dos grupos de estrutura IV e V em frutos. Representação gráfica do nível relativo de transcritos dos *SIBBXs* nas porções pedicelar e estilar ao longo do desenvolvimento e amadurecimento dos frutos. Os valores são médias \pm EP de pelo menos 4 réplicas biológicas normalizadas em relação à amostra estilar de IG3. Diferentes letras maiúsculas e minúsculas indicam diferenças estatísticas significantes entre os estágios nas porções pedicelar e estilar, respectivamente. Asteriscos indicam diferenças estatísticas entre as porções dos frutos para um mesmo estágio. IG3: verde imaturo 3; IG5: verde imaturo 5; MG: verde maduro; BR: breaker; BR 3: 3 dias após BR; BR 5: 5 dias após BR.

Quando comparada a abundancia relativa de transcritos dos genes *SIBBXs* dos grupos IV e V, entre os quatro órgãos analisados, não foi observada nenhuma especificidade evidente (Figura 6). Os genes mostraram maior expressão nas folhas fontes e nos cotilédones, com exceção do *SIBBX20* e *SIBBX22*, os quais foram mais expressos em hipocótilos na luz e na porção estilar do fruto IG3 respectivamente. Nos frutos verde imaturos, os genes *SIBBX16* e *SIBBX17* mostraram aumento na região

pedicelar; de forma contrária, os genes *SIBBX22*, *SIBBX23*, *SIBBX24*, *SIBBX25*, *SIBBX26*, *SIBBX29* e *SIBBX30* apresentaram maior abundância de mRNA na porção estilar. Finalmente, o nível de transcritos dos genes *SIBBX18*, *SIBBX19*, *SIBBX20*, *SIBBX21*, *SIBBX28* e *SIBBX31* não mostraram diferenças entre as duas porções dos frutos.

Portanto, os resultados indicam que o padrão de transcrição dos 15 genes *SIBBXs* em folhas, hipocótilos, cotilédones e frutos varia com a abundância, estágio de desenvolvimento e tipo de plastídios.

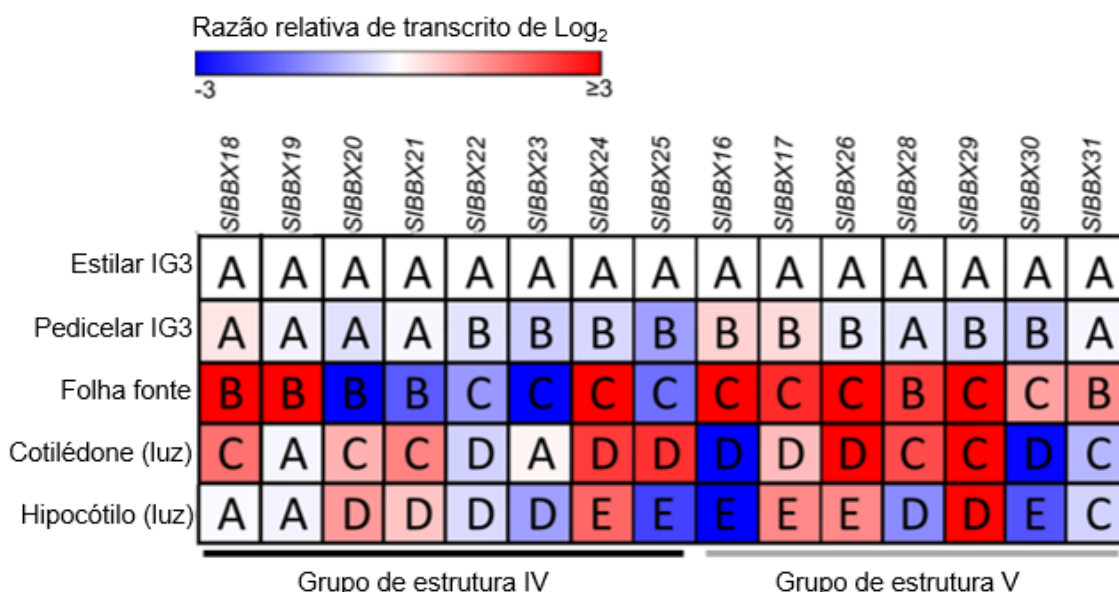


Figura 6: Abundância relativa de transcritos dos grupos de estrutura IV e V entre os órgãos de tomate. Representação de mapa de calor do nível de transcritos de cada gene *SIBBXs*, dos grupos IV e V entre os quatro órgãos analisados. Os valores são médias \pm EP de pelo menos 4 réplicas biológicas normalizadas em relação à amostra da porção estilar de IG3. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre os órgãos.

3.3. Discussão

Nos últimos anos, as proteínas com domínio B-BOX têm sido identificadas em diversas culturas como: arroz, maçã, milho, pera, rosa, pêssego, morango, cereja, framboesa, batata, algodão, videira, amendoim, banana, soja, beterraba açucareira, alho-poró e tomateiro (Talar e Kiełbowicz-Matuk 2021). No entanto a maioria dos trabalhos que caracterizaram funcionalmente os genes *BBX* estudam seu papel na fotomorfogênese em plântulas e na floração de *A. thaliana* (Song *et al.* 2020).

Para ampliar o conhecimento acerca das proteínas BBXs, estudou-se em tomateiro o padrão transcricional dos 15 genes *SIBBXs* que codificam proteínas pertencentes aos grupos IV e V em quatro órgãos: folhas, hipocótilos, cotilédones e frutos (Figuras 3, 4 e 5). O acúmulo de mRNA entre os diferentes órgãos analisados revelou maior abundância de transcritos em folhas fonte ou cotilédones para a maioria dos genes *SIBBXs* testados (Figura 6), estando de acordo com o perfil previamente descrito nesta espécie (Chu *et al.* 2016). Na maioria dos casos, detectou-se maiores níveis de mRNA em folhas fonte do que em folhas dreno, isto é indicativo de uma possível correlação entre a expressão destes genes com o número e atividade dos cloroplastos (Figura 3). A respeito da responsividade à luz, os genes *SIBBXs* de grupo IV e V se mostram, de forma geral, responsivos ao sinal luminoso uma vez que dos 15 genes analisados, 8 foram induzidos (*SIBBX16*, *SIBBX17*, *SIBBX18*, *SIBBX24*, *SIBBX28*, *SIBBX29*, *SIBBX30* e *SIBBX31*) e 4 (*SIBBX19*, *SIBBX20*, *SIBBX22* e *SIBBX25*) reprimidos pela luz (Figura 4). Adicionalmente, estes resultados estão alinhados com os obtidos em folhas, fornecendo indícios extras para uma relação entre acúmulo de mRNA dos genes *SIBBXs* dos grupos de estruturas IV e V e a biogênese e diferenciação de plastídios.

Ao longo do desenvolvimento e amadurecimento dos frutos, o acúmulo de mRNA dos genes *SIBBXs* testados revelou diversos padrões, similar ao relatado para videira (Wei *et al.* 2020), e cereja (Wang *et al.* 2021). Dois padrões se mostraram particularmente interessantes: acúmulo de transcritos nos estágios verdes com redução ao longo do amadurecimento (*SIBBX16*, *SIBBX28* e *SIBBX29*); e indução do acúmulo conforme o amadurecimento progride (*SIBBX19*, *SIBBX20* e *SIBBX26*). Com exceção de *SIBBX19* e *SIBBX26*, o perfil de acúmulo de mRNA observado neste trabalho foi de acordo com o reportado em tomateiro por Chu *et al.* (2016). Estes dados reforçam ainda

mais as evidências de modulação transcricional dos genes *SIBBXs* pelo estado de desenvolvimento dos plastídios (cloroplastos e/ou transição de cloroplastos a cromoplastos).

Coletivamente, os resultados obtidos fornecem informação sobre o papel das proteínas *SIBBX* em processos fisiológicos regulados por luz, além da fotomorfogênese de plântulas, e permitem a identificação de possíveis candidatos de reguladores do desenvolvimento e/ou amadurecimento de frutos de tomateiro para caracterização funcional.

4. CAPÍTULO II

Obtenção e caracterização fenotípica de plantas transgênicas silenciadas para o gene *SIBBX28*.

Os resultados deste capítulo compõem um artigo que foi submetido para publicação na revista Plant Molecular Biology.

-Lira BS, **Oliveira MJ**, Shiose L, Vicente MH, Ponciano G, Floh EIS, Purgatto E, Nogueira FTS, Freschi L, Rossi M. *SIBBX28* positively regulates plant growth and flower number in an auxin-mediated manner in tomato.

4.1. Material e Métodos

4.1.1. Cepas bacterianas e vetores

Para obtenção das plantas transgênicas silenciadas para *SIBBX28*, foram utilizadas as seguintes cepas bacterianas e vetores plasmidiais:

***Escherichia coli* cepa DH10B:** Todos os cultivos foram realizados em meio LB (Luria-Bertani Medium, Sambrook *et al.* 1989) a 37°C e os cultivos líquidos sob agitação de 200 rpm. Para a transformação da cepa com vetor plasmidial, foi adicionado o antibiótico de seleção adequado ao meio de cultivo.

***Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA101:** Esta cepa possui resistência a rifampicina (25 mg/mL) e canamicina (50 mg/mL). As bactérias foram cultivadas em meio YEP (extrato de levedura e peptona) com antibióticos a 28°C e os cultivos líquidos sob agitação de 200 rpm. Para transformação da cepa com vetor plasmidial, foi adicionado o antibiótico de seleção adequado ao meio de cultivo.

pCR8/GW/TOPO: Vetor linearizado com resíduo de timina na extremidade 3', o que permite a inserção de fragmentos de PCR com resíduos de adenosina em 3'. Possui os sítios attL1 e attL2 para recombinação sítio-específico com um vetor destino (sistema Gateway®); confere resistência a espectinomicina (100 mg/mL) / estreptomicina (300 mg/mL).

Vetor binário pK7GWIWG2 (I): Vetor binário que possui o promotor CaMV 35S; dois pares de sítios attR1 e attR2, para recombinação sítio-específico no sistema Gateway®, separados por um íntron e arranjados de maneira invertida, permitindo a expressão de um mRNA que formará um grampo; e terminador 35S. Confere resistência a espectinomicina (100 mg/mL) / estreptomicina (300 mg/mL) em bactérias, e a canamicina (50 mg/mL) em plantas.

4.1.2. Construção do vetor

Um fragmento de 293 pares de bases do gene *SIBBX28* foi escolhido para ser expresso de forma constitutiva no vetor pK7GWIWG2(I) (Karimi *et al.* 2002), para a indução do silenciamento via RNA de interferência (RNAi). Para evitar eventual co-silenciamento, a especificidade do fragmento foi checada utilizando a sequência em

uma busca por BLAST contra o banco de dados da plataforma Sol Genomics Network (www.solgenomics.net).

A partir do cDNA de plântulas de *S. lycopersicum* (cv Micro-Tom), o fragmento de 293 pb do *SIBBX28*, foi amplificado por PCR utilizando 50 ng de cDNA, 0,4 mM de cada dNTP, 0,4 μ M de cada iniciador específico (Anexo 2), 2,5 mM de MgCl₂, 1X PCR buffer e 1 U de enzima Taq® DNA polimerase (Invitrogen). O programa de amplificação utilizado inicialmente foi de 94°C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 30 s, 56°C por 30 s, 72°C por 30 s e; uma extensão final a 72°C por 10 min. O produto foi verificado por meio de eletroforese em gel de agarose 1 % com TBE 0,5 X. O fragmento foi purificado utilizando o kit “GFX PCR DNA and gel purification” (GE Healthcare) e inserido no vetor pCR8/GW/TOPO (Invitrogen) segundo especificações do fabricante. Alíquotas de 50 μ l de *E. coli* DH10B competentes foram transformadas com 2 μ l do produto de ligação. A mistura foi mantida no gelo por 30 min e submetida a choque térmico de 45 s a 42°C e 2 min no gelo. Após esta etapa, 500 μ l de meio SOC foram adicionados e as bactérias incubadas por 45 min a 37°C com agitação. A amostra foi centrifugada por 5 min a 3.000 rpm a temperatura ambiente, 300 μ l do sobrenadante foram descartados e o restante foi ressuspenso e plaqueado em LB ágar com espectinomicina e estreptomicina. As placas foram mantidas por 16 h a 37°C. Colônias isoladas foram crescidas em 3 mL de LB líquido com espectinomicina e estreptomicina por 16 h a 37°C com agitação para confirmação da presença do fragmento de interesse por meio de PCR com os iniciadores universais M13F e M13R (Anexo 2). A partir de um clone positivo, DNA plasmídial foi purificado com QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) e o fragmento de interesse sequenciado com os mesmos iniciadores. Após confirmação, o fragmento foi amplificado por PCR a partir do vetor de entrada com os iniciadores universais M13F e M13R, purificado e recombinado no vetor binário pK7GWIWG2 (I) (Karimi *et al.* 2002), utilizando a enzima LR clonase (Invitrogen). Os clones obtidos foram analisados por PCR com os iniciadores 35S Terminador e BBX28-RNAi F e sequenciados. Após a confirmação da identidade, a construção 35S::*SIBBX28* - RNAi (Figura 7) foi inserida em *A. tumefaciens* segundo protocolo de Wen-Jun e Forde (1989).

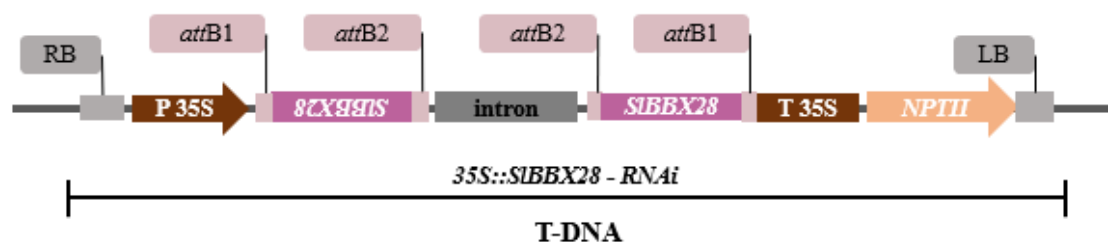


Figura 7: Detalhe do T-DNA do vetor 35S::SIBBX28 – RNAi utilizado para obtenção de plantas silenciadas para *SIBBX28*. O silenciamento foi realizado por meio da estratégia de RNA de interferência (RNAi) utilizando o sistema Gateway® e o vetor pK7GWIWG2 (I). RB e LB: bordas direita e esquerda; P35S: promotor; T35S: terminador; *attB*: sítios de recombinação gerados após a recombinação dos sítios attL x attR; *NPTII*: gene de resistência a canamicina; *SIBBX28*: fragmento do gene alvo de 293pb.

4.1.3. Transformação de tomateiro via *Agrobacterium tumefaciens*

Para a transformação foi utilizada a espécie *S. lycopersicum* (cv. Micro-Tom) portadora do alelo selvagem do gene *SIGLK2* (chamado de *wild type*, WT). A transformação foi realizada via *A. tumefaciens* de acordo com o protocolo descrito por Pino *et al.* (2010). As plantas regenerantes foram cultivadas em casa de vegetação de nível 1 de biossegurança (NB1) no Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, em vasos de 2 L contendo terra vegetal e vermiculita (1:1) suplementado com NPK 10:10:10, calcário dolomítico e termofosfato magnésiano (Yoorin®), sob condições controladas de temperatura ($25\pm 3^{\circ}\text{C}$) e naturais de iluminação (250-350 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), bem como irrigação manual diária por capilaridade.

4.1.4. Genotipagem das linhagens transgênicas

O DNA genômico das linhagens transgênicas e controle não transgênico foi extraído a partir de 100 mg de massa fresca de folha, utilizando-se a solução de Edwards (Edwards *et al.* 1991).

A genotipagem das linhagens regenerantes foi realizada por PCR, utilizando 50 ng de DNA molde, 0,4 mM de cada dNTPs, 0,4 μM de cada iniciador, 2,5 mM de MgCl_2 , 1X PCR buffer e 1 U de enzima Taq DNA polimerase® (Invitrogen). Três jogos de iniciadores foram utilizados, um par ancorado sobre o gene constitutivo *EXPRESSED* (*SIEXPRESSED F* e *SIEXPRESSED R*); outro sobre o gene de resistência a canamicina (*NPTII F* e *NPTII R*) e; o terceiro, específico da construção (35S Terminador e *SIBBX28-RNAi F*) (Anexo 2). O programa de amplificação utilizado foi de 94°C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 30 s, 57°C por 30 s, 72°C por 2 min; e

seguidos por uma extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos amplificados foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1% com TBE 0,5 X.

4.1.5. Análise de perfil transcricional

Extração de RNA total e síntese de DNA complementar (cDNA)

Alíquotas de 100 mg de material vegetal fresco macerado em nitrogênio líquido foram submetidas a extração de RNA total utilizando o kit ReliaPrep™ RNA Miniprep System (PROMEGA), seguindo protocolo recomendado pelo fabricante. As amostras de RNA foram ressuspensas em 30µL de água livre de RNase e, sua concentração e integridade foram avaliadas por espectrofotômetro Nanodrop e eletroforese em gel de agarose 1% com, TBE 0,5 X, respectivamente. Foram selecionadas amostras de alta qualidade, com razão de OD maior ou igual a 1,8 (260/280 nm) e 1,9 (260/230 nm). Para eliminação de DNA genômico contaminante, 1 µg de cada amostra de RNA foi submetido a tratamento com DNase I (Life Technologies).

A síntese de cDNA foi realizada com o kit SuperScript® IV Reverse Transcriptase (Life Technologies) utilizando *random primers* como iniciadores, de acordo com as recomendações do fabricante.

A presença ou ausência de contaminação genômica foi verificada por PCR, utilizando iniciadores para o gene *SIEXPRESSED* (Anexo 2) que se anelam em éxons diferentes. Para essas reações, foram utilizados 0,4 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada iniciador, 50 ng de cDNA, 2,5 mM de MgCl₂, 1X PCR buffer e 1 U de enzima Taq DNA polimerase® (Invitrogen). As condições de amplificação utilizadas foram de 94°C por 10 min; 35 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 56°C, 1 min a 72°C; e uma extensão final a 72°C por 10 min. O tamanho esperado do fragmento correspondente ao DNA genômico é de 300 pb e ao cDNA de 200 pb; desta forma é possível verificar a presença de contaminação após eletroforese em gel de agarose 2% com TBE 0,5 X dos produtos de amplificação. Por fim, as amostras de cDNA foram diluídas na proporção 1:10, obtendo-se a concentração final de aproximadamente 5 ng de RNA transcrito-reverso/µL.

Análise por PCR quantitativa de produtos de transcriptase reversa (RT-qPCR)

As reações foram feitas com 2 µL da diluição 1:10 de cDNA, 0,2 µM de cada iniciador e 1X POWER SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) em volume

final de 10 µL, utilizando o QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR system (Applied Biosystems). O programa de amplificação foi 95°C por 10 min, e 40 ciclos de 95°C por 15 s, 56°C por 30 s e 72° por 30 s (momento no qual ocorre a aquisição do sinal emitido pelo SYBR Green). Para obter os valores do ciclo de quantificação (Cq) e calcular a eficiência de cada par de iniciadores, os dados de fluorescência absoluta foram analisados com o software LinRegPCR (Ruijter *et al.* 2009). Para a normalização, foi utilizada a média geométrica dos genes constitutivos, *SIEXPRESSED* e *SITIP41* (Anexo 2), e os cálculo de normalização, foram feitos conforme descrito por Quadrana *et al.* (2013).

4.1.6. Condições de crescimento e amostragem

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação de nível 1 de biossegurança (NBI) no Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, em vasos de 2 L contendo terra vegetal e vermiculita (1:1) suplementado com NPK 10:10:10, calcário dolomítico e termofosfato magnésiano (Yoorin®), sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 3^\circ\text{C}$) e naturais de iluminação (250-350 µmol m⁻²s⁻¹), bem como irrigação manual diária por capilaridade.

Para a análise fenotípica das plantas silenciadas, foram cultivados dois grupos de plantas (Figura 8), cada um com 12 réplicas biológicas de cada uma das três linhagens transgênicas da geração T2 e do controle não-transformado.

O grupo “não destrutivo” com 48 plantas foi usado para análise de parâmetros de produtividade. Após 125 dias de cultivo foi realizada a coleta destrutiva. Todos os frutos foram coletados e pesados, os frutos maduros foram também medidos e as flores e frutos foram contados. A massa aérea fresca e seca das plantas foi pesada. O conteúdo de sólidos solúveis (°BRIX) foi medido em frutos maduros deste set de plantas.

O grupo “destrutivo” com o mesmo número de plantas, foi utilizado para medições de fluorescência da clorofila e coletas de folhas e frutos para análises posteriores. Foi coletada a quinta folha totalmente expandida de plantas de 52 dias de idade, onde foi medida a fluorescência da clorofila. O pericarpo da porção pedicelar de frutos nos estágios verdes imaturo 3 (IG3: 8 dias após a antese); verde imaturo 5 (IG5: 15 dias após a antese); *breaker* 1 (BR1: 1 dia após *breaker*; o estágio *breaker* é o início do processo de amadurecimento quando o fruto apresenta os primeiros sinais de amarelamento, aproximadamente 32 dias após a antese); BR 3 (3 dias após BR, os

frutos apresentam coloração alaranjada) e; BR 10 (10 dias após BR, totalmente maduro) foi coletado. Para todas as amostras foram montadas pelo menos 4 réplicas biológicas com material de 4-5 plantas. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer a -80°C.

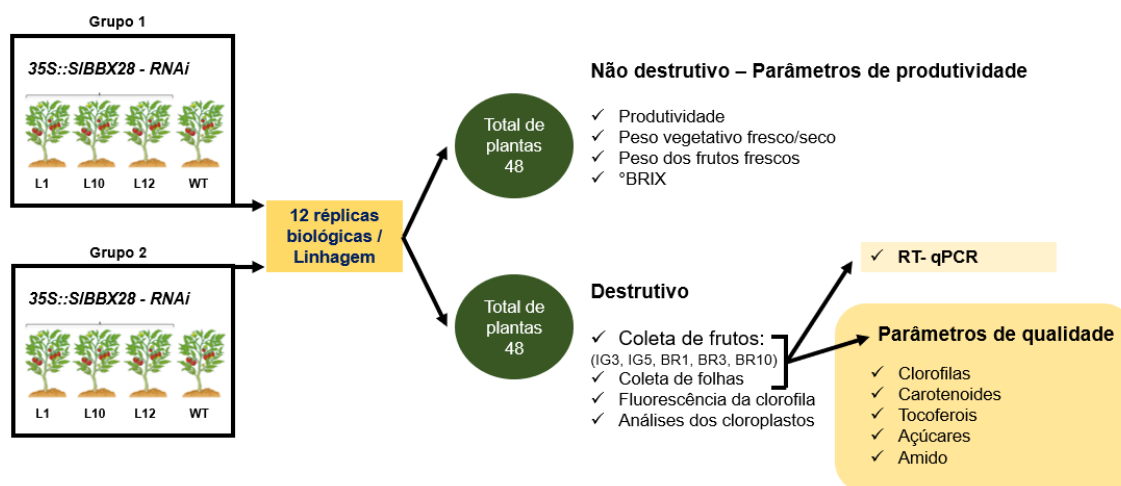


Figura 8: Delineamento experimental. Desenho experimental para a caracterização fenotípica das plantas silenciadas para o gene *SIBBX28*. WT: genótipo selvagem. RT-qPCR: PCR quantitativa em tempo real. IG3: verde imaturo 3. IG5: verde imaturo 5. BR 1: 1 dias após o BR (início do processo de amadurecimento). BR 3: 3 dias após BR. BR 10: 10 dias após o BR. °BRIX: conteúdo de sólidos solúveis.

Para o ensaio de estiolamento e desestiolamento de plântulas, montou-se um experimento *in vitro* utilizando 32 magentas com meio $\frac{1}{2}$ X MS (Murashige e Skoog 1962), 8 para cada genótipo, nas quais foram inoculadas sementes dos genótipos WT, L1, L10 e L12. Todas as magentas ficaram no escuro por três dias para sincronizar a germinação, posteriormente, a metade foi mantida no escuro e a outra metade foi transferida para a luz branca constante com intensidade de $80-100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, onde permaneceram por quatro dias. Ambos tratamentos permaneceram a 25°C.

Foram coletados os hipocótilos de ambas as condições descartando as raízes e os cotilédones. A coleta das plântulas cultivadas no escuro foi realizada sob luz verde. Pelo menos quatro réplicas biológicas de hipocótilos contendo material de pelo menos 25 plântulas foram coletadas por genótipo. O material foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C.

As análises de área foliar total, número de inflorescências e flores por inflorescências foram realizadas com plantas de 50 dias em 12 plantas por genótipo. Após contagens do número de inflorescências e flores por inflorescências, todas as folhas de cada planta foram coletadas e digitalizadas com resolução de 300 bpi em

escala colorida. A área de cada folha foi obtida através de análise de digitalização no programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Para analisar a responsividade à auxina, sementes de uma linhagem transgênica expressando o gene repórter *uidA* (codificante para a enzima β -GLUCURONIDASE, GUS) sobre controle do promotor responsivo a auxinas DR5 foram obtidas da coleção de germoplasma mantida na ESALQ, Universidade de São Paulo (USP), Brasil (<http://www.esalq.usp.br/tomato/>). As plantas DR5::*GUS* foram cultivadas, e o pólen coletado utilizado para polinizar manualmente as plantas WT, L1, L10 e L12. O experimento foi conduzido com plantas de 23 dias de idade F1 hemizigotas para ambos transgenes.

Para investigar o efeito de *SIBBX28* sobre a floração foi realizado um experimento utilizando os genótipos *Slsft* mutante (*single flower truss*, florigeno de tomateiro, ortólogo do florigeno de *A. thaliana FLOWERING LOCUS T*, FT), WT e L10. As sementes de *Slsft* foram obtidas da coleção de germoplasma mantida na ESALQ, Universidade de São Paulo (USP), Brasil (<http://www.esalq.usp.br/tomato/>). Ápices e cotilédones de plântulas de 4, 10 e 20 dias pós-germinação (DPG) foram coletados. Os DPG foram escolhidos de acordo ao estágio do meristema do genótipo selvagem: 4 DPG: meristema em fase vegetativa (MV); 10 DPG: meristema em fase de transição (MT) e; 20 DPG: meristema em fase floral (MF). Os estágios dos meristemas foram definidos com base nas características morfológicas (Silva *et al.* 2019). Pelo menos quatro réplicas biológicas de ápices e cotilédones contendo material de pelo menos oito plantas foram coletadas com auxílio de lupa. O material foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C.

4.1.7. Avaliação de fluorescência da clorofila

Os parâmetros de fluorescência da clorofila foram medidos no folíolo terminal da quinta folha contabilizada de baixo para cima em plantas de 52 dias de idade durante o período de fotossíntese intensa (12h a 14h) utilizando um fluorômetro de clorofila portátil PAM-2500. As folhas foram adaptadas ao escuro por 30 min para a oxidação dos centros de reação, em seguida, a fluorescência mínima da folha adaptada ao escuro (F_0) foi medida. Após um pulso de luz saturante, a fluorescência máxima da folha adaptada ao escuro (F_m) foi registrada. Depois, as folhas foram readaptadas às condições de luz ambiental e os parâmetros de fluorescência máxima e mínima

registrados. A partir das variáveis F_o , F_m , F_o' (fluorescência mínima adaptada à luz) e F_m' (fluorescência máxima adaptada à luz), todos os parâmetros de fluorescência foram calculados de acordo com Genty *et al.* (1989) e a nomenclatura foi a descrita por Baker & Oxborough (2004). Resumidamente, a eficiência quântica máxima dos centros de reação PSII (escuro): $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$; eficiência fotoquímica quântica máxima (luz): $F_v'/F_m' = (F_m' - F_o')/F_m'$; Eficiência quântica PSII: $\phi_{PSII} = F_q'/F_m' = (F_m' - F)/F_m'$, onde F é o valor de fluorescência registrado pouco antes do pulso de saturação; quenching fotoquímico: $q_P = F_q'/F_v' = (F_m' - F)/(F_m' - F_o')$; quenching não fotoquímico: $NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$; Taxa de transporte de elétrons: $ETR = (F_q'/F_m') * I * \alpha_{folha} * f$, onde I é o fluxo de 16 fótons fotossinteticamente ativos ($800 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ para tomate Lira *et al.* 2017); α_{folha} é a absorvância da folha e; f é a fração eletrônica usada por PSI (assumida como uma constante para plantas C3 de acordo com von Caemmerer, 2000).

4.1.8. Abundância plastidial

A abundância de plastídios foi analisada num folíolo lateral da quinta folha de plantas de 52 dias de idade e na região pedicelar de frutos no estágio IG5 conforme descrito em Bianchetti *et al.* (2017). Resumidamente, fragmentos de 2 mm foram fixados em glutaraldeído 3,5% (v/v) por 1 h. As amostras foram transferidas e mantidas em solução de NaEDTA 0,1 M pH 9,5 por 3 h a 60°C no escuro com agitação. Os fragmentos foram transferidos para lâminas de microscópio e macerados suavemente com auxílio de uma lâmina de bisturi. As lâminas foram fotografadas com auxílio de um microscópio Leica. O número de plastídios por célula foi contabilizado em células isoladas de parênquima clorofiliano foliar e de fruto utilizando o programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Foram analisadas 6 lâminas por genótipo e pelo menos 4 células por lâmina.

4.1.9. Quantificações de pigmentos por HPLC

As extrações de clorofilas e carotenoides foram realizadas de acordo com o protocolo descrito em Sérino *et al.* (2009). Foram adicionados a 200 mg de massa fresca triturados em N_2 líquido, 100 μL de uma solução de NaCl saturado, 200 μL de diclorometano e 500 μL de uma mistura hexano: éter etílico (1:1) agitando em vórtex por 30 s após cada adição. Posteriormente, as amostras foram sonicadas por 5 min, e

centrifugada a 13000 g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a extração com a mistura hexano: éter etílico (1:1) seguida de sonicação e centrifugação foi repetida por mais três vezes. Os sobrenadantes foram reunidos, secados totalmente em SpeedVac, reconstituídos em 300 µL de acetato de etila e posteriormente filtrados através de membrana 0.45 µm.

A quantificação foi feita a partir da injeção de 20 µL da ressuspensão filtrada em um sistema cromatográfico Agilent modelo 1100 equipado com uma coluna Phenomenex Luna C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm diâmetro de partícula). A corrida foi realizada em um gradiente composto de acetato de etila (C) e acetonitrila: água (9:1) (A). A programação seguida foi: 0 a 4 min 0 a 5% de C, 4 a 12 min 5% a 10% de C, 12 a 17 min 10% a 20% de C, 17 a 20 min 20% a 65% de C, 20 a 35 min 65% de C e 35 a 40 min 65% a 0% C. O fluxo foi mantido constante a 0,8 mL/min e a temperatura em 25°C. O eluído foi monitorado por um detector DAD (Diode Array Detector) em varredura de 200 a 700 nm. A quantificação foi realizada a partir de curvas padrão para cada composto. Desse modo, foi feita uma correlação linear entre as áreas dos picos e as concentrações injetadas de cada carotenoide e clorofila. A equação de regressão linear obtida para cada composto foi utilizada para quantificar os respectivos conteúdos nas amostras estudadas.

4.1.10. Quantificação de tocoferóis

Na extração de tocoferóis, foi utilizado o protocolo descrito por Fraser *et al.* (2000) com modificações. Foi adicionado 1,5 mL de metanol a 30 mg de massa seca. Após agitação em vórtex por 1 min, foi adicionado 1,5 mL de clorofórmio à mistura, que foi então sonicada por 5 min. Foram adicionados 2,5 mL de solução TrisNaCl [Tris (pH 7.5, 50 mM) / NaCl 1M) a cada amostra, posteriormente agitada com vórtex, sonicada e centrifugada a 3000 rpm por 5 min. A fase clorofórmica foi recuperada e uma nova extração com 2 mL de clorofórmio foi realizada. Os extratos obtidos foram unidos em um único tubo cujo volume foi ajustado com clorofórmio para 4 mL. Alíquotas de 3 mL do extrato foram secas, ressuspensas em 200 µL de solução de fase móvel (90:10 hexano/éter metil éter-butílico) e filtradas através de membrana 0,45 µm. O conteúdo de tocoferol foi determinado utilizando um sistema cromatográfico Agilent modelo 1100 acoplado a um detector de fluorescência (Agilent Technologies, série 1200). A separação cromatográfica foi realizada em coluna de fase normal

LiChrospher® 100 DIOL (5 µm) LiChroCART® 250-4 (Agilent Technologies), operada em temperatura ambiente usando um sistema de solvente isocrático de 90:10 hexano/éter-metil-terc-butílico em fluxo de 1,0 ml/min. Os compostos eluídos foram detectados por fluorescência com excitação a 296 nm e emissão a 340 nm. As isoformas de tocoferol foram identificadas e quantificadas por meio da comparação do tempo de retenção e das áreas dos picos dos padrões adquiridos comercialmente (Merck, tocopherol set Calbiochem). Uma curva de calibração foi realizada utilizando uma solução de tocoferóis com concentração variando entre 0,31 e 5 µg/mL para cada isoforma. Desse modo, foi feita uma correlação linear entre as áreas dos picos e as concentrações injetadas de cada composto. A equação de regressão linear obtida para cada isoforma foi utilizada para quantificar o conteúdo dos tocoferóis nas amostras estudadas.

4.1.11. Quantificações de amido, açúcares solúveis e °BRIX

As quantificações de açúcares solúveis e amido foram feitas de acordo com o protocolo descrito em Freschi *et al.* (2010). Resumidamente, a 10 mg de massa seca liofilizada, foram adicionados 1,5 mL de etanol 80%. Após agitação com vórtex por 1 min, as amostras foram incubadas em banho seco a 80°C por 20 min, centrifugadas a 25000 g a 25°C por 10 min e foram coletados os sobrenadantes. Esse processo foi repetido 4 vezes para extrair todos os açúcares solúveis. Os extratos foram unidos em um único tubo, secados em speedVac à 30°C por 3 h, ressuspensos em 2 mL de água ultrapura, filtrados com membrana 0,45 µm e mantidos em freezer -20. Os açúcares solúveis foram quantificados num HPLC equipado com detector de amperométrico pulsado (Dionex, Sunnyvale, USA) utilizando uma coluna CarboPac PA1 (4 x 250 mm) numa corrida isocrática com 18 mM NaOH como fase móvel (Purgatto *et al.* 2002) utilizando uma curva padrão com standards comerciais.

Os pellets foram secados em estufa a 37°C para quantificação de amido e tratados por duas vezes com 0,5 mL de alfa-amilase 110 U/mL diluída em tampão MOPS 10 mM pH 6,5 por 30 min a 75°C. Após resfriamento das amostras em temperatura ambiente a 25°C, as amostras foram tratadas duas vezes com 0,5 mL de amiloglicosidase 30 U/mL diluída em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,5 e incubado a 50°C por 30 min. A reação foi parada com 0,1 mL de ácido perclórico 0,8 N. Após centrifugação por 10 min a 13000 g a 25°C foi coletado o sobrenadante. Para a

leitura, foram colocados 10 μL de cada amostra e 40 μL de água ultrapura totalizando o volume de 50 μL . Em paralelo, foi feita a curva padrão de glicose de 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e completado volume até 50 μL com água destilada. Em seguida foram adicionados 200 μL de glicose PAP liquiform em cada amostra e, após incubação por 15 min a 37°C, foram feitas as leituras em espectrofotômetro de microplacas Modelo Epoch, da BioTek a 490 nm.

O conteúdo de sólidos solúveis medidos como °BRIX foram analisados em 20 frutos maduros (BR 10) por genótipo. Para isso, tecido fresco do pericarpo foi macerado com Tissuelyser. Após 10 minutos de centrifugação a 14.000 rpm, 100 μL do sobrenadante foi quantificado em um refratômetro digital portátil NR151 (J. P. Selecta).

4.1.12. Quantificação hormonal

O ácido indol-3-acético (AIA) foi extraído conforme descrito por Álvarez-Flórez *et al.* (2017) com modificações e quantificado como descrito por Silveira *et al.* (2004) também com modificações. Resumidamente, antes de iniciar o processo de extração, foram adicionados 100 μL (0,05 μCi) de [^3H] AIA em cada amostra como padrão interno. Para cada 150 mg de tecido fresco macerado foram adicionados 2,5 mL de solução de extração (metanol:isopropanol (20:80); 1% ácido acético v/v). As amostras foram homogeneizadas, posteriormente centrifugadas e coletado o sobrenadante. Esta etapa foi realizada mais uma vez, totalizando 5 mL de volume final de extrato. Os sobrenadantes coletados foram combinados e totalmente secos em concentrador à vácuo à 45 °C. As amostras foram ressuspensas em 90 μL de fase móvel A (metanol 10% + 0,5% de ácido acético) e filtradas através de uma membrana de 0,2 μm . Os níveis de auxina foram determinados injetando 10 μL de amostra em um sistema HPLC com coluna C18 de 5 μm (Shimadzu Shin-pack CLC ODS), a 40 °C, e um detector de fluorescência (excitação a 280 nm, emissão a 350 nm). Utilizou-se um fluxo de 1 mL min^{-1} e gradiente com fase móvel A e fase móvel B (metanol 100%). Cada corrida iniciou em 10% B nos primeiros 5 minutos, de 5 a 7 minutos passou de 10% para 20% B, de 7 a 15 minutos de 20% para 30% B e de 15 a 24 minutos de 30% para 100% B, permanecendo por 12 minutos nessa condição. Após esse tempo, o gradiente foi alterado e estabilizado para o início de uma nova corrida. As frações, contendo o pico de AIA, foram coletadas e analisadas em contador de cintilação (Packard Tri-Carb) para estimar as perdas durante o procedimento. Foi utilizado um padrão de cintilação de

radioativo com a mesma concentração que foi adicionada no início da extração das amostras. O cálculo de perda, foi estimado comparando os dados da cintilação do padrão 100% radioativo com os de cada amostra. Com esse dado, as áreas e tempos de retenção do AIA das amostras foram avaliadas por comparação com concentrações conhecidas destes hormônios em uma curva padrão.

4.1.13. Análises dos dados

As diferenças nos parâmetros foram avaliadas estatisticamente utilizando o software Infostat (www.infostat.com). A distribuição normal dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilks. Quando normal, a comparação entre os genótipos foi realizada através do teste t-Student ($P < 0,05$). Caso contrário, a comparação foi realizada pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis ($P < 0,05$).

4.2. Resultados

4.2.1. Obtenção das plantas transgênicas silenciadas

Para caracterizar funcionalmente o gene *SIBBX28* foram obtidas plantas silenciadas pelo método de RNA de interferência (RNAi). Para isso, foi amplificado um fragmento de 293 pb da região codificante do gene alvo e clonado em ambas as orientações (senso e antisenso) no vetor pK7GWIWG2 (I), obtendo-se a construção *35S::SIBBX28-RNAi*. Utilizando esta construção e o método de transformação genética via *A. tumefaciens*, foram obtidas 38 plantas T0, das quais oito sobreviveram à aclimatação em casa de vegetação. Destas, sete foram positivas para a presença do transgene, denominadas linhagens L1, L7, L8, L9, L10, L11 e L12; e a L15 se apresentou negativa (Figura 9A). O silenciamento foi verificado em folhas T0 das linhagens positivas para a presença do transgene (Figura 9B), permitindo a seleção das 4 linhagens L1, L8, L10 e L12 por apresentarem a maior redução dos níveis de mRNA. O nível de silenciamento foi reavaliado em folhas e frutos na geração T1 (Figura 9C), e foram selecionadas as linhagens L1, L10 e L12 para caracterização fenotípica. Todos os experimentos de fenotipagem foram realizados com plantas T2 homozigotas.

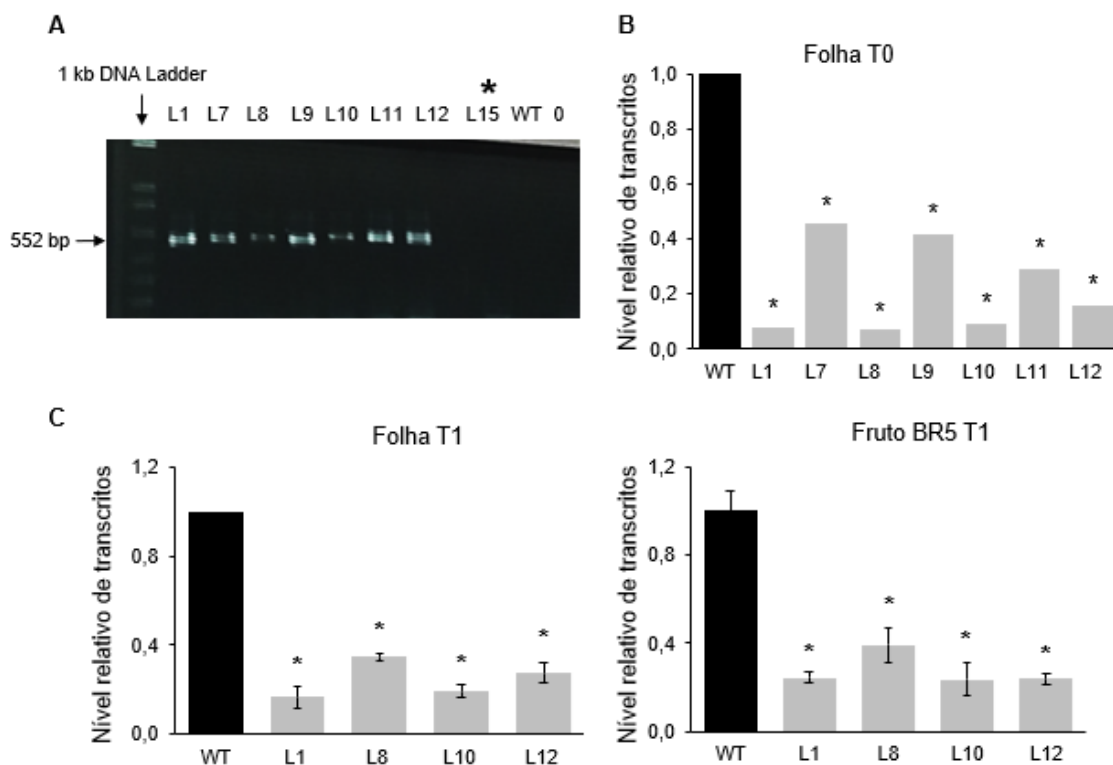


Figura 9: Genotipagem das linhagens regeneradas e avaliação do nível de silenciamento. (A) Imagem de gel de agarose do produto de PCR (552pb), com os primers *SIBBX28* RNAi-F e terminador 35S, das linhagens regenerantes T0. Asterisco indica a linhagem negativa para a presença do transgene. 0: branco pb: pares de bases. (B) Nível relativo de transcritos do gene *SIBBX28* em folha das regenerantes T0 (impossibilitando análise estatística). (C) Nível relativo de transcritos do gene *SIBBX28* em folha fonte e fruto BR 5 de plantas T1. Os dados foram normalizados em relação à amostra controle WT ($P < 0,05$). Os asteriscos marcam as linhagens silenciadas. Os valores são médias \pm EP de pelo menos três réplicas biológicas. WT: genótipo selvagem. L1-L12: silenciadas para o gene *SIBBX28*. BR 5: cinco dias após o início do processo de amadurecimento.

Os níveis de mRNA do gene *SIBBX28* em plantas T2 das linhagens L1, L10 e L12 foi também verificado em todos os órgãos analisados nos experimentos posteriores, *i.e.* hipocótilos, ápices, folhas fonte e dreno e frutos em diferentes estágios de desenvolvimento e amadurecimento (Figura 10A); observando-se silenciamento superior a 50%.

Além disso, em folha fonte e frutos IG3 foi verificado o eventual co-silenciamento dos parálogos mais próximos identificados em (Lira *et al.* 2020), *i.e.* *SIBBX29* e *SIBBX31* (Figura 10B). Não foram encontrados indícios de co-silenciamento. Enquanto diferenças nos níveis de transcritos de *SIBBX29* não foram observadas, os níveis de mRNA de *SIBBX31* mostraram-se elevados em frutos IG3, podendo indicar repressão por *SIBBX28* ou um mecanismo compensatório desencadeado pelo silenciamento do gene *SIBBX28*.

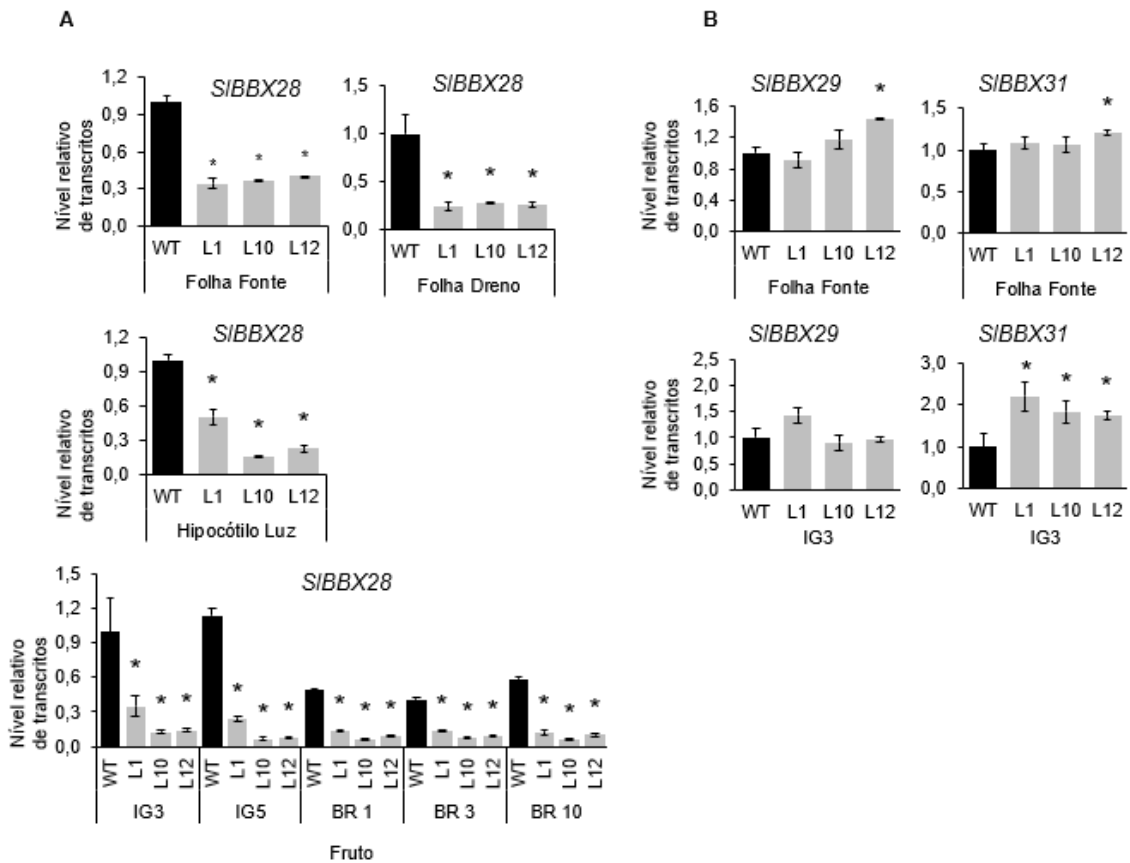


Figura 10: Avaliação do silenciamento do gene *SIBBX28* e de co-silenciamento dos genes *SIBBX29* e *SIBBX31*. (A) Nível relativo de transcritos do gene *SIBBX28* em quatro órgãos: ápice, hipocótilos, folhas fonte e dreno e, cinco estágios de desenvolvimento dos frutos. (B) Nível relativo de transcritos dos genes *SIBBX29* e *SIBBX31* em folha fonte e fruto IG3. Os valores são médias \pm EP de pelo menos quatro réplicas biológicas. Os dados foram normalizados em relação à amostra controle WT de cada órgão. Asteriscos representam diferenças estatísticas significativas em relação à amostra controle WT ($P < 0,05$). WT: genótipo selvagem; L1, L10 e L12: linhagens silenciadas homocigotas T2; IG3: verde imaturo 3; IG5: verde imaturo 5; MG: verde maduro; BR 3: 3 dias após BR; BR 5: 5 dias após o BR.

4.2.2. O silenciamento de *SIBBX28* afeta o desenvolvimento vegetativo e a floração

Ao analisar o número de dias até a primeira antese (Figura 11A) e o padrão temporal de antese das plantas (Figura 11B), nenhuma diferença foi encontrada nas plantas transgênicas L1, L10 e L12 em relação ao controle selvagem. No entanto, o número de folhas até o surgimento da primeira inflorescência (Figura 11C), mostrou-se reduzido nas linhagens L10 e L12, indicando um menor crescimento vegetativo. Assim, embora o tempo de floração permaneceu inalterado, o desenvolvimento vegetativo até a primeira antese foi menor nas plantas silenciadas para o gene *SIBBX28*.

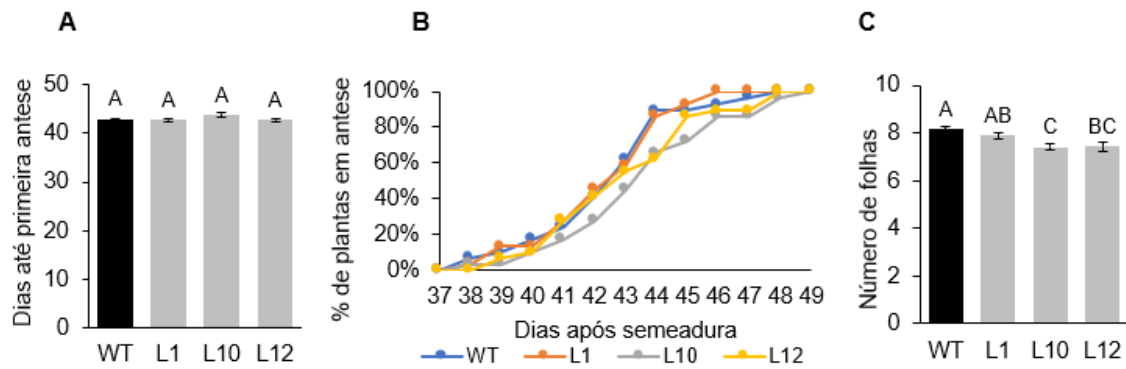


Figura 11: Tempo de floração nas plantas silenciadas para *SIBBX28*. (A) Número de dias até a primeira antese. (B) Progressão do início da floração. (C) Número de folhas até a primeira inflorescência. Os valores são médias \pm EP de pelo menos quatro réplicas biológicas. Diferentes letras representam diferenças estatísticas significativas em relação à amostra controle WT ($P < 0,05$). WT: genótipo selvagem; L1, L10 e L12: linhagens silenciadas homocigotas T2.

A deficiência em *SIBBX28* resultou em plantas de menor porte, comprometendo claramente o crescimento vegetativo das plantas L1, L10 e L12 (Figura 12A e 12B). Isto fica evidente pela diminuição observada na massa vegetativa fresca (Figura 12C) e seca (Figura 12D) após 125 dias de cultivo.

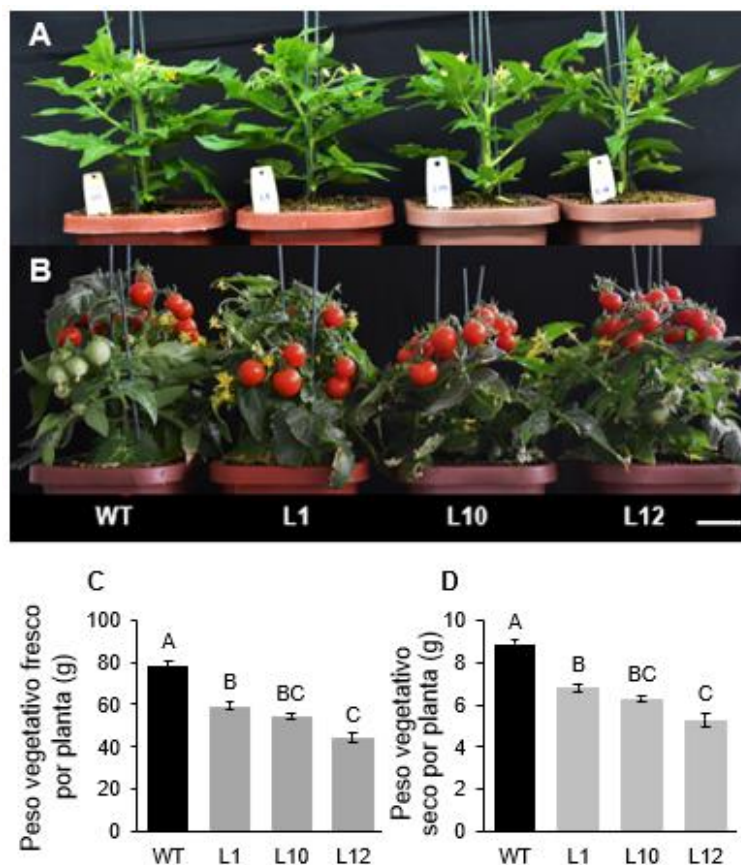


Figura 12: Desenvolvimento das plantas silenciadas L1, L10 e L12. Plantas representativas dos genótipos selvagem e silenciados para o gene *SIBBX28*, em vista lateral com 48 (A) e 125 (B) dias de idade; escala: 5 cm. Peso fresco (C) e seco (D) da parte aérea sem frutos após 125 de cultivo. Os valores são médias \pm EP de pelo menos 12 réplicas biológicas. Diferentes letras representam diferenças estatísticas significativas em relação à amostra controle WT ($P < 0,05$). WT: genótipo selvagem; L1, L10 e L12: linhagens silenciadas homocigotas T2.

O silenciamento de *SIBBX28* não somente afetou o desenvolvimento vegetativo, mas também a produtividade das plantas. O número de flores (Figura 13A), o número total de frutos (Figura 13B) e o peso total de frutos (Figura 13C) das plantas transgênicas apresentaram redução. Já o peso médio de frutos maduros (Figura 13D) não foi alterado nas linhagens transgênicas. A redução simultânea da biomassa vegetativa e de frutos, fez com que o índice de colheita (Figura 13E) permanecesse inalterado entre os genótipos analisados.

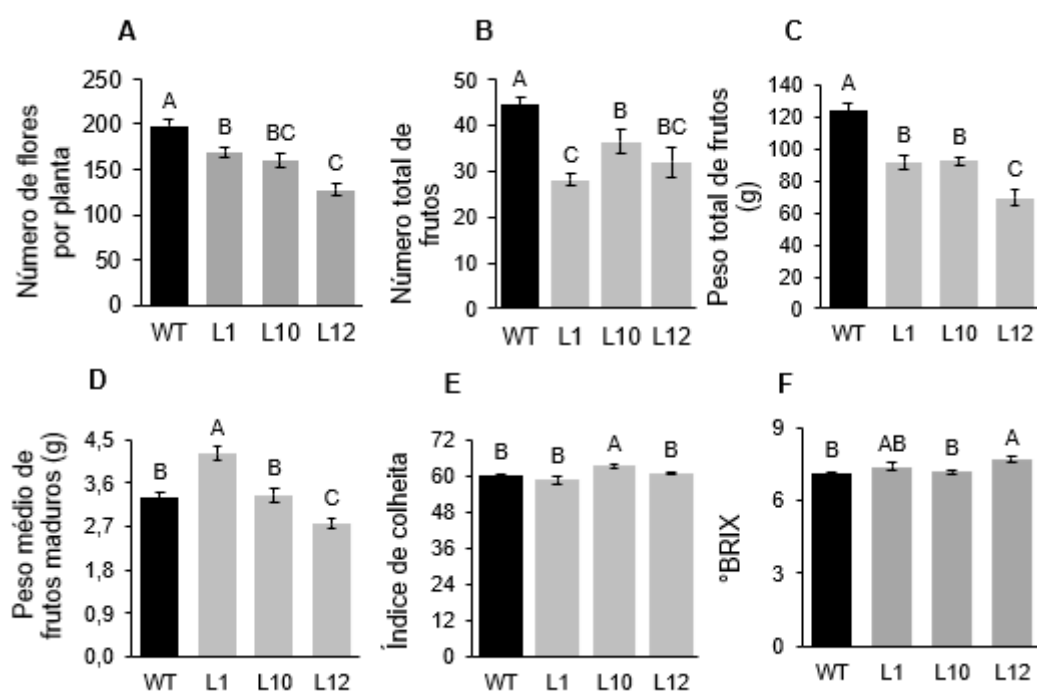


Figura 13: Avaliação dos parâmetros de produtividade. Efeito do silenciamento do *SIBBX28* no experimento “não destrutivo” com 125 dias de idade. Número total de flores (A) e frutos (B). (C) Peso total de frutos. (D) Peso médio de frutos maduros. (E) Índice de colheita. (F) Conteúdo de sólidos totais em frutos maduros. Os valores são médias \pm EP de pelo menos quatro réplicas biológicas. Diferentes letras representam diferenças estatísticas significativas em relação à amostra controle WT ($P < 0,05$). WT: genótipo selvagem; L1, L10 e L12: linhagens silenciadas homozigotas T2; °BRIX: conteúdo de sólidos totais dos frutos maduros.

Interessantemente, os parâmetros avaliados de qualidade nutricional dos frutos não foram afetados pelo silenciamento de *SIBBX28*. Assim, não foram observadas diferenças consistentes no teor de sólidos solúveis totais (°BRIX) nos frutos maduros (Figura 13F), nem nos níveis dos metabólitos quantificados: açúcares solúveis e amido (Tabela 1), carotenoides e clorofilas (Tabela 2), e tocoferóis (Tabela 3).

Tabela 1: Conteúdo de açúcares solúveis e amido em frutos de plantas WT, L1, L10 e L12.

	Glicose	Frutose	Sacarose	Amido
Fruto verde imaturo 5 (IG5)				
WT	10.16 ± 0.11	15.06 ± 0.06	2.19 ± 0.11	326.4 ± 12.54
L1	9.73 ± 0.55	13.41 ± 0.76	1.90 ± 0.11	391.94 ± 5.36
L10	10.41 ± 0.15	13.82 ± 0.21	1.74 ± 0.03	207.8 ± 39.29
L12	10.28 ± 0.34	13.49 ± 0.58	2.08 ± 0.05	77.73 ± 18.93
Fruto breaker 1 (BR 1)				
WT	10.13 ± 0.48	15.22 ± 0.53	1.90 ± 0.09	7.27 ± 0.34
L1	10.87 ± 0.22	15.33 ± 0.18	2.27 ± 0.03	12.3 ± 0.21
L10	8.82 ± 0.21	12.93 ± 0.24	1.75 ± 0.02	4.74 ± 0.49
L12	10.22 ± 0.23	14.76 ± 0.23	1.93 ± 0.10	4.72 ± 0.37
Fruto breaker 3 (BR 3)				
WT	9.53 ± 0.32	14.79 ± 0.47	1.64 ± 0.09	1.87 ± 0.33
L1	9.00 ± 0.49	12.85 ± 0.42	1.60 ± 0.05	2.32 ± 0.16
L10	10.42 ± 0.18	14.75 ± 0.41	1.76 ± 0.08	2.78 ± 0.23
L12	9.32 ± 0.12	12.99 ± 0.33	1.64 ± 0.11	1.35 ± 0.22
Fruto breaker 10 (BR 10)				
WT	11.15 ± 0.26	15.65 ± 0.51	2.06 ± 0.06	ND
L1	11.50 ± 0.52	16.73 ± 0.56	2.09 ± 0.09	ND
L10	11.00 ± 0.60	15.50 ± 0.52	2.25 ± 0.05	ND
L12	12.46 ± 1.08	18.18 ± 0.83	2.24 ± 0.15	ND

Os valores representam médias ± EP de quatro réplicas biológicas e de pelo menos quatro frutos de plantas diferentes. As diferenças significativas em relação ao controle WT são destacadas em negrito ($P < 0,05$). WT, genótipo selvagem; L1, L10 e L12, linhagens silenciadas para o gene *SIBBX28* homocigotas T2; ND: Não detectado.

Tabela 2: Conteúdo de carotenoides e clorofilas em frutos de plantas WT, L1, L10 e L12.

	Neoxantina	Violaxantina	Luteína	β-Caroteno	Fitoeno	Fitoflueno	Licopeno	Carotenoides Total	Clorofila Total
Fruto verde imaturo 5 (IG5)									
WT	2.51 ± 0.06	1.09 ± 0.14	11.98 ± 0.13	37.12 ± 0.54	ND	0.81 ± 0.09	ND	53.64 ± 0.37	132.17 ± 3.16
L1	2.87 ± 0.22	1.52 ± 0.11	11.10 ± 1.82	36.85 ± 2.83	ND	0.72 ± 0.04	ND	53.06 ± 3.94	136.42 ± 9.97
L10	2.19 ± 0.12	1.11 ± 0.01	11.91 ± 0.36	36.34 ± 1.09	ND	0.72 ± 0.02	ND	52.53 ± 1.69	130.23 ± 3.38
L12	2.80 ± 0.34	1.49 ± 0.13	11.32 ± 2.4	38.88 ± 4.62	ND	0.76 ± 0.07	ND	56.87 ± 6.43	134.77 ± 14.95
Fruto breaker 1 (BR 1)									
WT	0.71 ± 0.10	0.41 ± 0.02	7.59 ± 0.32	32.32 ± 0.56	0.52 ± 0.07	0.62 ± 0.01	ND	42.06 ± 0.87	52.95 ± 4.01
L1	0.81 ± 0.13	0.46 ± 0.03	9.07 ± 0.58	35.71 ± 0.77	0.27 ± 0.02	0.66 ± 0.01	ND	46.73 ± 0.69	69.75 ± 1.99
L10	0.70 ± 0.04	0.38 ± 0.00	7.38 ± 0.39	31.81 ± 1.43	0.43 ± 0.03	0.61 ± 0.02	ND	41.34 ± 1.88	51.80 ± 2.98
L12	0.57 ± 0.05	0.42 ± 0.02	6.75 ± 0.87	29.46 ± 3.86	0.32 ± 0.08	0.58 ± 0.07	ND	37.37 ± 4.90	40.70 ± 2.44
Fruto breaker 3 (BR 3)									
WT	0.25 ± 0.01	0.26 ± 0.00	4.37 ± 0.26	33.72 ± 0.46	3.17 ± 0.15	0.58 ± 0.01	34.95 ± 0.90	72.99 ± 2.34	6.62 ± 0.26
L1	0.31 ± 0.01	0.27 ± 0.00	5.19 ± 0.29	49.63 ± 2.77	4.24 ± 0.02	0.83 ± 0.06	45.87 ± 2.98	112.11 ± 1.11	7.28 ± 0.46
L10	0.28 ± 0.02	0.27 ± 0.00	4.60 ± 0.18	36.41 ± 1.44	4.45 ± 0.37	0.66 ± 0.02	36.76 ± 4.32	89.35 ± 9.33	7.53 ± 0.36
L12	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.00	4.18 ± 0.26	35.19 ± 2.22	3.78 ± 0.44	0.67 ± 0.03	36.29 ± 6.51	81.09 ± 9.49	7.24 ± 0.16
Fruto breaker 10 (BR 10)									
WT	0.35 ± 0.01	0.27 ± 0.01	5.42 ± 0.37	27.30 ± 0.95	18.23 ± 0.48	0.54 ± 0.02	170.69 ± 3.11	222.67 ± 2.27	ND
L1	0.35 ± 0.00	0.31 ± 0.01	5.86 ± 0.58	35.07 ± 2.11	19.99 ± 1.13	0.69 ± 0.03	172.26 ± 7.62	235.72 ± 4.77	ND
L10	0.35 ± 0.01	0.28 ± 0.00	4.95 ± 0.35	25.36 ± 1.59	21.05 ± 1.00	0.54 ± 0.02	175.94 ± 8.01	219.51 ± 8.84	ND
L12	0.36 ± 0.01	0.34 ± 0.06	5.66 ± 0.30	32.41 ± 1.20	22.72 ± 1.30	0.63 ± 0.02	252.01 ± 6.25	315.98 ± 11.30	ND

Os valores representam médias ± EP de quatro réplicas biológicas e de pelo menos quatro frutos de plantas diferentes. As diferenças significativas em relação ao controle WT são destacadas em negrito ($P < 0,05$). WT, genótipo selvagem; L1, L10 e L12, linhagens silenciadas para o gene *SIBBX28* homocigotas T2; ND: Não detectado.

Tabela 3: Conteúdo de tocoferol em frutos em plantas WT, L1, L10 e L12.

	Alfa tocoferol	Beta tocoferol	Gama tocoferol	Delta tocoferol	Tocoferol Total
Fruto verde imaturo 5 (IG5)					
WT	130.36 ± 1.07	2.21 ± 0.21	3.69 ± 0.27	ND	137.33 ± 2.25
L1	151.83 ± 4.92	2.26 ± 0.10	4.81 ± 0.12	ND	158.89 ± 5.09
L10	148.40 ± 2.61	2.26 ± 0.10	4.85 ± 0.31	ND	155.32 ± 2.35
L12	203.96 ± 18.15	2.80 ± 0.28	4.77 ± 0.49	ND	211.54 ± 18.72
Fruto breaker 1 (BR 1)					
WT	222.71 ± 3.52	2.63 ± 0.02	29.11 ± 1.23	ND	256.02 ± 3.22
L1	228.18 ± 8.51	2.51 ± 0.14	20.86 ± 1.44	ND	252.20 ± 9.30
L10	287.49 ± 42.46	3.36 ± 0.49	36.92 ± 5.68	ND	330.65 ± 49.29
L12	255.43 ± 9.39	2.94 ± 0.22	33.74 ± 3.24	ND	297.33 ± 12.37
Fruto breaker 1 (BR 3)					
WT	287.25 ± 7.36	3.38 ± 0.18	67.72 ± 0.47	5.38 ± 0.63	363.31 ± 7.01
L1	437.60 ± 22.31	4.42 ± 0.66	88.15 ± 13.21	7.10 ± 1.49	549.43 ± 35.40
L10	268.64 ± 41.5	2.99 ± 0.42	57.68 ± 8.79	4.80 ± 0.83	334.11 ± 51.40
L12	287.20 ± 10.99	3.48 ± 0.10	64.00 ± 2.54	6.40 ± 0.07	361.08 ± 13.14
Fruto breaker 10 (BR 10)					
WT	336.56 ± 44.34	4.39 ± 0.47	87.94 ± 9.62	7.85 ± 0.72	450.94 ± 60.53
L1	352.37 ± 46.66	3.98 ± 0.51	91.25 ± 14.74	8.77 ± 1.69	456.97 ± 63.44
L10	348.22 ± 51.24	4.24 ± 0.67	107.41 ± 20.76	9.90 ± 1.97	470.55 ± 74.86
L12	301.05 ± 20.82	4.43 ± 0.33	78.32 ± 4.52	8.58 ± 0.47	392.38 ± 25.70

Os valores representam médias ± EP de quatro réplicas biológicas e de pelo menos quatro frutos de plantas diferentes. As diferenças significativas em relação ao controle WT são destacadas em negrito ($P < 0,05$). WT, genótipo selvagem; L1, L10 e L12, linhagens silenciadas para o gene *SIBBX28* homocigotas T2; ND: Não detectado.

Para melhor avaliação do efeito de *SIBBX28* sobre o número de flores, analisou-se o número de inflorescências e de flores por inflorescência nas plantas WT, L1, L10 e L12 em um novo experimento com plantas de 50 dias de idade. Curiosamente, enquanto o número de inflorescências por planta não se alterou (Figura 14A), o número de flores por inflorescência se mostrou reduzido nas linhagens L10 e L12 (Figura 14B).

Assim, os dados obtidos sugerem um papel positivo de *SIBBX28* no crescimento vegetativo e na floração sem afetar o conteúdo de metabólitos de importância nutricional nos frutos.

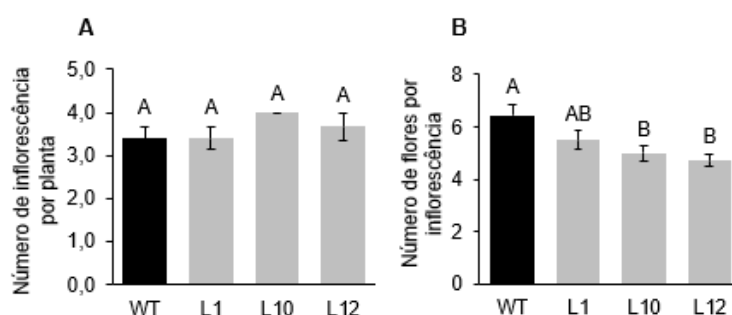


Figura 14: Número de inflorescências por planta e de flores por inflorescência. Número de inflorescência por planta (A) e de flores por inflorescência (B) em plantas de 50 dias de idade. Os valores são médias ± EP de pelo menos quatro réplicas biológicas. Diferentes letras representam diferenças estatísticas significativas em relação à amostra controle WT ($P < 0,05$). WT: genótipo selvagem; L1, L10 e L12: linhagens silenciadas homocigotas T2.

4.2.3. SIBBX28 atua positivamente sobre o metabolismo e sinalização de auxinas

O efeito de SIBBX28 sobre o crescimento vegetativo foi analisado detalhadamente num experimento com plantas de 50 dias de idade, o qual confirmou o tamanho reduzido das plantas L1, L10 e L12 previamente observado (Figura 15A, 15B). Tanto a área foliar total (Figura 15C), quanto o número de folhas por planta (Figura 15D) apresentaram redução nas linhagens L10 e L12.

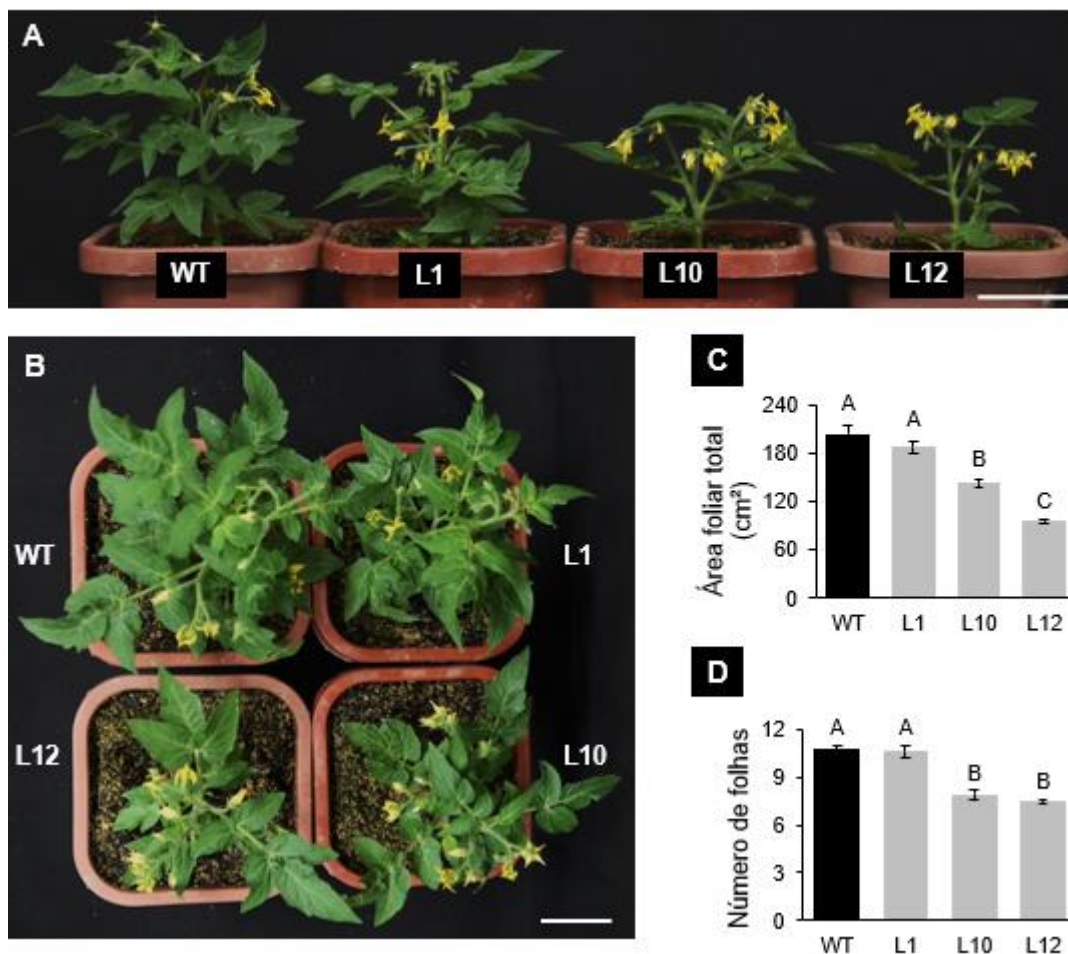


Figura 15: Desenvolvimento vegetativo e área foliar. Plantas representativas dos genótipos selvagem e silenciados para o gene *SIBBX28* de 50 dias de idade, em vista lateral (A) ou aérea (B) de plantas. Escala: 5 cm. Área foliar total (C) e número de folhas por planta (D). Os valores são médias \pm EP de pelo menos 12 réplicas biológicas. Diferentes letras representam diferenças estatísticas significativas em relação à amostra controle WT ($P < 0,05$). WT: genótipo selvagem; L1, L10 e L12: linhagens silenciadas homocigotas T2.

Para investigar se o fenótipo observado era decorrente de alterações na capacidade fotossintética, analisou-se o número de cloroplastos por célula do parênquima paliádico clorofiliano e os parâmetros de fluorescência da clorofila. O número de cloroplastos por célula nas plantas silenciadas não apresentou diferenças consistentes quando comparado ao genótipo WT (Figura 16). Esse dado está de acordo com o fato de

não ter observado diferenças nos conteúdos de clorofilas, carotenoides e tocoferóis em folhas (Tabela 4). Os parâmetros de fluorescência da clorofila apresentaram dados interessantes, foi observada redução do F_v/F_m , $\phi PSII$ e ETR, tendência de redução do F_v'/F_m' , e aumento do NPQ nas linhagens L10 e L12 (Tabela 5), sugerindo menor atividade da cadeia de transporte de elétrons, provavelmente devido a uma menor demanda de energia (ATP/NADPH) requerida para o metabolismo de fixação do carbono.

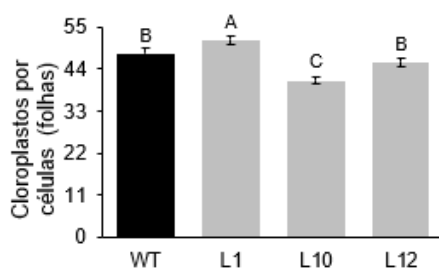


Figura 16: Número de cloroplastos por células. Número de cloroplastos por célula do parênquima paliçádico clorofiliano. Os valores são médias \pm EP de pelo menos 12 réplicas biológicas. Diferentes letras representam diferentes estatísticas significativas em relação à amostra controle WT ($P < 0,05$). WT: genótipo selvagem; L1, L10 e L12: linhagens silenciadas homozigotas T2.

Tabela 4: Conteúdo de carotenoides, clorofilas e tocoferol em folhas de plantas WT, L1, L10 e L12.

	WT	L1	L10	L12
Neoxantina	23.64 \pm 1.92	29.95 \pm 0.44	29.32 \pm 1.75	25.66 \pm 0.86
Violaxantina	21.18 \pm 1.17	21.95 \pm 0.34	22.95 \pm 0.30	21.64 \pm 1.71
Luteína	174.15 \pm 11.60	186.86 \pm 3.88	191.89 \pm 7.47	163.27 \pm 7.5
β -Caroteno	584.59 \pm 72.16	694.63 \pm 11.97	697.91 \pm 24.95	615.69 \pm 11.62
Fitoeno	0.70 \pm 0.27	0.70 \pm 0.38	0.04 \pm 0.01	0.92 \pm 0.51
Fitoflueno	9.26 \pm 1.13	11.00 \pm 0.26	10.95 \pm 0.41	9.67 \pm 0.14
Licopeno	ND	ND	ND	ND
Carotenoides Total	796.43 \pm 95.32	948.26 \pm 12.57	953.90 \pm 33.35	836.53 \pm 21.06
Clorofila Total	1452.70 \pm 108.97	1715.62 \pm 70.29	1369.63 \pm 19.30	1588.13 \pm 150.54
Alfa tocoferol	576.09 \pm 7.91	609.47 \pm 36.58	528.09 \pm 9.23	519.93 \pm 18.48
Beta tocoferol	2.94 \pm 0.09	3.34 \pm 0.14	3.26 \pm 0.38	3.30 \pm 0.05
Gama tocoferol	7.11 \pm 0.09	7.61 \pm 0.50	9.04 \pm 0.31	8.26 \pm 0.57
Delta tocoferol	ND	ND	ND	ND
Tocoferol Total	577.84 \pm 1.52	618.82 \pm 17.78	539.29 \pm 9.42	531.35 \pm 19.03

Os valores representam médias \pm EP de quatro réplicas biológicas e de pelo menos quatro folhas de plantas diferentes. As diferenças significativas em relação ao controle WT são destacadas em negrito ($P < 0,05$). WT, genótipo selvagem; L1, L10 e L12, linhagens silenciadas para o gene *SIBBX28* homozigotas T2; ND: Não detectado.

Tabela 5: Parâmetros de fluorescência da clorofila determinados em folha fonte de plantas com 50 dias de idade.

	WT	L1	L10	L12
ETR ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	192,317 \pm 4,189	193,377 \pm 2,166	174,033 \pm 3,133	160,733 \pm 3,777
Fv/Fm	0,737 \pm 0,002	0,731 \pm 0,009	0,705 \pm 0,006	0,725 \pm 0,003
Fv'/Fm'	0,444 \pm 0,009	0,443 \pm 0,004	0,426 \pm 0,002	0,421 \pm 0,003
NPQ	0,310 \pm 0,019	0,350 \pm 0,032	0,419 \pm 0,020	0,610 \pm 0,039
qP	3,260 \pm 0,045	3,204 \pm 0,028	3,286 \pm 0,041	3,355 \pm 0,025
ϕPSII	0,553 \pm 0,012	0,556 \pm 0,006	0,500 \pm 0,009	0,462 \pm 0,011

Os valores representam médias \pm EP de quatro réplicas biológicas e de pelo menos oito folhas de plantas diferentes. As diferenças significativas em relação ao controle WT são destacadas em negrito ($P < 0,05$). WT, genótipo selvagem; L1, L10 e L12, linhagens silenciadas para o gene *SIBBX28* homocigotas T2; qP, quenching fotoquímico; NPQ, quenching não fotoquímico; Fv/Fm, eficiência quântica (escuro); Fv'/Fm', eficiência fotoquímica (luz); ϕPSII , fotossistema II, ETR, taxa de transporte de elétrons.

De acordo com os resultados de crescimento e parâmetros de fluorescência da clorofila, o conteúdo de amido, glicose e frutose apresentaram redução nas folhas fonte das linhagens transgênicas (Figura 17). Estes resultados sugerem que a deficiência de *SIBBX28* afeta o desenvolvimento vegetativo, pelo menos em parte, devido a alterações na fotossíntese e no metabolismo do carbono.

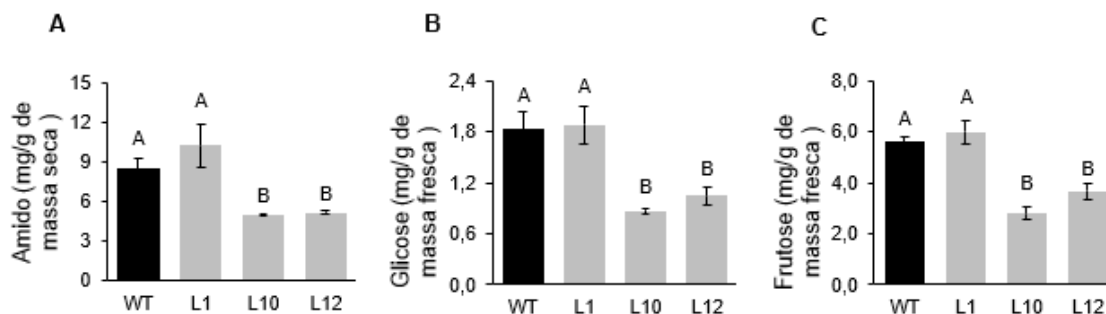


Figura 17: Níveis de amido e açúcares solúveis em folhas. Níveis de amido (A), glicose (B) e frutose (C) em folhas de plantas de 50 dias de idade. Os valores são médias \pm EP de pelo menos quatro réplicas biológicas. Diferentes letras representam diferenças estatísticas significativas em relação à amostra controle WT ($P < 0,05$). WT: genótipo selvagem; L1, L10 e L12: linhagens silenciadas homocigotas T2.

Devido ao importante papel que desempenham as auxinas no processo de expansão foliar (Xiong e Jiao, 2019), foi investigado o efeito de *SIBBX28* sobre o acúmulo e/ou a responsividade à auxina. Para isso, foram obtidas plantas duplas transgênicas *35S::SIBBX28-RNAi/DR5::uidA*, silenciadas para *SIBBX28* e portadoras do gene repórter *uidA* (codificante para a enzima β -GLUCORONIDASE, GUS) sob controle do promotor induzível por auxina DR5. A atividade de GUS foi avaliada em folíolos em expansão de plantas com 23 dias de idade. As plantas silenciadas para o gene *SIBBX28* mostraram ser menos responsivas à auxina tanto pelo método

histoquímico (Figura 18A), quanto fluorimétrico (Figura 18B). Interessantemente, o nível de AIA também foi menor nos folíolos da linhagem L10, escolhida por apresentar o fenótipo mais evidente de redução no crescimento e na atividade GUS (Figura 18C).

Os resultados apresentados demonstram que *SIBBX28* atua positivamente sobre o metabolismo e sinalização de auxinas.

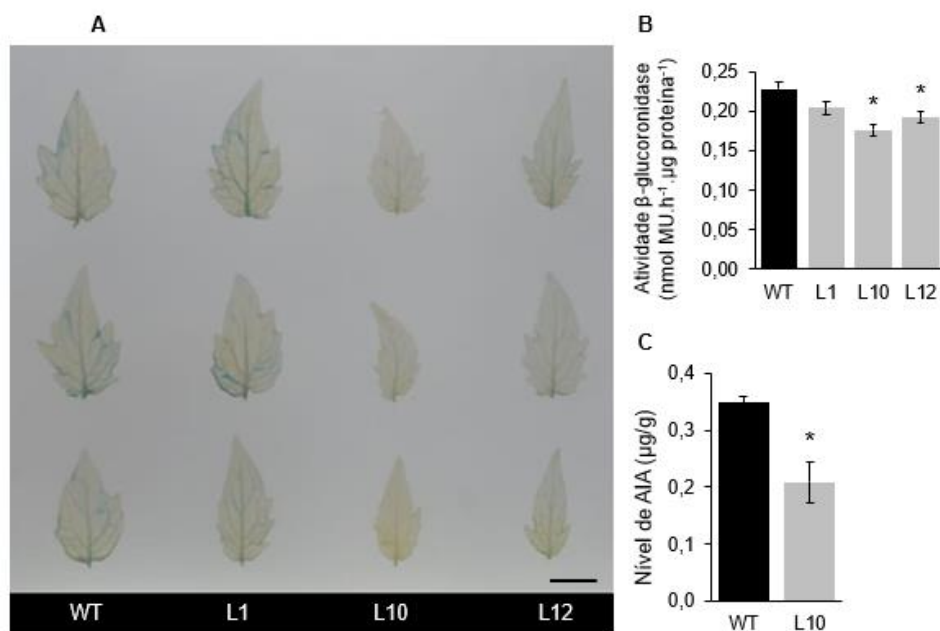


Figura 18: Influência do *SIBBX28* na sinalização e acúmulo de auxina. A atividade hormonal foi analisada pelo ensaio de GUS em folhas em expansão de 23 dias de idade no genótipo duplo transgênico *35S::SIBBX28-RNAi/DR5::uidA*. Atividade da enzima β-GLUCORONIDASE por meio do método histoquímico (A) e fluorimétrico (B). (C) Nível de auxina AIA na linhagem L10 e no genótipo WT. Os valores são médias ± EP de pelo menos quatro réplicas biológicas. Asteriscos representam diferenças estatísticas significativas em relação à amostra controle WT ($P < 0,05$). WT: genótipo selvagem cruzado com planta *DR5::uidA*; L1, L10 e L12: plantas duplas transgênicas hemizígotas *35S::SIBBX28-RNAi/DR5::uidA*; escala 1 cm.

As auxinas são importantes reguladores do alongamento celular durante o estiolamento dos hipocótilos em respostas à falta de luz (Ma e Li 2019); assim, o eventual efeito do gene *SIBBX28* sobre o alongamento dos hipocótilos foi investigado. Plântulas de tomateiro foram crescidas no escuro ou na luz constante e os hipocótilos foram medidos após 7 dias de cultivo. Não foram observadas diferenças entre os genótipos das plântulas cultivadas na luz constante; porém, as plântulas silenciadas mantidas no escuro apresentaram redução no alongamento dos hipocótilos (Figuras 19A e 19B). Adicionalmente, foi verificado o nível de expressão do gene *YUC8C* (YUCCA FLAVIN MONOOXYGENASE 8C), previamente caracterizado como promotor da biossíntese de auxina nesse sistema em tomateiro (Rosado et al. 2019), o qual se apresentou reduzido nas plântulas crescidas no escuro (Figura 19C). Esses resultados reforçam a função positiva da *SIBBX28* sobre o metabolismo e a sinalização da auxina.

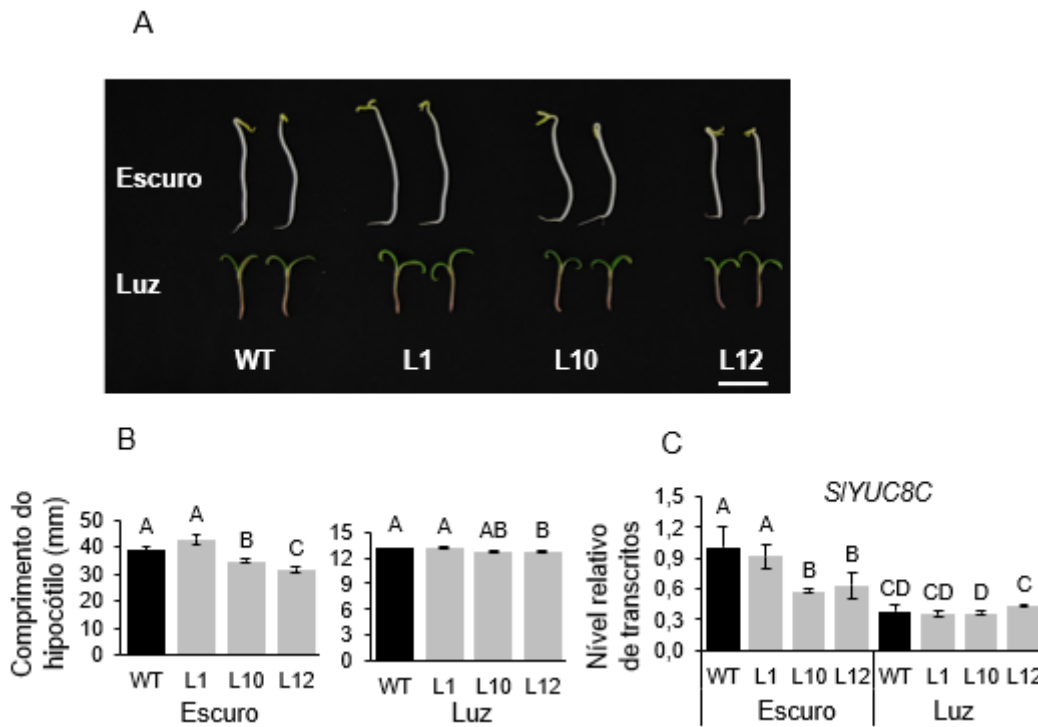


Figura 19: Efeito de *SIBBX28* sobre o alongamento do hipocótilo. (A) Hipocótilos de plântulas cultivadas no escuro e na luz branca constante. Escala 2 cm. (B) Comprimentos dos hipocótilos no escuro e na luz. Os valores são médias \pm EP de pelo menos 25 réplicas biológicas. (C) Níveis relativos de transcritos do gene *SIYUC8C*. Os valores são médias \pm EP de pelo menos quatro réplicas biológicas. Os dados foram normalizados em relação à amostra controle WT no escuro. Diferentes letras representam diferenças estatísticas significativas em relação à amostra controle WT ($P < 0,05$). WT: genótipo selvagem; L1, L10 e L12: linhagens silenciadas homocigotas T2; *YUC8C*: *YUCCA FLAVIN MONOOXYGENASE 8C*.

4.2.4. O silenciamento do gene *SIBBX28* afeta a floração

Como mencionado acima, as plantas silenciadas para *SIBBX28* apresentaram redução do número de flores. Para melhor compreender o efeito de *SIBBX28* sobre a determinação floral, foi montado um experimento com plântulas dos genótipos WT, L10 e *Slsft* (mutante para o florígeno *SISFT*, ortólogo do *FLOWERING LOCUS T*, *AtFT*, de *A. thaliana*). Ápices e cotilédones de plântulas com 4, 10 e 20 dias pós-germinação (DPG); correspondentes aos estágios de meristema vegetativo (MV), meristema de transição (MT) e meristema floral (MF) no genótipo WT, respectivamente, foram coletados. Devido à transição precoce do cultivar MicroTom o sinal do florígeno provem dos cotilédones (Silva *et al.* 2019).

Quando observados os ápices nos três pontos de coletas nenhuma diferença visual foi identificada entre os genótipos WT e L10 (Figura 20A), indicando que a deficiência de *SIBBX28* não altera a transição de meristema vegetativo para meristema floral. Já, como esperado, a transição no genótipo mutante *Slsft* foi retardada,

observando-se meristema de transição apenas 20 DPG (Figura 20A) (Molinero-Rosales 2004).

Inicialmente, foi analisado se o silenciamento do gene *SIBBX28* impacta os níveis de mRNA do florígeno *SISFT* em cotilédones (Figura 20B). Verificou-se que o pico de expressão do gene *SISFT* ocorreu aos 4 DPG, reduzindo gradualmente tanto no controle quanto na transgênica sem apresentar diferenças, indicando que *SIBBX28* não afeta a expressão do regulador de floração *SISFT*.

Posteriormente, foi quantificado o nível de expressão do gene *SIBBX28* nos meristemas dos genótipos WT e *Slsft*. Nos meristemas controles, o nível de transcritos de *SIBBX28* atingiu o nível mais alto 10 DPG, ou seja, quando o meristema estava na fase de transição, e se manteve alto em meristemas de plântulas com 20 DPG. Já em *Slsft*, a expressão de *SIBBX28* apresentou um retardo, alcançando expressão máxima apenas 20 DPG, coincidindo também com o meristema na fase de transição (Figura 20C).

As plantas silenciadas para *SIBBX28* apresentaram menos flores por inflorescência. Recentemente, o gene *FRUITFULL 2 (SIFUL2)* foi caracterizado como regulador da arquitetura da inflorescência atuando como repressor da ramificação da mesma (Jiang *et al.* 2022). Assim, o nível de expressão desse gene foi analisado em meristemas das plantas WT e L10. *SIFUL2* apresentou o nível máximo de expressão 20 DPG; porém, nas plantas silenciadas para o gene *SIBBX28* verificou-se aumento expressivo (~50%) na quantidade de mRNA nos três estágios do desenvolvimento dos meristemas analisados (Figura 20D).

Finalmente, foi reportado que as auxinas se acumulam nos meristemas de transição em tomateiro (Goldental-Cohen *et al.* 2017); e, por outro lado, nossos dados demonstram que *SIBBX28* afeta o metabolismo e sinalização desse hormônio. Neste contexto, o perfil de mRNA de *SIYUC8C* foi avaliado. O nível de transcritos no meristema de transição (10 DPG) da linhagem silenciada foi menor que no genótipo selvagem WT, enquanto não foram encontradas alterações nos meristemas vegetativos (4 DPG) e florais (20 DPG) (Figura 20E).

Desta forma, estes resultados sugerem que *SIBBX28* atua na determinação do número de flores a jusante de *SISFT* a partir da fase de transição meristemática, estimulando o metabolismo de auxinas o que, finalmente, afeta a arquitetura da inflorescência.

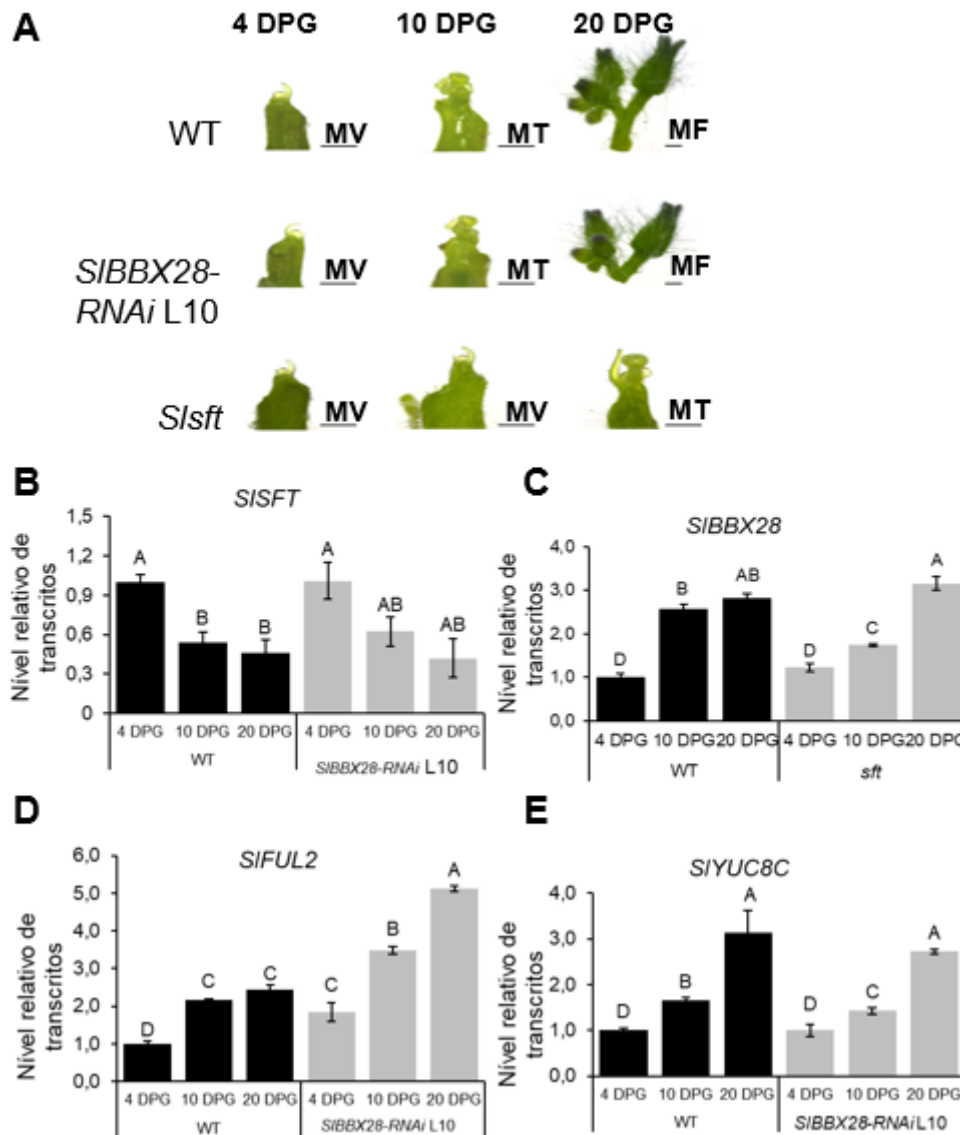


Figura 20: Papel de SIBBX28 floração. (A) Imagem ilustrativa dos ápices com 4, 10 e 20 dias pós-germinação (DPG), dos genótipos selvagem (WT), silenciada (*SIBBX28-RNAi L10*) e mutante (*Slst*). MV: meristema vegetativo; MT: meristema de transição; MF: meristema floral. (B) Nível relativo de transcritos do gene *SIFST* em cotilédones WT e *SIBBX28-RNAi L10*. (C) Nível relativo de transcritos do gene *SIBBX28* em ápices WT e *Slst*. (D) Nível relativo de transcritos do gene *SIFUL2* em ápices WT e *SIBBX28-RNAi L10*. (E) Nível relativo de transcritos do gene *SIYUC8C* em ápices WT e *SIBBX28-RNAi L10*. Os valores são médias \pm EP de pelo menos três réplicas biológicas. Os dados foram normalizados em relação à amostra controle WT 4 DPG. Diferentes letras representam diferenças estatísticas significativas em relação à amostra controle WT ($P < 0,05$); escala: 500 μ m.

4.3 Discussão

Os membros da família de proteínas BBX são fatores de transcrição que participam da regulação de vários processos do desenvolvimento vegetal como a fotomorfogênese e termomorfogêneses de plântulas, floração e evitação de sombra (Gangappa e Botto 2014; Song *et al.* 2020; Yadav *et al.* 2020).

Em tomateiro, apenas dois genes *SIBBX* foram funcionalmente caracterizados. A proteína codificada pela *locus* Solyc01g110180 participa da transdução do sinal de UV-B (Yang *et al.* 2022), da carotenogênese em frutos (Xiong *et al.* 2019) e do acúmulo de antocianinas nas folhas (Luo *et al.* 2021). Já o produto proteico do *locus* Solyc07g052620 regula o crescimento vegetativo e a tolerância ao estresse térmico (Xu *et al.* 2022).

Com o objetivo de expandir o conhecimento sobre a família de proteínas BBXs em *Solanum lycopersicum*, as quais numa cultura de importância agrônômica como tomateiro possuem potencial biotecnológico, este trabalho caracterizou o gene *SIBBX28*. O mesmo foi escolhido por ser responsivo à luz e por ser o possível ortólogo do gene *AtBBX28*, regulador negativo do sinal luminoso induzido por luz (Lin *et al.* 2018) segundo os resultados do primeiro capítulo do presente trabalho (Lira *et al.* 2020).

Para atingir o objetivo, foi realizada a caracterização fenotípica de plantas constitutivamente silenciadas para *SIBBX28* obtidas utilizando a estratégia de RNA de interferência (RNAi). Embora não foi verificado co-silenciamento de genes parálogos, foram observados níveis aumentados de mRNA do gene *SIBBX31*, um parálogo próximo de *SIBBX28*, em frutos (Figura 10B). Essa regulação positiva pode ser atribuída à repressão de *SIBBX31* por *SIBBX28* e/ou um mecanismo compensatório, caso ambas proteínas atuem de forma conjunta, assim como descrito para o par de parálogos de *A. thaliana* *AtBBX28/AtBBX29* (Song *et al.* 2020).

As plantas deficientes em *SIBBX28* apresentaram um severo efeito sobre o crescimento e a floração que resultou em plantas de porte reduzido (Figura 12), e com menos folhas (Figura 11C), flores (Figura 13A) e frutos (Figura 13B). O metabolismo e a sinalização de auxinas (Figura 18), que desempenham uma função importante em ambos os processos (Cheng e Zhao 2007; Perrot-Rechenmann 2010; Scarpella *et al.* 2010; Yamaguchi *et al.* 2013), também apresentaram redução nas plantas transgênicas. Adicionalmente, o estiolamento de hipocótilo, processo no qual as auxinas também são

fundamentais (Swarup *et al.* 2002; Halliday *et al.* 2009), foi afetado pelo silenciamento de *SIBBX28*.

A interação entre hormônios e proteínas BBX tem sido relatada; diversos estudos de expressão gênica mostraram que as proteínas BBX participam da transdução do sinal de vários hormônios como ácido abscísico, giberelinas, ácido jasmônico e etileno (Vaishak *et al.* 2019). No caso das auxinas, em *A. thaliana*, sabe-se que AtBBX21 regula negativamente os genes responsivos à auxina durante a resposta de evitação à sombra (Crocco *et al.* 2011) e AtBBX16 inibe a biossíntese de auxina de forma dependente do FITOCROMO B (Zhang *et al.* 2014). Portanto, os dados aqui obtidos expandem essas interações BBX-hormônios, revelando que *SIBBX28* atua como um regulador positivo do metabolismo e sinalização de auxina.

A manipulação de caracteres relacionados à floração é uma estratégia chave para melhorar a produção de frutos em tomateiro (Krieger *et al.* 2010). O modelo de transição do meristema vegetativo para floral mais conhecido foi descrito em *A. thaliana* e se baseia na ativação transcricional do florígeno *AtFT* pela proteína BBX CONSTANS (*AtCO*) nas folhas (Tiwari *et al.* 2010). Em seguida, *AtFT* é transportado através do floema até o meristema, onde se liga ao TF FLOWERING LOCUS D (*FD*) (Abe *et al.* 2005), o que leva a alterações no desenvolvimento do meristema, induzindo a diferenciação do meristema reprodutivo.

Como o silenciamento do gene *SIBBX28* teve um impacto na produção de frutos (Figura 13B) devido à redução do número de flores por inflorescência (Figura 14B), foi verificado se *SIBBX28* poderia funcionar de forma semelhante a *AtCO* desempenhando um papel na regulação de *SISFT* (ortólogo de *AtFT*). Não foram encontradas alterações nos níveis de transcritos de *SISFT* nas plantas silenciadas para *SIBBX28* (Figura 20B); o qual está de acordo com a ausência de diferenças temporais na diferenciação do meristema de transição (Figura 20A) e no início da antese (Figura 11A). Juntas, essas evidências indicam que *SIBBX28* não é um regulador a montante de *SISFT* na determinação do florescimento. A análise dos meristemas do mutante *Slsft* revelou um cenário interessante. Meir *et al.* (2021) analisou detalhadamente os transcriptomas de meristemas vegetativos tardios, transição, transição tardia e floração precoce em diferentes mutantes de tomateiro. Analisando os dados desse trabalho identificamos níveis reduzidos de mRNA de *SIBBX28* nos meristemas da mutante *Slsft* (<https://tanaylab.weizmann.ac.il/SMT/>). Os dados aqui obtidos avaliaram o perfil de mRNA de *SIBBX28* em um período de tempo mais amplo, aos 4, 10 e 20 DPG,

correspondendo a meristemas vegetativos, de transição e de floração tardia para o genótipo controle (Figura 20C). Já, na mutante *Slsft*, os meristemas aos 4 e 10 DPG correspondem a meristemas vegetativos, e a 20 DPG a meristema de transição (Figura 20A). Ao analisar o perfil de *SIBBX28*, foi possível identificar que, em ambos os genótipos, os transcritos de *SIBBX28* atingem a máxima expressão no meristema de transição, ou seja, em meristemas WT com 10 DPG e meristemas mutantes *Slsft* com 20 DPG (Figura 20A).

Em tomateiro, as auxinas se acumulam nos meristemas de transição (Goldental-Cohen *et al.* 2017) e são importantes para o desenvolvimento adequado da arquitetura da inflorescência (Heisler *et al.* 2005; Teo *et al.* 2014; Galli *et al.* 2015). O fato de que os meristemas de transição das plantas deficientes em *SIBBX28* apresentem menor expressão do gene da biossíntese de auxina *SIYUC8C* (Figura 20E) e aumento nos níveis de transcritos do regulador negativo de ramificação da inflorescência *SIFUL2* (Figura 20D) sugere que *SIBBX28* participa da determinação do número de flores por inflorescência de forma dependente de auxinas. Reforçando esta conclusão, a mutante deficiente em *SIWOX9* (*WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 9*), a qual apresenta maior número de flores por inflorescência que o genótipo selvagem, acumula maiores níveis de mRNA de *SIBBX28* em meristemas vegetativos tardios, transição, transição tardia e floração precoce (Meir *et al.* 2021; <https://tanaylab.weizmann.ac.il/SMT/>).

Inicialmente, *SIBBX28* foi escolhido para ser caracterizado por estar filogeneticamente relacionado com *AtBBX28*, portanto, um possível ortólogo (Lira *et al.* 2020). Os dados obtidos aqui sobre o efeito de *SIBBX28* no estiolamento de hipocótilos e tempo de floração diferem do reportado para o possível ortólogo de *A. thaliana*. Os dados publicados mostraram que *AtBBX28* é um regulador negativo do alongamento do hipocótilo em plântulas expostas à luz (Lin *et al.* 2018) A respeito da floração, *AtBBX28* interage com *AtCO* reduzindo a quantidade desta proteína livre disponível para ativar o promotor de *AtFT* resultando na inibição do florescimento (Liu *et al.* 2020). Coletivamente, estes resultados indicam que *SIBBX28* tem papel nos mesmos processos biológicos que *AtBBX28*, no entanto não por meio dos mesmos mecanismos. Assim, *SIBBX28* não parece ser um ortólogo funcional de *AtBBX28*.

Em conclusão, o silenciamento de *SIBBX28* comprometeu o metabolismo e a sinalização da auxina afetando o estiolamento, levando a uma redução no crescimento vegetativo e no número de flores por inflorescências, resultando assim em plantas com menor produtividade (Figura 21).

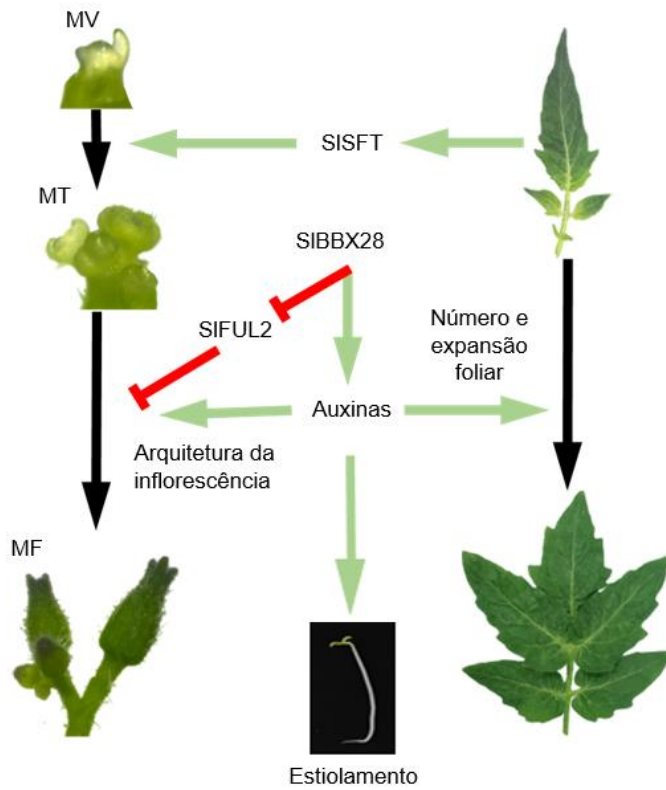


Figura 21: Modelo proposto do papel da SIBBX28 na fisiologia de plantas de tomateiro. A SIBBX28 regula positivamente o metabolismo e a sinalização das auxinas, controlando o número de folhas e a expansão foliar. Para a formação do meristema floral, o SISFT é translocado das folhas para os meristemas vegetativos (MV), onde ocorre a transição do meristema vegetativo para o reprodutivo (MT). Neste estágio, o mRNA de *SIBBX28* atinge a máxima expressão, regulando positivamente o metabolismo de auxinas, e negativamente o gene *SIFUL2*, levando a correta ramificação da inflorescência em meristemas florais (MF). *SIBBX28* também controla o alongamento do hipocótilo no escuro por meio da regulação positiva da biossíntese de auxinas. As setas pretas indicam processos de desenvolvimento. As setas vermelhas e verdes indicam mecanismos reguladores negativos e positivos, respectivamente.

5. REFERÊNCIAS

- Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, Ichinoki H, Notaguchi M, Goto K, Araki T (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* 309:1052-1056.
- Abelenda JA, Cruz-Oró E, Franco-Zorrilla JM, Prat S (2016). Potato StCONSTANS-like1 Suppresses Storage Organ Formation by Directly Activating the FT-like *StSP5G* Repressor. *Current Biology* 26:872–881.
- Álvarez-Flórez, F, López-Cristoffanini C, Jáuregui O, Melgarejo LM, López-Carbonell (2017). Changes in ABA, IAA and JA levels during calyx, fruit and leaves development in cape gooseberry plants (*Physalis peruviana* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 115:174-182.
- Alves FRR, Lira BS, Pikart FC, Monteiro SS, Furlan CM, Purgatto E, Pascoal GB, Andrade SCS, Demarco D, Rossi M, Freschi L (2020). Beyond the limits of photoperception: constitutively active PHYTOCHROME B2 overexpression as a means of improving fruit nutritional quality in tomato. *Plant Biotechnology Journal* 18:2027-2041.
- Amaral LIV, Costa PMF, Aidar MPM, Gaspar M, Buckeridge MS (2007). Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea* 34:425-431.
- Azari R, Tadmor Y, Meir A, Reuveni M, Evenor D, Nahon S, Shlomo H, Chen L, Levin I (2010). Light signaling genes and their manipulation towards modulation of phytonutrient content in tomato fruits. *Biotechnology Advances* 28:108-118.
- Bianchetti RE, Cruz AB, Oliveira BS, Demarco D, Purgatto E, Peres LEP, Rossi M, Freschi L (2017). Phytochromobilin deficiency impairs sugar metabolism through the regulation of cytokinin and auxin signaling in tomato fruits. *Sci Rep* 7:7822.
- Bianchetti RE, Lira BS, Monteiro SS, Demarco D, Purgatto E, Rothan C, Rossi M, Fresch L (2018). Fruit-localized phytochromes regulate plastid biogenesis, starch synthesis, and carotenoid metabolism in tomato. *Journal of Experimental Botany* 15:3573-3586.
- Bursch K, Toledo-Ortiz G, Pireyre M, Lohr M, Braatz C, Johansson H. (2020). Identification of BBX proteins as rate-limiting cofactors of HY5. *Nature Plants* 6:921-928.
- Butler WL, Norris KH, Siegelman HW, Hendricks SB (1959). Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 45:1703-1708.
- Cai D, Liu H, Sang N, Huang X (2017). Identification and characterization of CONSTANS-like (COL) gene family in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plos One* 12:e0179038.
- Cao Y, Meng D, Han Y, Chen T, Jiao C, Chen Y, Qing J, Cai Y (2019). Comparative analysis of *B-BOX* genes and their expression pattern analysis under various treatments in *Dendrobium officinale*. *BMC Plant Biol.* 19:245.
- Carrari F, Fernie AR. (2006). Metabolic regulation underlying tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany* 57:1883-1897.
- Chang CSJ, Li YH, Chen LT, Chen WC, Hsieh WP, Shin J, Jane W, Chou S, Choi G, Hu J, Somerville S (2008). LZFI, a HY5-regulated transcriptional factor, functions in Arabidopsis de-etiolation. *The Plant Journal* 54:205-219.
- Chang CSJ, Maloof JN, Wu, SH (2011). COP1-mediated degradation of BBX22/LZF1 optimizes seedling development in Arabidopsis. *Plant Physiology* 156:228-239.

- Chaurasia AK, Patil HB, Azeez A, Subramaniam VR, Krishna B, Sane AP, Sane PV (2016). Molecular characterization of CONSTANS-Like (COL) genes in banana (*Musa acuminata* L. AAA Group, cv. Grand Nain). *Physiology and Molecular Biology of Plants* 22:1-15.
- Chen M, Chory J (2011). Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development. *Trends Cell Biol.* 21:664-671.
- Chen M, Tao Y, Lim J, Shaw A, Chory J (2005). Regulation of phytochrome B nuclear localization through light-dependent unmasking of nuclear-localization signals. *Current Biology* 15:637-642.
- Cheng Y, Zhao Y (2007). A role for auxin in flower development. *Journal of Integrative Plant Biology* 49:99-104.
- Chia TYP, Müller A, Jung C, Mutasa-Göttgens ES (2008). Sugar beet contains a large CONSTANS-LIKE gene family including a CO homologue that is independent of the early-bolting (B) gene locus. *Journal of Experimental Botany* 59:2735-2748.
- Chory J, Peto C, Feinbaum R, Pratt L, Ausubel F (1989). *Arabidopsis thaliana* mutant that develops as a light-grown plant in the absence of light. *Cell* 58:991-999.
- Chu Z, Wang X, Li Y, Yu H, Li J, Lu Y, Li H, Ouyang B (2016). Genomic organization, phylogenetic and expression analysis of the B-BOX gene family in tomato. *Front. Plant Sci.*7:1552.
- Clack T, Mathews S, Sharrock RA (1994). The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of *PHYD* and *PHYE*. *Plant Mol. Bio.* 25:413-427.
- Crocco CD, Holm M, Yanovsky MJ, Botto JF (2010). AtBBX21 and COP1 genetically interact in the regulation of shade avoidance. *Plant J.* 64:551-62.
- Crocco CD, Holm M, Yanovsky MJ, Botto JF (2011). Function of B-BOX under shade. *Plant Signaling and Behavior* 6:101-104.
- Datta S, Hettiarachchi C, Johansson H, Holm M (2007). SALT TOLERANCE HOMOLOG2, a B-box protein in *Arabidopsis* that activates transcription and positively regulates light-mediated development. *Plant Cell* 19:3242-3255.
- Datta S, Hettiarachchi GHCM, Deng XW, Holm M (2006). *Arabidopsis* CONSTANS-LIKE3 Is a Positive Regulator of Red Light Signaling and Root Growth. *The Plant Cell* 18:70-84.
- Datta S, Johansson H, Hettiarachchi C, Irigoyen ML, Desai M, Rubio V, Holm M (2008). LZFI/SALT TOLERANCE HOMOLOG3, an *Arabidopsis* B-box protein involved in light-dependent development and gene expression, undergoes COP1-mediated ubiquitination. *Plant Cell* 20:2324-2338.
- Davuluri GR, Tuinen AV, Mustilli AC, Manfredonia A, Newman R, Burgess D, Brummell DA, King SR, Palys J, Uhlig J, Pennings HMJ, Bowler C (2004). Manipulation of *DET1* expression in tomato results in photomorphogenic phenotypes caused by post-transcriptional gene silencing. *The Plant Journal* 40:344-354.
- Demotes-Mainard S, Péron T, Corot A, Bertheloot J, Gourrierc JL, Pelleschi-Travier S, Crespel L, Morel P, Huché-Thélier L, Boumaza R, Vian A, Guérin V, Leduc N, Sakr S (2016). Plant responses to red and far-red lights, applications in horticulture. *Environ. Exp. Bot.* 121:4-21.
- Egea I, Barsan C, Bian W, Purgatto E, Latché A, Chervin C, Bouzayen M, Pech JC (2010). Chromoplast differentiation: current status and perspectives. *Plant and Cell Physiology* 51:1601-1611.

- Enfissi EMA, Barneche F, Ahmed I, Lichtlé C, Gerrish C, McQuinn RP, Giovannoni JJ, Lopez-Juez E, Bowler C, Bramley PM, Fraser PD (2010). Integrative Transcript and Metabolite Analysis of Nutritionally Enhanced *DE-ETIOLATED1* Downregulated Tomato Fruit. *The Plant Cell* 22:1190-1215.
- Fan XY, Sun Y, Cao DM, Bai MY, Luo XM, Yang HJ, Wei CQ, Zhu SW, Sun Y, Chong K, Wang ZY (2012). BZS1, a B-box protein, promotes photomorphogenesis downstream of both brassinosteroid and light signaling pathways. *Mol. Plant.* 5:591-600.
- Fankhauser C, Chen M (2008). Transposing phytochrome into the nucleus. *Trends in Plant Science* 13:596-601.
- Fraser PD, Pinto MES, Holloway DE, Bramley PM (2000). Application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids. *The Plant Journal* 24:551-558.
- Freschi L, Rodrigues MA, Tine MAS, Mercier H (2010). Correlation between citric acid and nitrate metabolisms during CAM cycle in the atmospheric bromeliad *Tillandsia pohliana*. *Journal of Plant Physiology* 167:1577-1583.
- Galli M, Liu Q, Moss BL, Malcomber S, Li W, Gaines C, Federici S, Roshkovan J, Meeley R, Nemhauser JL, Gallavotti A (2015). Auxin signaling modules regulate maize inflorescence architecture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112:13372-13377.
- Gangappa SN, Botto JF (2014). The BBX family of plant transcription factors. *Trends Plant Science* 19:460-470.
- Gangappa SN, Botto JF (2016). The Multifaceted Roles of HY5 in Plant Growth and Development. *Molecular Plant* 9:1353-1365.
- Gangappa SN, Crocco CD, Johansson H, Datta S, Hettiarachchi C, Holm M, Botto JF (2013). The Arabidopsis B-BOX protein BBX25 interacts with HY5, negatively regulating BBX22 expression to suppress seedling photomorphogenesis. *Plant Cell* 25:1243-1257.
- Gendron JM, Pruneda-Paz JL, Doherty CJ, Gross AM, Kang SE, Kay SA (2012). The *Arabidopsis* circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor. *PNAS* 109:3167-3172.
- Goldental-Cohen, S. Israeli, A. Ori, N. and Yasuor, H (2017). Auxin response dynamics during wild-type and entire flower development in tomato. *Plant and Cell Physiology* 58:1661-1372.
- Gramegna G, Rosado D, Carranza APS, Cruz AB, Moya MS, Llorente B, Concepción MR, Freschi L, Rossi M (2018). PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 3 mediates light-dependent induction of tocopherol biosynthesis during tomato fruit ripening. *Plant Cell Environment* 42:1328-1339.
- Gyula P, Schäfer E, Nagy F (2003). Light perception and signalling in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* 6:446-452.
- Hahn J, Strauss HM, Landgraf FT, Gimènè HF, Lochnit G, Schmieder P, Hughes J (2006). Probing protein chromophore interactions in Cph 1 phytochrome by mutagenesis. *The FEBS Journal* 273:1415-1429.
- Halliday KJ, Martínez-García JF, Josse EM (2009). Integration of light and auxin signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1:a001586.
- Heisler MG, Ohno C, Das P, Sieber P, Reddy GV, Long JA, Meyerowitz EM (2005). Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Current Biology* 15:1899-1911.

- Hoang QTN, Han YJ, Kim JI (2019). Plant Phytochromes and their Phosphorylation. *International Journal of Molecular Sciences* 20:3450.
- Hoecker U (2017). The activities of the E3 ubiquitin ligase COP1/SPA, a key repressor in light signaling. *Plant Biol.* 37:63-69.
- Holm M, Hardtke CS, Gaudet R, Deng XW (2001). Identification of a structural motif that confers specific interaction with the WD40 repeat domain of *Arabidopsis* COP1. *EMBO J.* 20:118-127.
- Holtan HE, Bandong S, Marion CM, Adam L, Tiwari S, Shen Y, Maloof JN, Maszle DR, Ohto M-a, Preuss S, Meister R, Petracek M, Repetti PP, Reuber TL, Ratcliffe OJ, Khanna R (2011). BBX32, an *Arabidopsis* B-Box protein, functions in light signaling by suppressing HY5-regulated gene expression and interacting with STH2/BBX21. *Plant Physiology* 156:2109-2123.
- Inoue K, Nishihama, R, Kohchi T (2017). Evolutionary origin of phytochrome responses and signaling in land plants. *Plant Cell and Environment* 1:1-7.
- Jiang X, Lubini G, Hernandez-Lopes J, Rijnsburger K, Veltkamp V, de Maagd R A, Angenent GC, Bemer M (2022). *FRUITFULL-like* genes regulate flowering time and inflorescence architecture in tomato. *The Plant Cell* 34:1002-1019.
- Jiao YL, Lau OS, Deng XW (2007). Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nature Reviews Genetics* 8:217-230.
- Jin H, Xing M, Cai C, Li S (2020). B-box Proteins in *Arachis duranensis*: Genome-Wide Characterization and Expression Profiles Analysis. *Agronomy* 10:23.
- Khanna R, Kronmiller B, Maszle DR, Coupland G, Holm M, Mizuno T, Wu SH (2009). The *Arabidopsis* B-box zinc finger family. *Plant Cell* 21:3416-3420.
- Klee HJ, Giovannoni JJ (2011). Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annual Review of Genetics* 45:41-59.
- Krieger U, Lippman Z, Zamir D (2010) The flowering gene *SINGLE FLOWER TRUSS* drives heterosis for yield in tomato. *Nat Genet* 42:459-463.
- Lau OS, Deng XW (2012). The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later. *Trends in Plant Science* 17:584-593.
- Leivar P, Quail PH (2011). PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends Plant Science* 16:19-28.
- Lin F, Jiang Y, Li J, Yan T, Fan L, Liang J, Chen ZJ, Xu D, Deng XW (2018). B-BOX DOMAIN PROTEIN28 Negatively Regulates Photomorphogenesis by Repressing the Activity of Transcription Factor HY5 and Undergoes COP1-Mediated Degradation. *The Plant Cell* 30:2006-2019.
- Lira BS, Oliveira MJ, Shiose L, Wu RTA, Rosado D, Lupi ACD, Freschi L, Rossi M (2020). Light and ripening regulated BBX protein-encoding genes in *Solanum lycopersicum*. *Scientific Reports* 10:1-14.
- Liu Y, Lin G, Yin C, Fang Y (2020). B-box transcription factor 28 regulates flowering by interacting with CONSTANS. *Scientific Reports* 10:1-13.
- Liu Y, Roof S, Ye Z, Barry C, Tuinen AV, Vrebalov J, Bowler C, Giovannoni J (2004). Manipulation of light signal transduction as a means of modifying fruit nutritional quality in tomato. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 101:9897-9902.
- Llorente B (2016). Regulation of Carotenoid Biosynthesis in Photosynthetic Organs. In: Stange, C. (Ed.). *Carotenoid in Nature*. Barcelona: Springer International Publishing 79:141-160.
- Luo D, Xiong C, Lin A, Zhang C, Sun W, Zhang J, Yang C, Lu Y, Li H, Ye Z, He P, Wang T (2021). SIBBX20 interacts with the COP9 signalosome subunit SICSN5-2 to regulate anthocyanin biosynthesis by activating *SIDFR* expression in tomato. *Hortic Res.* 8:163.

- Luo X, Gao Z, Wang Y, Chen Z, Zhang W, Huang J, Yu H, He Y (2018). The NUCLEAR FACTOR-CONSTANS complex antagonizes Polycomb repression to de-repress FLOWERING LOCUS T expression in response to inductive long days in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 95:17-29.
- Lupi ACD, Lira BS, Gramegna G, Trench B, Alves FRR, Demarco D, Peres LEP, Purgatto E, Freschi L, Rossi M (2019). *Solanum lycopersicum* GOLDEN 2-LIKE 2 transcription factor affects fruit quality in a light- and auxin-dependent manner. *Plos ONE*.
- Ma L, Li G (2019). Auxin-dependent cell elongation during the shade avoidance response. *Frontiers in Plant Science* 10:914.
- Meir Z, Aviezer I, Chongloi GL, Ben-Kiki O, Bronstein R, Mukamel Z, Keren-Shaul H, Jaitin D, Tal L, Shalev-Schloser G, Harel TH, Tanay A (2021). Dissection of floral transition by single-meristem transcriptomes at high temporal resolution. *Nature Plants* 7:800-813.
- Melo NKG, Bianchetti RE, Lira BS, Oliveira PMR, Zuccarelli R, Dias DLO, Demarco D, Peres LEP, Rossi M, Freschi L (2016) Nitric oxide, ethylene, and auxin cross talk mediates greening and plastid development in deetioliating tomato seedlings. *Plant Physiol.* 170:2278-2294.
- Min JH, Chung JS, Lee KH, Kim CS (2015). The CONSTANS-like 4 transcription factors, AtCOL4, positively regulates abiotic stress tolerance through an abscisic acid-dependent manner in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology* 57:313-324.
- Mohr H (1972). Phytochrome and Seed Germination. In: *Lectures on Photomorphogenesis*. Springer.
- Molinero-Rosales N, Latorre A, Jamilena M, Lozano R (2004). SINGLE FLOWER TRUSS regulates the transition and maintenance of flowering in tomato. *Plant* 218:427-434.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15:473-497.
- Nagatani A (2004). Light-regulated nuclear localization of phytochromes. *Current Opinion in Plant Biology* 7:708-711.
- Nguyen CV, Vrebalov JT, Gapper NE, Zheng Y, Zhong S, Fei Z, Giovannoni JJ (2014). Tomato GOLDEN2-LIKE Transcription Factors Reveal Molecular Gradients That Function during Fruit Development and Ripening. *The Plant Cell* 26:585-601.
- Obel HO, Cheng C, Li Y, Tian Z, Njogu MK, Li J, Lou Q, Yu X, Yang Z, Ogwenjo JO, Chen J (2022). Genome-Wide Identification of the B-Box Gene Family and Expression Analysis Suggests Their Potential Role in Photoperiod-Mediated β -Carotene Accumulation in the Endocarp of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Fruit. *Genes* 13:658.
- Perrot-Rechenmann C (2010). Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2:a001446.
- Powell ALT, Nguyen CV, Hill T, Cheng KL, Figueroa-Balderas R, Aktas H, Ashrafi H, Pons C, Fernández-Muñoz R, Vicente A, Lopez-Baltazar, Barry CS, Liu Y, Chetelat R, Granell A, Deynze AV, Giovannoni JJ, Bennett AB (2012). Uniform ripening Encodes a *Golden 2-like* Transcription Factor Regulating Tomato Fruit Chloroplast Development. *Science* 336:1711-1715.
- Purgatto E, Nascimento JRO, Lajolo FM, Cordenunsi BR (2002). The onset of starch degradation during banana ripening is concomitant to changes in the content of

- free and conjugated forms of indole-3-acetic acid. *Journal of Plant Physiology* 159:1105-1111.
- Quadrana L Almeida J, Otaiza SN, Duffy T, Corrêa da Silva JV, de Godoy F, Asís R, Bermúdez L, Fernie AR, Carrari F, Rossi M (2013). Transcriptional regulation of tocopherol biosynthesis in tomato. *Plant Molecular Biology* 81:309-325.
- Quail PH. (2002). Phytochrome photosensory signalling networks. *Nature Review Molecular and Cell Biology* 3:85-93.
- Rosado D, Trench B, Bianchetti R, Zuccarelli R, Alves FRR, Purgatto E, Floh EIS, Nogueira FTS, Freschi L, Rossi M (2019). Downregulation of PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4 Influences Plant Development and Fruit Production. *Plant Physiology* 181:1360-1370.
- Ruijter JM, van der Velden S, Ilgun A. LinReg PCR (11.0) (2009). Analysis of quantitative. e RT-PCR data [computer program]. Version 11.0 (Heart Failure Research, Center Academic Medical Centre, Amsterdam).
- Sambrook J; Fritsch EF; Maniatis T (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scarpella E, Barkoulas M, Tsiantis M (2010). Control of leaf and vein development by auxin. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2:a 001511.
- Sérino S, Gomez L, Costagliola GUY, Gautier H (2009). HPLC assay of tomato carotenoids: validation of a rapid microextraction technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:8753-8760.
- Shalmani A, Fan S, Jia P, Li G, Muhammad I, Li Y, Sharif R, Dong F, Zuo X, Li K, Chen K, Han M (2018). Genome Identification of B-BOX Gene Family Members in Seven Rosaceae Species and Their Expression Analysis in Response to Flower Induction in *Malus domestica*. *Molecules* 23:1763.
- Shalmani A, Jing XQ, Shi Y, Muhammad I, Zhou MR, Wei XY, Chen QQ, Li WQ, Liu WT, Chen KM (2019). Characterization of B-BOX gene family and their expression profiles under hormonal, abiotic and metal stresses in Poaceae plants. *BMC Genomics* 20:27.
- Sheng P, Wu F, Tan J, Zhang H, Ma W, Chen L, Wang J, Wang J, Zhu S, Guo X, Wang J, Zhang X, Cheng Z, Bao Y, Wu C, Liu X, Wan J (2016). A CONSTANS-like transcriptional activator, OsCOL13, functions as a negative regulator of flowering downstream of *OsphyB* and upstream of *Ehd1* in rice. *Plant Mol. Biol.* 92:209-222.
- Shin AY, Han YJ, Baek A, Ahn T, Kim SY, Nguyen TS, Filho M, Lee KW, Shen Y, Song PS, Kim JII (2016). Evidence that phytochrome functions as a protein kinase in plant light signalling. *Nat Commun* 7:11545.
- Silva GFF, Silva EM, Correa JPO, Vicente MH, Jiang N, Notini MILIMETERS, Júnior AC, De Jesus FA, Castilho P, Carrera E, López-Díaz I, Grotewold E, Peres LEP, Nogueira FTS (2019). Tomato floral induction and flower development are orchestrated by the interaction between gibberellin and two unrelated microRNA-controlled modules. *New Phytologist*. 221:1328-1344.
- Silveira V, Balbuena TS, Santa-Catarina C, Floh EIS, Guerra MP, Handro W (2004). Biochemical changes during seed development in *Pinus taeda* L. *Plant Growth Regul.* 44:147-156.
- Song Z, Bian Y, Liu J, Sun Y, Xu D (2020). B-box proteins: Pivotal players in light-mediated development in plants. *J Integr Plant Biol.* 9:1293-1309.
- Swarup R, Parry G, Graham N, Allen T, Bennett M (2002). Auxin cross-talk: integration of signalling pathways to control plant development. *Plant Molecular Biology* 49:411-426.

- Talar U, Kielbowicz-Matuk A (2021). Beyond Arabidopsis: BBX Regulators in Crop Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 22:2906.
- Talar U, Kielbowicz-Matuk A, Czarnecka J, Rorat T (2017). Genome-wide survey of B-box proteins in potato (*Solanum tuberosum*)-Identification, characterization and expression patterns during diurnal cycle, etiolation and de-etiolation. *PloS One.* 12:e0177471.
- Tan J, Jin M, Wang J, Wu F, Sheng P, Cheng Z, Wang J, Zheng X, Chen L, Wang M, Zhu S, Guo X, Zhang X, Liu X, Wang C, Wang H, Wu C, Wan J (2016). OsCOL10, a CONSTANS-Like Gene, Functions as a Flowering Time Repressor Downstream of Ghd7 in Rice. *Plant Cell Physiol.* 57:798-812.
- Teo ZWN, Song S, Wang YQ, Liu J, Yu H (2014). New insights into the regulation of inflorescence architecture. *Trends in Plant Science* 19:158-165.
- Tiwari SB, Shen Y, Chang HC, Hou Y, Harris A, Ma SF, McPartland M, Hymus GJ, Adam L, Marion C, Belachew A, Repetti PP, Reuber TL, Ratcliffe OJ (2010). The flowering time regulator CONSTANS is recruited to the FLOWERING LOCUS T promoter via a unique cis-element. *New Phytologist* 187:57-66.
- Vaishak KP, Yadukrishnan P, Bakshi S, Kushwaha AK, Ramachandran H, Job N, Babu D, Datta S (2019). The B-box bridge between light and hormones in plants. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 191:164-174.
- Veltkamp V (2021). *A sweeter tomato: cracking the Cis-regulatory code of gene regulation.* Wageningen University.
- Wang CQ, Guthrie C, Sarmast MK, Dehesh K (2014). BBX19 interacts with CONSTANS to repress FLOWERING LOCUS T transcription, defining a flowering time checkpoint in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 26:3589-3602.
- Wang CQ, Sarmast MK, Jiang J, Dehesh K (2015). The transcriptional regulator BBX19 promotes hypocotyl growth by facilitating COP1-mediated EARLY FLOWERING3 degradation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 27:1128-1139.
- Wang H, Zhang Z, Li H, Zhao X, Liu X, Ortiz M, Lin C, Liu B (2013). CONSTANS-LIKE 7 regulates branching and shade avoidance response in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 64:1017-1024.
- Wang S, Liu J, Feng Y, Niu X, Giovannoni J, Liu Y (2008). Altered plastid levels and potential for improved fruit nutrient content by downregulation of the tomato DDB1-interacting protein CUL4. *The Plant Journal* 55:89-103.
- Wang W, Wang P, Li X, Wang Y, Tian S, Qin G. (2021). The transcription factor SIHY5 regulates the ripening of tomato fruit at both the transcriptional and translational levels. *Hortic Res.* 8:83.
- Wei CQ, Chien CW, Ai LF, Zhao J, Zhang Z, Li KH, Burlingame AL, Sun Y, Wang ZY (2016). The *Arabidopsis* B-box protein BZS1/BBX20 interacts with HY5 and mediates strigolactone regulation of photomorphogenesis. *Journal of Genetics and Genomics* 43:555-563.
- Wei H, Wang P, Chen J, Li C, Wang Y, Yuan Y, Fang J, Leng X (2020). Genome-wide identification and analysis of B-BOX gene family in grapevine reveal its potential functions in berry development. *BMC Plant Biology* 20:1-19.
- Wu F, Price BW, Haider W, Seufferheld G, Nelson R, Hanzawa Y (2014). Functional and evolutionary characterization of the CONSTANS gene family in short-day photoperiodic flowering in soybean. *PLoS One* 9:e85754.
- Xiong Y, Jiao Y (2019). The diverse roles of auxin in regulating leaf development. *Plants* 8:243.
- Xu D (2020). COP1 and BBXs-HY5-mediated light signal transduction in plants. *New Phytologist* 228:1748-1753.

- Xu X, Xu J, Yuan C, Chen Q, Liu Q, Wang X, Qin C (2022). BBX17 Interacts with CO and Negatively Regulates Flowering Time in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 63:401-409.
- Yadav A, Ravindran N, Singh D, Rahul PV, Datta S (2020). Role of Arabidopsis BBX proteins in light signaling. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 29:623-635.
- Yadukrishnan P, Job N, Johansson H, Datta S (2018). Opposite roles of group IV BBX proteins: Exploring missing links between structural and functional diversity. *Plant Signaling & Behavior* 13(8):e1462641.
- Yamaguchi N, Wu MF, Winter CM, Berns MC, Nole-Wilson S, Yamaguchi A, Coupland G, Krizek BA, Wagner D (2013). A molecular framework for auxin-mediated initiation of flower primordia. *Developmental Cell* 24:271-282.
- Yan H, Marquardt K, Indorf M, Jutt D, Kircher S, Neuhaus G, Rodríguez-Franco M (2011). Nuclear localization and interaction with COP1 are required for STO/BBX24 function during photomorphogenesis. *Plant Physiol.* 156:1772-1782.
- Yang G, Zhang C, Dong H, Liu X, Guo H, Tong B, Fang F, Zhao Y, Yu Y, Liu Y, Lin L, Yin R (2022). Activation and negative feedback regulation of SIHY5 transcription by the SIBBX20/21–SIHY5 transcription factor module in UV-B signaling. *The Plant Cell* 34:2038-2055.
- Zhang X, Lin R (2017). Light signaling differentially regulates the expression of group IV of the B-box zinc finger Family. *Plant Signaling & Behavior* 12:1365213.
- Zhang Z, Ji R, Li H, Zhao T, Liu J, Lin C, Liu B (2014). CONSTANS-LIKE 7 (COL7) is involved in phytochrome B (phyB)-mediated light-quality regulation of auxin homeostasis. *Molecular Plant* 7:1429-1440.



OPEN

Light and ripening-regulated BBX protein-encoding genes in *Solanum lycopersicum*

Bruno Silvestre Lira¹, Maria José Oliveira^{1,3}, Lumi Shiose^{1,3}, Raquel Tsu Ay Wu¹, Daniele Rosado^{1,2}, Alessandra Cavalcanti Duarte Lupi¹, Luciano Freschi¹ & Magdalena Rossi¹

Light controls several aspects of plant development through a complex signalling cascade. Several B-box domain containing proteins (BBX) were identified as regulators of *Arabidopsis thaliana* seedling photomorphogenesis. However, the knowledge about the role of this protein family in other physiological processes and species remains scarce. To fill this gap, here BBX protein encoding genes in tomato genome were characterised. The robust phylogeny obtained revealed how the domain diversity in this protein family evolved in Viridiplantae and allowed the precise identification of 31 tomato SIBBX proteins. The mRNA profiling in different organs revealed that SIBBX genes are regulated by light and their transcripts accumulation is directly affected by the chloroplast maturation status in both vegetative and fruit tissues. As tomato fruits develops, three SIBBXs were found to be upregulated in the early stages, controlled by the proper chloroplast differentiation and by the PHYTOCHROME (PHY)-dependent light perception. Upon ripening, other three SIBBXs were transcriptionally induced by RIPENING INHIBITOR master transcriptional factor, as well as by PHY-mediated signalling and proper plastid biogenesis. Altogether, the results obtained revealed a conserved role of SIBBX gene family in the light signalling cascade and identified putative members affecting tomato fruit development and ripening.

Zinc finger transcription factors (TFs) comprise one of the most important families of transcriptional regulators in plants and play a central role in plant growth and development regulation, as well as in biotic and abiotic stress responses^{1,2}. Among these TFs, B-box domain containing proteins (BBX) belong to a subclass characterised by the presence of one or two zinc finger B-box domains, which are predicted to be involved in protein–protein interactions³. BBX proteins were classified into five structure groups, according to the number of B-box and CCT (CONSTANS, CONSTANS-like and TIMING OF CAB1) domains and VP (valine-proline) motifs. Members of group I are characterised by the presence of two B-box domains in tandem, one CCT domain and one VP motif. Group II is similar to group I, also presenting two B-box domains and one CCT domain, but no VP motif. Group III contains a single B-box domain and a CCT. Group IV is characterised by the presence of two B-box domains but without CCT domain. Finally, group V is composed by proteins with just one B-box domain^{3,4}. Although the VP is mentioned as a group I exclusive motif, it has already been identified in several proteins belonging to group III, IV and V; thus, the presence of the VP motif differs members from structure group I from II, but evidences show that it is not exclusive to the first⁵.

Out of the 32 BBX proteins identified in *Arabidopsis thaliana*, 21 have already been functionally characterised, being described as regulators of various processes such as seedling photomorphogenesis^{6,7}, photoperiodic flowering regulation⁸, shade avoidance⁹, and responses to biotic and abiotic stresses¹⁰. Interestingly, 14 BBX proteins were also found to be components of the light signalling transduction pathway^{4,6,11,12}, with 12 of them belonging to groups IV (8 proteins) and V (4 proteins). Four of the light-signalling group IV proteins act as positive regulators—AtBBX20¹³, AtBBX21¹⁴, AtBBX22¹⁵ and AtBBX23¹⁶—and the other four play a negative role—AtBBX18¹⁷, AtBBX19¹⁸, AtBBX24¹⁹ and AtBBX25^{20,21}. In the case of group V, only repressors of light signal transduction were reported, AtBBX28⁶, AtBBX30⁷, AtBBX31⁷ and AtBBX32²².

¹Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, 277, São Paulo 05508-090, Brasil. ²Present address: Cold Spring Harbor Laboratory, 1 Bungtown Road, Cold Spring Harbor, NY 11724, USA. ³These authors contributed equally: Maria José Oliveira and Lumi Shiose. ✉email: mmrossi@usp.br

BBX proteins act by the direct or indirect interaction with central components of the light signal transduction network, including the transcription factors ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5), HOMOLOG OF HY5 (HYH) and PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIFs), and the protein-ubiquitin ligase CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1 (COP1)^{4,23}. For instance, AtBBX21 and AtBBX22 promote HY5 transcript accumulation and can be tagged for proteasomal degradation via COP1-mediated ubiquitination^{14,24,25}. In contrast, AtBBX24 and AtBBX25 downregulate light signalling by the physical interaction with HYH and HY5^{20,26}. Interestingly, AtBBX28 was characterised as a light-induced light repressor, as it physically represses HY5 transcriptional regulatory activity and is marked for degradation in darkness by COP1⁶. Yet, it was demonstrated that PIF3 and PIF1 transcription factors signalling cascade regulates *AtBBX23* transcription, whose product physically interacts with HY5 inducing photomorphogenesis in *A. thaliana* seedlings¹².

The above-described links between BBXs and light signalling have been almost exclusively explored in seedling photomorphogenesis, and their role in other light-controlled physiological processes, such as plastid development and maintenance, plant architecture and fruit development, which are important determinants of crop yield and nutritional quality²⁷, remains elusive. In this context, although the effect of light perception and signalling in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit productivity and nutraceutical composition has been increasingly demonstrated^{28–35}, the association of the BBX protein family with light in this species is still elusive. In tomato, 29 BBX domain encoding genes were identified and reported to be modulated by abiotic stress and phytohormones³⁶. Additionally, the Solyc01g110180 locus encodes the only deeply characterised tomato BBX, which is a positive regulator of fruit carotenogenesis³⁷.

Here, a comprehensive genome survey allowed the identification of 31 BBX protein-encoding loci in tomato genome. A robust phylogenetic reconstruction corroborated the monophyletic nature of the five previously identified structure groups and allowed the proposition of a new interpretation of the evolutionary history of this protein family. Further, we focused on the transcriptional profile of the 15 genes belonging to groups IV and V, revealing their association with organ greening and light signalling. Additionally, six genes were either up- or downregulated from immature fruit stages towards ripening. Finally, it was addressed whether the mRNA accumulation of these six genes is regulated by PHYTOCHROME (PHY)-mediated light perception and/or plastid development and differentiation.

Materials and methods

Plant material, growth conditions and sampling. Different tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Micro-Tom genotypes were used for *SIBBXs* transcriptional analysis: control genotype harbouring the wild-type *GOLDEN-2 LIKE 2 (SIGLK2)* allele (WT)³⁸; uniform ripening *Slglk2* mutant, which is deficient in *SIGLK2*, the master transcription factor controlling fruit chloroplast differentiation and maintenance³³ and; fruit-specific transgenic lines silenced for *SIPHYA (SlphyA)* and *SIPHYB2 (SlphyB2)*³⁰. Although Micro-Tom cultivar is deficient in brassinosteroid biosynthesis due to the weak mutation *dwarf (d)*, it has been extensively demonstrated that represents a convenient and adequate model system to study fruit biology³⁹. In this work we used Micro-Tom variety because we have all the germplasm collection in this background, including *Slglk2* mutant and the fruit-specific *SIPHY*-silenced transgenic lines.

For the experiments with seedlings, seeds were in vitro germinated in the darkness as described in⁴⁰. After 2 days, seedlings were either kept in the darkness or transferred to the light (12 h photoperiod) for another 7 days, when hypocotyls and cotyledons were sampled.

Leaves and fruits were harvested from plants cultivated in 2L rectangular plastic pots containing a 1:1 mixture of substrate and vermiculite supplemented with NPK 10:10:10, dolomite limestone ($MgCO_3 + CaCO_3$) and magnesium thermophosphate (Yoorin), under controlled temperature (between 23 °C and 27 °C), daily automatically irrigation by capillarity, and under natural light conditions (13 h photoperiod and 250–350 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ of incident photo-irradiance) in a biosafety level 1 greenhouse.

Source and sink leaves were harvested from 4 and 8th phytomer closest to the base of the plant, respectively, of plants with 40-day-old plants³⁴. Fruit pericarp, without placenta and locule walls, was collected from fruits at different stages: (i) immature green 3 (IG3, approximately 8 days post-anthesis); (ii) immature green 5 (IG5, approximately 15 days post-anthesis); (iii) mature green (MG, when the placenta displays a gelatinous aspect, approximately 26 days post-anthesis); (iv) breaker (Br, beginning of ripening process when the fruit begins to present a yellowish coloration, approximately 32 days post-anthesis); (v) Br3 (three days after breaker stage, the fruits presents orange coloration); (vi) Br5 (5 days after breaker stage). Fruits were sectioned in three parts: (i) pedicellar, also known as the green shoulder, where developed chloroplast are predominately located, (ii) stylar region, which lacks developed chloroplasts, and (iii) the middle region that was discarded. For all the experiments, at least four pools of fruits (biological replicates) were harvested from at least five plants. Samples were frozen in liquid nitrogen and stored at – 80 °C freezer until processing. Mature green fruits were used for chromatin immunoprecipitation assay.

Phylogenetic analysis. For phylogenetic analysis BBX proteins from plant species representing angiosperms and Chlorophyta, as well as from *Homo sapiens* (as outgroup) were used. The loci encoding BBX proteins were retrieved from: Phytozome 12.1 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>) database for *Arabidopsis thaliana*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Solanum lycopersicum* and *Volvox carteri* and, from NCBI ref-seq database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>) for *Chlorella variabilis*, *Coccomyxa subellipsoidea* C-169, *Homo sapiens*, *Micromonas commode*, *Micromonas pusilla* CCMP1545, *Ostreococcus lucimarinus* CCE9901, *Ostreococcus tauri* and *Volvox carteri* f. *nagariensis* (Supplementary Table S1).

Sequences from *A. thaliana*³ and tomato³⁶ were named as previously reported. Amino acid sequences were aligned with Expresso T-COFFEE⁴¹ and the phylogeny was reconstructed as described in⁴². Briefly, the protein

alignment was subjected to maximum likelihood phylogenetic reconstruction (PHYML 3.0) by JTT model with the proportion of invariable sites and gamma shape parameter estimated from the data sample. The obtained tree was optimized by tree topology and branch length, improved by subtree pruning and regrafting, and the branch support was calculated by the approximate likelihood-ratio test Shimodaira-Hasegawa-like (aLTR SH-like).

Reverse transcriptase quantitative PCR analysis (RT-qPCR). RNA extraction, complementary DNA (cDNA) synthesis, primer design and RT-qPCR assays were performed as described by⁴³. Primer sequences used are detailed in Supplementary Table S2. qPCR reactions were carried out in a QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR system (Applied Biosystems) using 2X Power SYBR Green Master Mix reagent (Life Technologies) in a 10 μ L final volume. Absolute fluorescence data were analysed using the LinRegPCR software package⁴⁴ in order to obtain quantitation cycle (Cq) values and calculate PCR efficiency. Expression values were normalised against the geometric mean of two reference genes, *TIP41* and *EXPRESSED*, according to⁴³. A permutation test lacking sample distribution assumptions⁴⁵ was applied to detect statistical differences ($P < 0.05$) in expression ratios using the algorithms in the fgStatistics software package version 17/05/2012⁴⁶.

Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP). Full-length cDNA encoding RIPENING INHIBITOR transcription factor (*SRIN*, Solyc05g012020) without the stop codon was amplified with the primers listed in Supplementary Table S2. The fragment was cloned into pENTR/DTOPO using Gateway technology (Invitrogen). The entry plasmids were recombined into pK7FWG2⁴⁷ using LR Clonase (Invitrogen) to produce 35S::SRIN-GFP fusion protein. The construct obtained was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) for further infiltration. ChIP assay followed by qPCR was performed as described in³⁴. Briefly, MG fruits were agroinfiltrated with 35S::SRIN-GFP construct, kept for 3 days under 16 h/8 h photoperiod, and fixed with formaldehyde to promote the cross-linking between DNA and proteins. Following nuclei enrichment with a Percoll (GE Healthcare) gradient, the chromatin was fragmented by sonication (10 s on/20 s off, amplitude 70, during 10 min using QSonica700 device) and then incubated with Dynabeads Protein-A (Invitrogen) with either anti-GFP or anti-HA antibodies (Invitrogen). Next, the immunoprecipitated DNA was purified by phenol:chloroform:isoamyl alcohol extraction and used as template for qPCR analysis. Specific primer pairs flanking the predicted TF binding motif for each promoter region and the coding region of *SIACTIN4* gene⁴⁸ as control non-binding region (Supplementary Table S2) were used.

Data analyses. Differences in parameters were analysed using Infostat software version 17/06/2015⁴⁹. When the data set showed homoscedasticity, Student's *t*-test ($P < 0.05$) was performed to compare transgenic lines against the control genotype. In the absence of homoscedasticity, a non-parametric comparison was performed by applying the Mann-Whitney test ($P < 0.05$). All values represent the mean of at least three biological replicates.

Transcription factor binding motifs were identified on the 3000 bp upstream of the transcription initiation site using PlantPAN 2.0⁵⁰.

Results

***Solanum lycopersicum* harbours similar diversity of BBX protein-encoding genes than *A. thaliana*.** The BBX TF family has been extensively studied in *A. thaliana*, whose proteins were classified into five groups accordingly to the domain structure^{3,5}. Similar classification was reported for other species such as tomato³⁶, potato⁵¹, rice⁵² and grapevine⁵³. However, not all provided a phylogeny with high branch support for the groupings and the lack of outgroup led the evolutionary history of the protein family ambiguous.

To provide robust phylogenetic information, BBX domain-containing protein sequences from tomato and *A. thaliana* were retrieved from Phytozome database (<https://phytozome.jgi.doe.gov>) (Supplementary Table S1). This survey led to the identification of two additional loci encoding BBX proteins in the tomato genome, that were named *SIBBX30* and *SIBBX31*, following the previously nomenclature published for this species³⁶. *A. thaliana* sequences were named according to the nomenclature adopted by³ (Supplementary Table S1).

The phylogenetic reconstruction (Fig. 1a) grouped the sequences according to their domain structure as previously reported in *A. thaliana*⁴, confirming the monophyletic nature of the five structure groups. Regarding the tree topology, structure group IV appeared isolated from the other four groups, while groups II and V clustered together. Interestingly, AtBBX26 and AtBBX27 were previously classified in the structure group V⁴, while SIBBX27 was found clustered with group III proteins³⁶; the three were described as a single B-box domain containing protein. Here, it was found that these three proteins contain indeed two BBX domains and grouped together as a subclade of structure group II without CCT domain, being referred as structure group VI (Fig. 1a). When the structure group VI sequences (i.e. AtBBX26, AtBBX27 and SIBBX27) and three representative sequences of structure group II (i.e. AtBBX10, AtBBX11 and AtBBX12) were aligned, the CCT motif could be clearly identified in the latter and some conserved residues could also be found in structure group VI sequences (Fig. 1b). Thus, this result indicates that the structure group VI diverged from structure group II sequences that lost the CCT motif.

The above described topology is in agreement with the one obtained for grapevine⁵³, but is not with two other well supported phylogenies^{5,54}. The approach applied here differed from the previously reported in two methodological aspects: human (*H. sapiens*) B-box domain-containing proteins were obtained from NCBI refseq database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>) (Supplementary Table S1) and used as an outgroup in the analysis; and the structure-based multiple sequence alignment whose accuracy surpass sequence-based only packages was applied⁴¹.

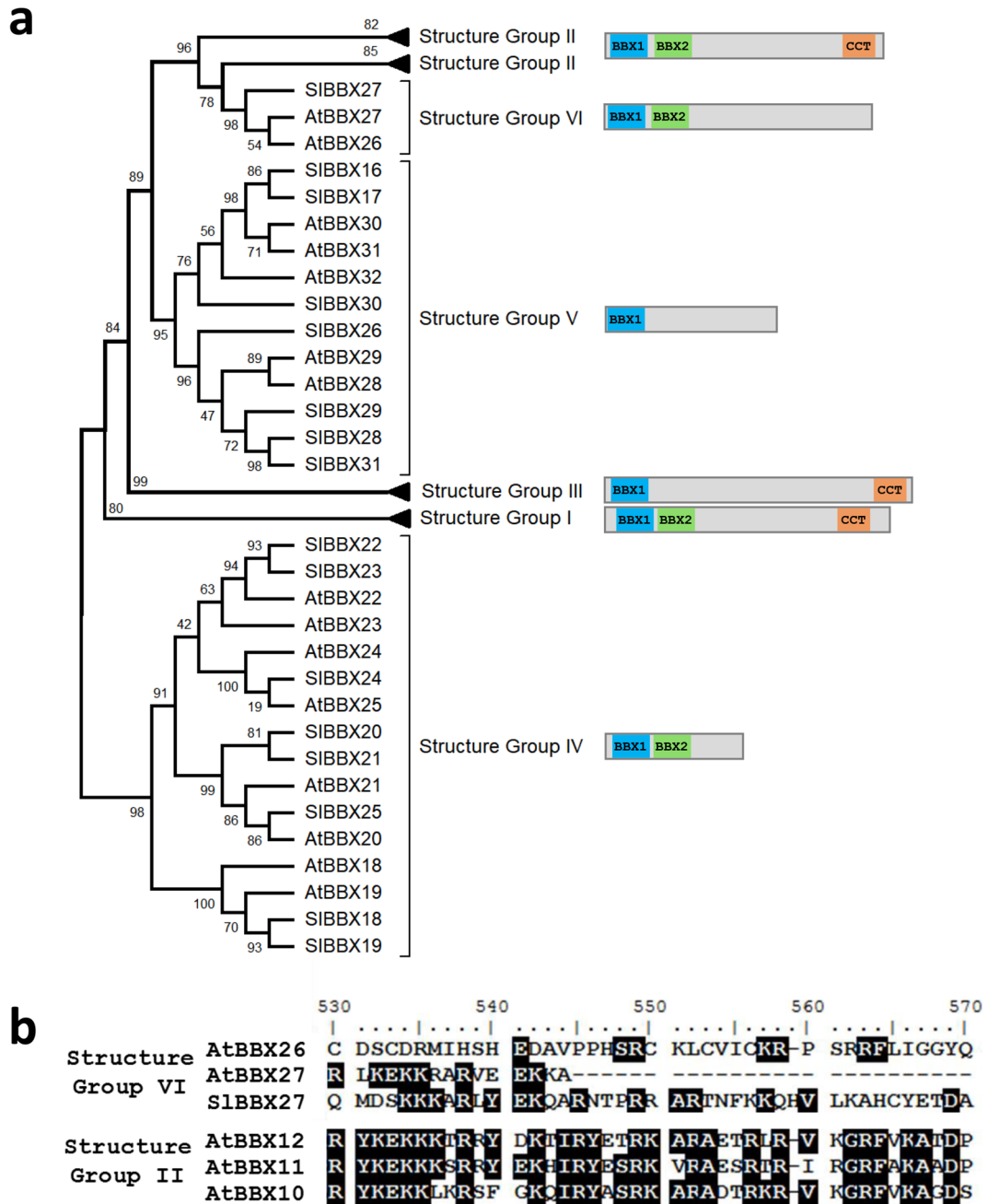


Figure 1. Phylogenetic presentation of *A. thaliana* and tomato BBX proteins. (a) Phylogenetic reconstruction obtained from the alignment of *A. thaliana* and tomato BBX proteins. The clusters were named accordingly to the structure groups described for *A. thaliana* and the domain architecture of each clade was determined using the consensus sequence. (b) A highlight of CCT motif alignment of structure group II representatives and the corresponding region of structure group VI sequences. Shading threshold = 60%.

Thus, to further confirm the obtained topology and bring information about the evolutionary history of this protein family, another phylogenetic analysis was performed including sequences from Chlorophyta species (Supplementary Table S1). The same above described topology for only tomato and *A. thaliana* was obtained. As the structure group VI was identified as a subclade of group II, group VI was collapsed with group II sequences to simplify the visualization (Fig. 2a). Moreover, two Chlorophyta clusters were observed, one grouping with the structure group IV and other with the clade composed of structure groups I/II/III/V. This indicated that the Viridiplantae ancestral, as means before the divergence of Chlorophyta and land plants, had two BBX-coding genes, one of which was subjected to three duplication events along land plants evolution.

The consensus sequence for the B-box and CCT domains was identified for each group (Fig. 2b). The CCT domain appear to have one single origin in the ancestral sequence of the structure groups I/II/III/V, before the divergence of Chlorophyta and land plants. It is not clear whether the ancestral proteins had one or two BBX

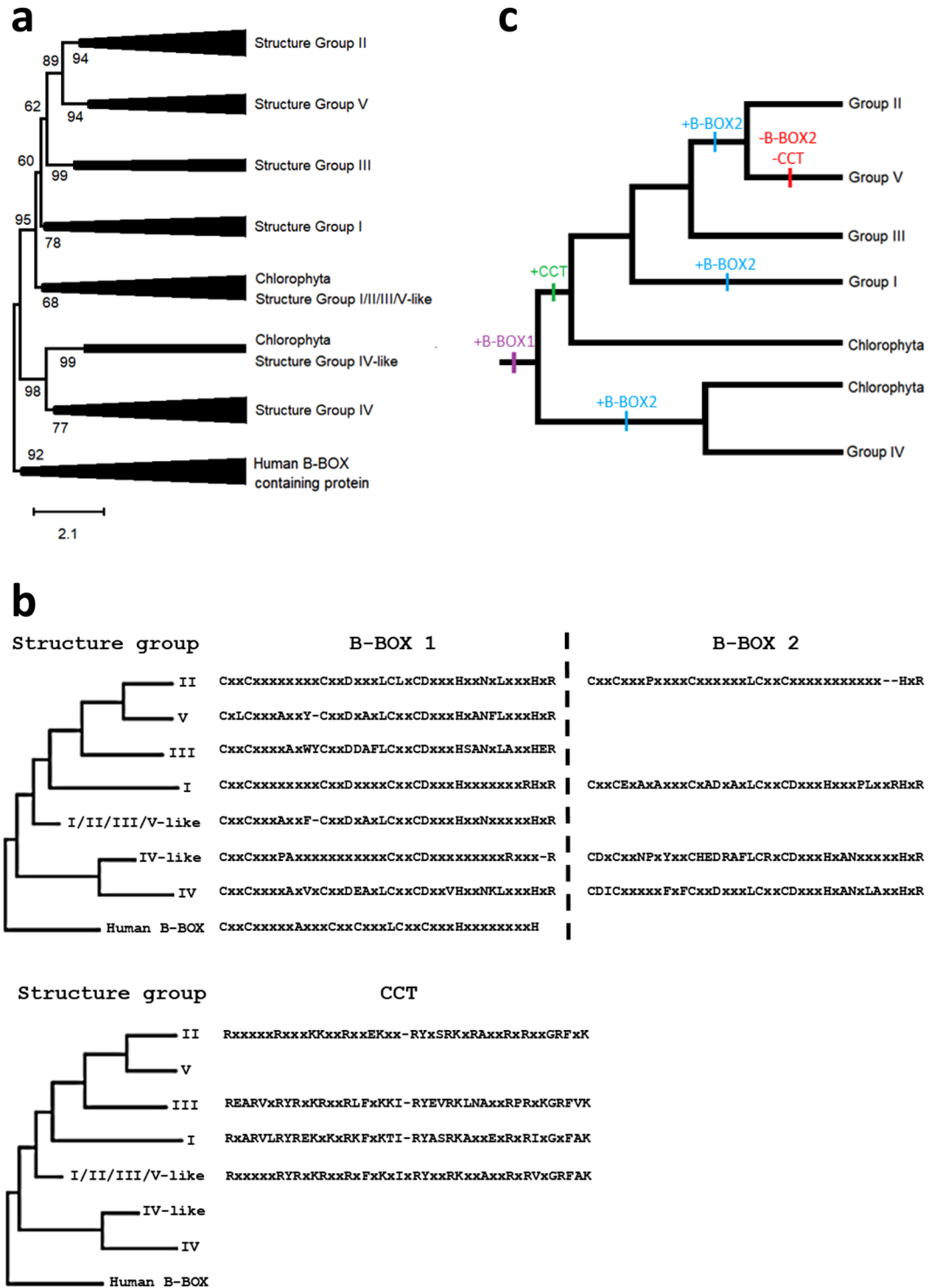


Figure 2. Evolution of BBX proteins. (a) Phylogenetic reconstruction obtained from the alignment of *A. thaliana*, tomato, chlorophyta and human B-box domain containing proteins. The clusters were named accordingly to the structure groups described for *A. thaliana*. The sequences information is available in Supplementary Table S1. (b) Consensus sequence for B-box and CCT domains (identity $\geq 60\%$). (c) Proposed hypothesis for domain evolution in the BBX protein family. While the B-box1 and CCT domains appear to have single origins along the evolution of these proteins, the B-box2 domain evolved independently three times.

domains. Based on the domain consensus, B-box1 seems to have a single origin, while B-box2 may have arisen several times independently, i.e. in the ancestral of the structure group IV clade, in structure group I group and

in the ancestral of the structure groups II/V. Regarding the latter, the alignment of the sequences of both groups revealed that some B-box2 domain conserved residues could be still identified in structure group V members, however none could be identified in structure group III (Supplementary Fig. S1). Thus, this indicates that B-box2 appeared in the ancestral of structure group II and V after the divergence from group III. The occurrence of only B-box1 domain in structure group V is the consequence of the divergence of B-box2 and a deletion in the ancestral sequence that resulted in the loss of the CCT domain.

Concluding, these results bring evidences that the ancestral Viridiplanteae harboured two B-box containing proteins; the ancestral of group IV with two B-box domains and the ancestral of group I/II/III/V-like clade with a single B-box domain. This later, after the divergence of land plants and Chlorophyta, diverged into four structure groups in which B-box2 domain arose two times independently (Fig. 2c).

The expression pattern of groups IV and V *SIBBX* genes is influenced by the stage of plastid development in both vegetative and fruit tissues. To gain insight into the link between BBX proteins and light signalling in tomato, we explored the transcription pattern of *SIBBX* genes that belong to the structure groups IV and V in organs bearing chloroplast at distinct light-regulated developmental stages, such as source and sink leaves, etiolated and de-etiolated seedlings and, fruits from immature to ripe stages^{29,34,40}.

As shown in Fig. 3a, *SIBBX* genes were significantly more expressed in source leaves than in sink counterparts, excepting *SIBBX25* and *SIBBX30* whose mRNA remained invariable. *SIBBX20* was the gene that showed the most expressive induction, approximately six times (Supplementary Table S3).

Transcript abundance of these *SIBBX* genes was also analysed under etiolation (skotomorphogenesis) and de-etiolation (photomorphogenesis) conditions in hypocotyls and cotyledons (Fig. 3b, Supplementary Table S3). Interestingly, most of the *SIBBX* genes showed higher levels of mRNA in cotyledons compared to hypocotyls, both in dark-grown (*SIBBX18*, *SIBBX19*, *SIBBX20*, *SIBBX22*, *SIBBX23*, *SIBBX24*, *SIBBX25*, *SIBBX26*, *SIBBX28* and *SIBBX30*) and light-grown (*SIBBX18*, *SIBBX21*, *SIBBX23*, *SIBBX24*, *SIBBX25*, *SIBBX26*, *SIBBX28* and *SIBBX29*) seedlings. Light exposure upregulated five (*SIBBX18*, *SIBBX24*, *SIBBX17*, *SIBBX28* and *SIBBX30*) and eight (*SIBBX18*, *SIBBX21*, *SIBBX16*, *SIBBX17*, *SIBBX26*, *SIBBX28*, *SIBBX29* and *SIBBX31*) genes in hypocotyls and cotyledons, respectively.

Finally, the transcript pattern of *SIBBX*s belonging to structure groups IV and V was profiled throughout fruit development and ripening. Since there is a chloroplast development gradient along the longitudinal axis in wild type (WT) tomato fruits⁵⁵, they were sectioned in pedicellar (with more and more developed chloroplasts) and stylar (with less and poorly developed chloroplasts) portions. As the profiles from both sections were mostly similar (Supplementary Fig. S2), we focused the analysis on the pedicellar portion (Fig. 3c, Supplementary Table S4). Most *SIBBX* genes exhibited substantial variations in the mRNA accumulation within the analysed stages. Interestingly, six genes showed clear association with either early development or ripening of fruits: *SIBBX19* (Solyc01g110370), *SIBBX20* (Solyc12g089240) and *SIBBX26* (Solyc10g006750) were strongly upregulated upon ripening triggering, as means from MG to Br stage; while, the amount of *SIBBX16* (Solyc12g005750), *SIBBX28* (Solyc12g005660) and *SIBBX29* (Solyc02g079430) mRNA was higher at green stages of fruit development gradually declining afterwards. The most expressive fold changes were observed for *SIBBX20* and *SIBBX16*, which were eight times more and ten times less expressed from IG3 towards fully ripe Br5 fruits, respectively.

The comparison of the relative mRNA accumulation levels of groups IV and V *SIBBX* genes among all the four organs analysed displayed no evident organ or structural specificity; however, except for *SIBBX20* and *SIBBX22*, they showed the highest expression either in source leaves or cotyledons (Supplementary Fig. S3). To sum up, the results showed that the plastid type and developmental stage (i.e. proplastid, chloroplast or chromoplast) seem to affect the transcript accumulation pattern of these 15 *SIBBX* genes in leaves, hypocotyls, cotyledons and fruits.

***SIBBX* genes associated with fruit early development or ripening are regulated by SIPHY and/or SIGLK2.**

The identification of *SIBBX*s whose transcript profile is associate with fruit development and the importance of plastidial metabolism for determining nutraceutical content of tomato fruit, led to the investigation whether SIGLK2, a transcription factor essential for fruit chloroplast differentiation and activity maintenance^{33,55}, and PHY-mediated light perception²⁹ participate in the transcriptional regulation of the six above highlighted *SIBBX* genes (i.e. *SIBBX16*, *SIBBX19*, *SIBBX20*, *SIBBX26*, *SIBBX28* and *SIBBX29*). The hypothesis that SIGLK2- and/or PHYs regulate these genes was reinforced by the finding, in their promoter regions, of at least one HY5 (key inductor of PHY-mediated photomorphogenesis^{56,57}), PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIF; key repressor of PHY-mediated photomorphogenesis⁵⁸), or GLK binding motifs⁵⁹ (Supplementary Fig. S4). *Slglk2* mutant, which encodes a truncated and inactive version of the protein⁵⁵, and two fruit-specific *SIPHY*-silenced transgenic genotypes were used for the mRNA profiling. Out of the five tomato PHYs⁶⁰, fruit-specific functional characterization highlighted two as major contributors to fruit physiology: *SIPHYA*, a positive regulator of tomato plastid division machinery; *SIPHYB2*, a negative regulator of chlorophyll accumulation³⁰ and; both, inductors of fruit carotenogenesis.

Among the *SIBBX* genes downregulated during fruit development, *SIBBX28*, regardless punctual fluctuations, did not show clear pattern of *SIPHY*- and *SIGLK2*-dependent regulation (Fig. 4). In the case of *SIBBX29*, while the lack of *SIGLK2* led to a reduced transcript amount at IG3; *SIPHY*s have opposite effects at MG stage. Yet, *SIBBX16* regulation appears to be more complex, at the peak of expression (i.e. IG3 stage) *SIPHYA*- and *SIPHYB2*-deficiency enhanced mRNA accumulation level. On the contrary, *SIGLK2* seemed to have an inductive effect at green stages of fruit development (Fig. 4, Supplementary Table S5). The biological significance of the transcript level differences in the tested genotypes from Br to Br5 is questionable due to the extremely low amount of mRNA detected in ripening stages of WT genotype (i.e. the mRNA level of *SIBBX16* at Br stage is only 3% of the IG3 value, Supplementary Table S4).

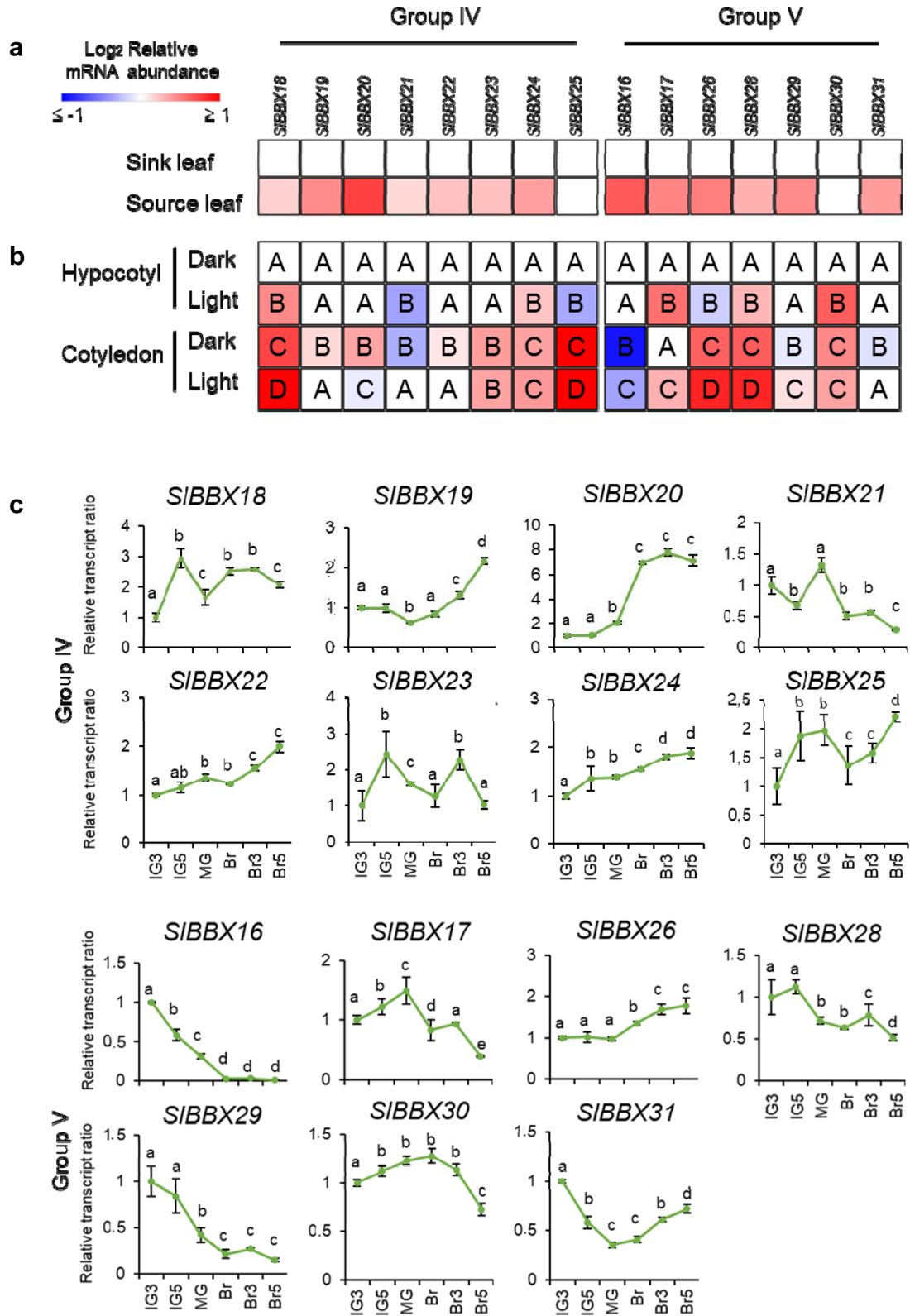


Figure 3. Transcript profile of structure group IV and V *SIBBX* genes. (a) Heatmap representation of the relative transcript ratio of *SIBBX*s in sink and source leaves from the 8th and the 4th phytomers of 40-day-old plants, respectively. Values are means of at least three biological replicates. Colored squares represent statistically significant differences in relation to the sink leaf sample ($P < 0.05$). Relative transcript values are detailed in Supplementary Table S3. (b) Heatmap representation of the relative transcript ratio of *SIBBX*s in etiolated and de-etiolated hypocotyls and cotyledons. Values are means of at least three biological replicates. Different letters represent statistically significant differences among the samples within each gene ($P < 0.05$). Relative transcript values are detailed in Supplementary Table S3. (c) Relative transcript ratio of *SIBBX*s in the pedicellar (top) portion throughout fruit development and ripening. Data were normalised against the IG3 sample. Values are means \pm SE of at least three biological replicates. Different letters indicate statistically significant differences between fruit stages ($P < 0.05$). IG3: immature green 3; IG5: immature green 5; MG: mature green; Br: breaker; Br3: 3 days after Br; Br5: 5 days after Br.

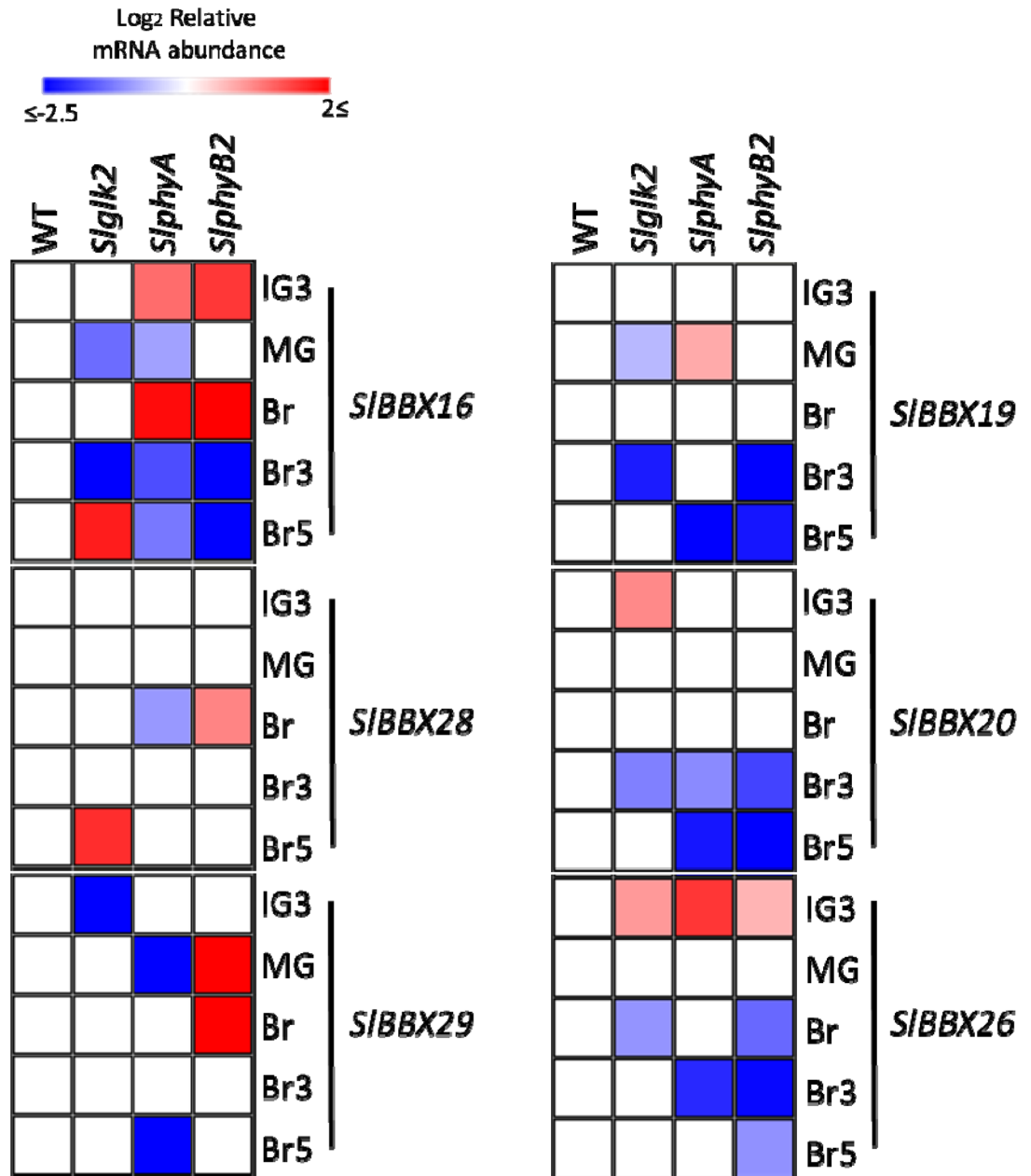


Figure 4. Transcriptional profile of *SIBBXs* in developing fruits of tomato lines impaired in light perception or chloroplast differentiation. The relative mRNA abundance of the six *SIBBXs* modulated by ripening was addressed in fruits of wild type plants (WT), *SIGLK2*-deficient mutant (*Slgk2*, Lupi et al. 2019), and fruit-specific *SIPHYA*- and *SIPHYB2*-silenced (*SlphyA* and *SlphyB2*) lines³⁰. Values were normalised against the respective WT sample and are means of at least three biological replicates. The relative transcript values are detailed in Supplemental Table S5. Statistically significant differences relative to WT samples are colored ($P < 0.05$). IG: immature green 3; MG: mature green; Br: breaker; Br3: 3 days after Br; Br5: 5 days after Br.

The ripening induction observed in *SIBBX19*, *SIBBX20* and *SIBBX26* was attenuated in *SIPHYA*- and *SIPHYB2*-silenced fruits as well as in the *SIGLK2*-deficient genotype. This is clearly shown by the downregulation of their expression from Br towards Br5, suggesting that *SIGLK2*- and *SIPHY*-mediated signalling cascade stimulate the expression of these genes.

RIPENING INHIBITOR (SIRIN) regulates ripening-dependent expression of *SIBBXs*. SIRIN is a master TF controlling tomato fruit ripening⁶¹ whose binding motif C(CT)(AT)₆(AG)G was identified after a genome wide ChIP-Seq experiment^{62,63}. On the promoter region (3000 bp upstream the transcription initiation site) of the three ripening-induced *SIBBX* genes (i.e. *SIBBX19*, *SIBBX20* and *SIBBX26*), putative RIN binding motifs were identified (Fig. 5a). To address whether SIRIN directly interacts with the promoter of the aforementioned genes, a 35S::SIRIN-GFP construct was transiently expressed in WT mature green tomato fruits followed

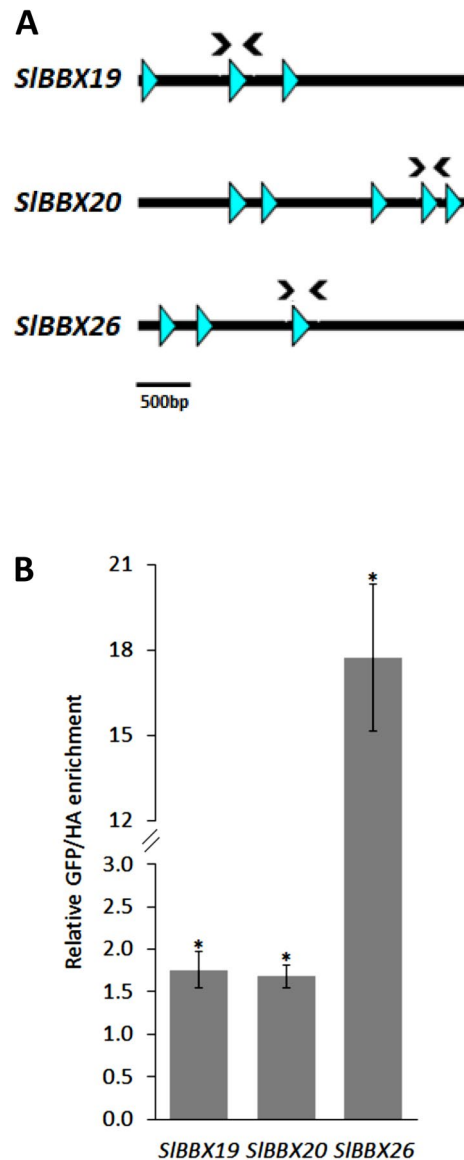


Figure 5. SIRIN binds to the ripening-induced *SIBBXs* promoter. **(A)** SIRIN binding motifs (C(CT)(AT)6(AG)G) blue triangles) in the promoter region (3000 bp upstream of the +1 base) of the three ripening-induced *SIBBX* genes. Arrows indicate the positions of the primers used for ChIP-qPCR assay. **(B)** ChIP-qPCR experiment performed in tomato fruits transiently expressing 35S::SIRIN-GFP using anti-GFP and anti-HA (as negative control) antibodies. Asterisks denote statistically significant differences ($P < 0.05$) to the respective anti-HA sample.

by a ChIP-qPCR assay with anti-GFP or negative control anti-HA antibodies. The anti-GFP immunoprecipitated chromatin showed to be enriched for all *SIBBX* promoters tested (Fig. 5b), demonstrating that SIRIN physically binds the regulatory region of *SIBBX19*, *SIBBX20* and *SIBBX26*, explaining the above-mentioned ripening-associated upregulation.

Discussion

Over the past years, BBX protein family was surveyed in several species such as apple⁶⁴, *A. thaliana*⁴, grapevine⁵³, orchids⁶⁵, pear⁵⁴, rice⁵², potato⁵¹, *Arachis duranensis*⁶⁶ and tomato³⁶, being classified in five groups accordingly to the domain composition of the proteins. The comprehensive phylogenetic analysis performed in this work (Fig. 2a) provided evolutionary validation of this classification by revealing that the structure groups corresponded to well sustained monophyletic clusters. A foundational work³ performed a phylogenetic analysis of *A. thaliana* BBX protein family that was further revised by⁵, which proposed a model for BBXs evolutionary trajectory in green plants. Although the phylogeny topology obtained here does not reflect the evolutionary model proposed by⁵, two pieces of evidences showed by the phylogenetic analysis of B-box domains reported by these authors support the clustering observed here: (i) B-box2 domain from groups IV and I are more closely related

than group II B-box2 and; (ii) B-box1 domain from groups II and V are the most closely related. Moreover, some methodological differences might have increased the accuracy of the topology obtained here: i) the incorporation of an outgroup; (ii) the multiple sequence alignment carried out with structure-based information⁴¹ and; (iii) the algorithm used for the multiple sequence alignment is consistency-based, whose accuracy is increased in comparison to matrix-based ones such as ClustalW⁶⁷.

Our analysis showed that some *A. thaliana* and tomato proteins, previously reported as members of the structure group V^{3,4} and II³⁶, respectively, are actually members of a new structure group, VI, which is diverging from group II after the loss of the CCT domain. As also observed for punctual examples belonging to groups II and V⁴, these results suggest that some BBX proteins lost a domain in a recent evolutionary event, but conserve other common characteristics of their structure group.

Concluding, based on phylogenetic and domain structure analyses, we propose that the ancestral Viridiplantae harboured two B-box domain containing proteins that originated structure group IV-like and structure group I/II/III/V-like clades, respectively. Moreover, while B-box1 and CCT domains seem to single origins in the evolutionary history of this protein family, B-box2 arose three time, independently (Fig. 2c).

Functional studies regarding B-box domain encoding genes were performed almost exclusively in *A. thaliana* seedlings and, interestingly, especially members of structure group IV and V, were characterised as components of the light signalling cascade^{13,14,16,18–21,24}. By employing different photoreceptors, plants can track light intensity, quality, periodicity and direction. Among photoreceptors, PHYs are codified by a small gene family, with members playing different roles gathering information for adjusting plant development and metabolism to the changing environment⁶⁸. Once activated by light, PHYs phosphorylate several nuclear proteins controlling their function⁶⁹. Among them, E3 ubiquitin ligase COP1 activity and stability is negatively modulated by PHYs⁷⁰. Free of COP1 repression, the transcription factor HY5 is able to induce and repress the expression of photomorphogenesis- and skotomorphogenesis-related genes, respectively⁵⁷. Several reports have pinpointed the major contribution of the above described light signal transduction pathway for determining tomato fruit yield and nutritional quality^{30–35,71,72}. However, regarding *SIBBX* genes, only the locus Solyc01g110180, here named as *SIBBX25*, has been functionally characterised up to date, being described as a COP1-repressed positive regulator of chloroplast biogenesis, whose constitutive overexpression leads to dwarf plants bearing ripe fruits with increased carotenoid content³⁷. Thus, it remains to be explored in a broader manner the role of BBX proteins in light-regulated physiological processes in tomato.

Here, in structure group IV and V, which encompasses most of the light-regulated BBX proteins described in *A. thaliana*, 15 tomato sequences were identified (Fig. 1). Then, they were transcriptionally profiled in source and sink leaves, seedling de-etiolation, and along fruit development and ripening (Fig. 3). The comparison of the mRNA accumulation level among the different profiled organs revealed that *SIBBX* transcripts accumulate most in source leaves or cotyledons (Supplementary Fig. S3), which is mostly in line with the profile previously reported in tomato³⁶. The vast majority of *SIBBX*s displayed higher amounts of mRNA in source than in sink leaves hinting a correlation with chloroplast number and activity (Fig. 3a). The pattern of mRNA accumulation during seedlings skoto- and photomorphogenesis showed that out of the 15 analysed genes, 8 showed to be induced by light (*SIBBX16*, *SIBBX17*, *SIBBX18*, *SIBBX24*, *SIBBX28*, *SIBBX29*, *SIBBX30* and *SIBBX31*); while only four showed to be light-downregulated (*SIBBX19*, *SIBBX20*, *SIBBX22* and *SIBBX25*) in at least hypocotyl or cotyledon. Two genes showed inversed pattern in response to light in both organs (*SIBBX21* and *SIBBX26*) and one was invariable (*SIBBX23*). These results indicate that tomato BBX genes that belong to structure group IV and V are light responsive, like observed in *A. thaliana*⁴, and most are light-induced. The expression pattern of BBX encoding genes in *Solanum tuberosum* during de-etiolation was also addressed and the expression of most of the genes belonging to structural groups IV and V was modulated upon illumination of etiolated leaves⁵¹. This profile provides further evidences about a link between mRNA levels of BBX proteins from structure groups IV and V and plastid biogenesis and differentiation, revealing that they are affected, to some extent, by the light signalling cascade.

Regarding fruit development and ripening (Fig. 3c), six genes stood out as their transcripts were gradually reduced from green stages towards ripening (*SIBBX16*, *SIBBX28* and *SIBBX29*) or sharply induced upon this process triggering (*SIBBX19*, *SIBBX20* and *SIBBX26*), indicating that their expression is also modulated by the plastid developmental stage, i.e. chloroplast to chromoplast transition. Interestingly, with the exception of *SIBBX19* and *SIBBX26*, the mRNA accumulation profile observed here was in agreement with that reported by³⁶.

Led by the particular pattern found in fruits for *SIBBX16*, *SIBBX19*, *SIBBX20*, *SIBBX26*, *SIBBX28* and *SIBBX29*, together with the occurrence in their promoter regions of binding motifs for TFs involved in the light signalling cascade (i.e. PIE, HY5 and GLK, Supplementary Fig. S4), their transcripts were profiled in genotypes with altered fruit light perception or without proper fruit chloroplast differentiation (Fig. 4). The three *SIBBX* genes downregulated from immature towards ripe stages showed induction by chloroplast maturation and light (Fig. 3a,b) and, except for *SIBBX28* that did not show alterations of its transcript abundance, *SIBBX16* and *SIBBX29* were induced in a SIGLK2- and SIPHY-dependent manner at green stages. SIGLK2, directly and/or indirectly, i.e. inducing chloroplasts biogenesis and maintenance^{33,55}, promoted the mRNA accumulation of *SIBBX16* and *SIBBX29* at green stages of fruit development (Fig. 4). Interestingly, it was shown that SIPHYB2 represses SIGLK2 mRNA accumulation³⁰ thus, explaining the inducible effect of SIPHYB2 deficiency on the expression of these genes at green stages (Fig. 4). Finally, SIPHYA-silenced fruits displayed reduced number of chloroplasts with limited differentiation of its intermembranous structure³⁰, which may be associated with the *SIBBX16* and *SIBBX29* downregulation detected in this genotype at MG stage.

The disruption of PHY-mediated light signalling or chloroplast differentiation by the lack of active SIGLK2 attenuated the ripening-associated transcript accumulation of *SIBBX19*, *SIBBX20* and *SIBBX26*. The minor effects observed in early stages indicate that these genes are rather induced along ripening than repressed during green stages of tomato fruit development. Since the mRNA amount of SIGLK2 is almost undetectable from breaker

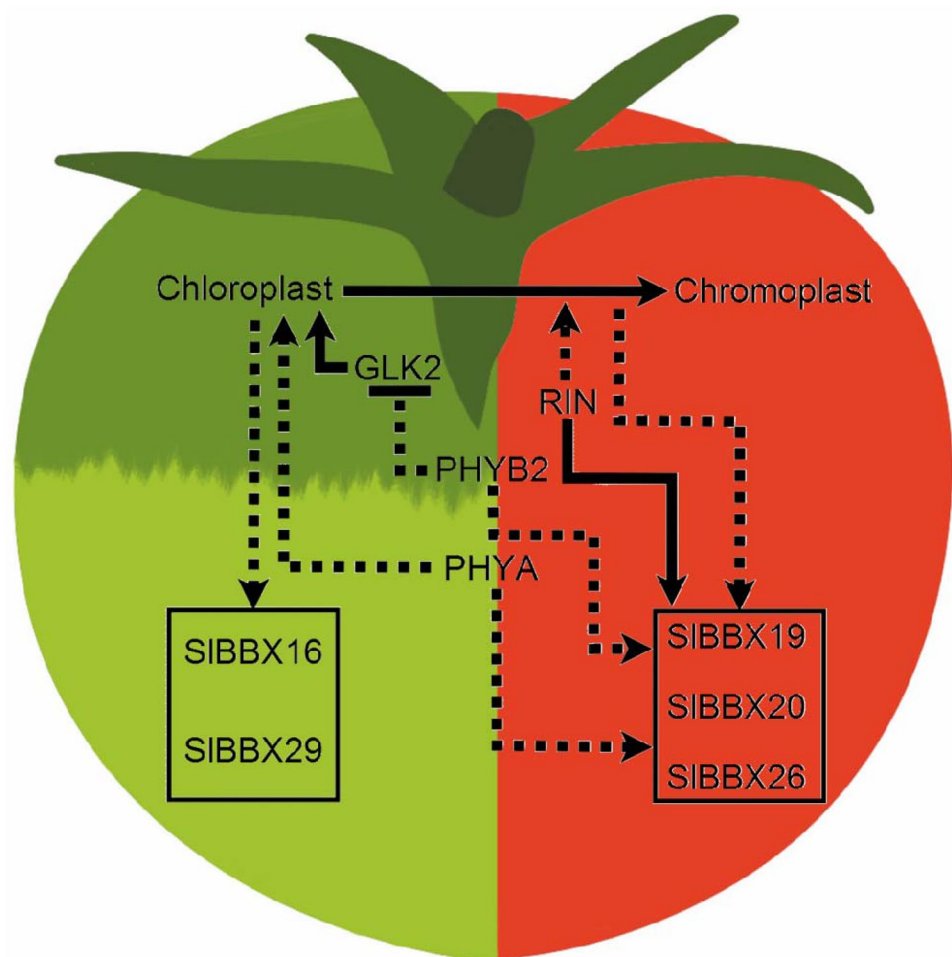


Figure 6. Proposed regulatory network for the control of fruit development- and ripening-associated *SIBBX* genes. During early tomato fruit development, *SlGLK2* induces the expression of several genes leading to chloroplast differentiation. *SIPHY*s have an inverse effect over plastidial development at green stages. While *SIPHYB2* inhibits *SlGLK2* transcript accumulation, *SIPHYA* positively controls chloroplast division regulators³⁰. Chloroplast biogenesis and maturation positively influence *SIBBX16* and *SIBBX29* transcript accumulation. As the fruit matures, the transcript abundance of both these *SIBBX* genes decreases. Once ripening initiates, the conversion of chloroplast to chromoplast begins and *SIRIN* accumulates, activating the expression of several ripening associated genes, including *SIBBX19*, *SIBBX20* and *SIBBX26*. During ripening, these three *SIBBX* genes are also positively regulated by *SIPHY*s, probably, through the repression of several light signalling negative regulators, such as *COP1* and *PIFs*. The absence of properly differentiated chloroplast due to *SlGLK2* deficiency attenuates the upregulation of *SIBBX19*, *SIBBX20* and *SIBBX26* during ripening. Continuous lines indicate direct effect; dotted lines indicate that the effects may not be due to direct interaction. Arrow-ended lines indicate induction; bar-ended lines indicate repression.

towards fully ripe stage^{33,55}, the observed reduction in mRNA level in *Slglk2* mutant for these three genes at ripening stages might be an indirect effect of the fewer and not fully differentiated chloroplasts in this genotype^{33,55}, which are further converted into chromoplasts as ripening proceeds⁷³. In a similar way, *SIPHYA*-silenced fruits also displayed poorly developed chloroplasts in the green stages³⁰ that, as aforementioned, might lead to the observed reduction in the transcription of the three *SIBBX* genes. Interestingly, the observed downregulation of *SIBBX19* in the lack of *PHYA* or *PHYB2* was also reported for its *A. thaliana* ortholog, *AtBBX19*, in *AtphyA* and *AtphyB* mutant seedlings¹². As chlorophyll degrades, the chlorophyll self-shading effect is reduced allowing the pass of sunlight through the flesh of green fruit. Light shifts the photoequilibrium of *PHY*s to the active form promoting the inactivation of their downstream negative effectors *SIPIFs* and leading to the upregulation of light-dependent ripening associated genes^{31,72}. As *PIF*-binding motifs were identified in *SIBBX19*, *SIBBX20* and *SIBBX26* promoters (Supplementary Fig. S4), these TFs that are altered in *SlphyA* and *SlphyB2*³⁰ might downregulate the accumulation of these *BBX* transcripts in the *PHY* deficient lines.

Moreover, the ripening-associated mRNA accumulation of *SIBBX19*, *SIBBX20* and *SIBBX26* raised the hypothesis of the involvement of the master regulator of tomato fruit ripening *SIRIN*⁶¹ in the regulation of these genes. Indeed, in the promoter region of all three genes, *RIN*-binding motifs were found (Fig. 5a) and, by ChIP-qPCR, the direct binding of *SIRIN* was confirmed (Fig. 5b). This is in line with the previously reported ChIP-Seq results

that showed the direct interaction between *SIRIN* and *SIBBX20* promoter⁶³, and also with the reduced mRNA amount of this gene in *SIRIN*-silenced fruits⁷⁴. Altogether, these results indicate that *SIBBX19*, *SIBBX20* and *SIBBX26* are light- and *SIRIN*-regulated, playing a role in tomato fruit ripening.

Collectively, data obtained here provided a robust phylogenetic analysis of BBX proteins, giving a new perspective of the events that led to the diversification of these proteins in six structure groups. A comprehensive transcriptional profile of 15 *SIBBX*s revealed a correlation of mRNA amounts with the state of chloroplast development, as well as their regulation by the light signalling cascade. Additionally, a more detailed profiling in fruits led to the identification of three putative *SIRIN*-regulated ripening-associated *SIBBX* genes and other three loci associated with the early fruit development (Fig. 6). These results give insights on putative roles of *SIBBX* proteins in other light-regulated physiological process aside seedling photomorphogenesis and allow the identification of putative candidates for further characterization that may affect tomato fruit development and/or ripening.

Received: 5 June 2020; Accepted: 20 October 2020

Published online: 06 November 2020

References

- Riechmann, J. L. *et al.* Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290**, 2105–2110 (2000).
- Kielbowicz-Matuk, A. Involvement of plant C2H2-type zinc finger transcription factors in stress responses. *Plant Sci.* **185–186**, 78–85 (2012).
- Khanna, R. *et al.* The Arabidopsis B-box zinc finger family. *Plant Cell* **21**, 3416–3420 (2009).
- Gangappa, S. N. & Botto, J. F. The BBX family of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* **19**, 460–470 (2014).
- Crocco, C. D. & Botto, J. F. BBX proteins in green plants: insights into their evolution, structure, feature and functional diversification. *Gene* **531**, 44–52 (2013).
- Lin, F. *et al.* B-BOX DOMAIN PROTEIN28 negatively regulates photomorphogenesis by repressing the activity of transcription factor HY5 and undergoes COP1-mediated degradation. *Plant Cell* **30**, 2006–2019 (2018).
- Heng, Y. *et al.* B-box containing proteins BBX30 and BBX31, acting downstream of HY5, Negatively regulate photomorphogenesis in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **180**, 497–508 (2019).
- Luo, X. *et al.* The NUCLEAR FACTOR-CONSTANS complex antagonizes Polycomb repression to de-repress FLOWERING LOCUS T expression in response to inductive long days in Arabidopsis. *Plant J.* **95**, 17–29 (2018).
- Crocco, C. D., Holm, M., Yanovsky, M. J. & Botto, J. F. AtBBX21 and COP1 genetically interact in the regulation of shade avoidance. *Plant J* **64**, 551–562 (2010).
- Min, J. H., Chung, J. S., Lee, K. H. & Kim, C. S. The CONSTANS-like 4 transcription factor, AtCOL4, positively regulates abiotic stress tolerance through an abscisic acid-dependent manner in Arabidopsis. *J. Integr. Plant Biol.* **57**, 313–324 (2015).
- Graeff, M. *et al.* Microprotein-mediated recruitment of CONSTANS into a TOPLESS trimeric complex represses flowering in Arabidopsis. *PLoS Genet.* <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005959> (2016).
- Zhang, X. & Lin, R. Light signalling differentially regulates the expression of group IV of the B-box zinc finger family. *Plant Signal. Behav.* **12**, 21–24 (2017).
- Fan, X. Y. *et al.* BZS1, a B-box protein, promotes photomorphogenesis downstream of both brassinosteroid and light signalling pathways. *Mol. Plant* **5**, 591–600 (2012).
- Xu, D. *et al.* BBX21, an Arabidopsis B-box protein, directly activates HY5 and is targeted by COP1 for 26S proteasome-mediated degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, 7655–7660 (2016).
- Chang, C. J., Maloof, J. N. & Wu, S.-H. COP1-mediated degradation of BBX22/LZF1 optimizes seedling development in Arabidopsis. *PlantPhysiol.* **156**, 228–239 (2011).
- Zhang, X. *et al.* A PIF1/PIF3-HY5-BBX23 transcription factor cascade affects photomorphogenesis. *Plant Physiol.* **174**, 2487–2500 (2017).
- Ding, L. *et al.* Two B-box domain proteins, BBX18 and BBX23, interact with ELF3 and regulate thermomorphogenesis in Arabidopsis. *Cell Rep.* **25**, 1718–1728 (2018).
- Wang, C. Q., Sarmast, M. K., Jiang, J. & Dehesh, K. The transcriptional regulator BBX19 promotes hypocotyl growth by facilitating COP1-mediated EARLY FLOWERING3 degradation in Arabidopsis. *Plant Cell* **27**, 1128–1139 (2015).
- Jiang, L. *et al.* Arabidopsis STO/BBX24 negatively regulates UV-B signalling by interacting with COP1 and repressing HY5 transcriptional activity. *Cell Res.* **22**, 1046–1057 (2012).
- Gangappa, S. N. *et al.* The Arabidopsis B-box protein BBX25 interacts with HY5, negatively regulating BBX22 expression to suppress seedling photomorphogenesis. *Plant Cell* **25**, 1243–1257 (2013).
- Kumagai, T. *et al.* The common function of a novel subfamily of B-Box zinc finger proteins with reference to circadian-associated events in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **72**, 1539–1549 (2008).
- Holtan, H. E. *et al.* BBX32, an Arabidopsis B-box protein, functions in light signalling by suppressing HY5-regulated gene expression and interacting with STH2/BBX21. *Plant Physiol.* **156**, 2109–2123 (2011).
- Song, Z., Bian, Y., Liu, J., Sun, Y. & Xu, D. B-box proteins: pivotal players in light-mediated development in plants. *J. Integr. Plant Biol.* <https://doi.org/10.1111/jipb.12935> (2020).
- Chang, C. J., Maloof, J. N. & Wu, S.-H. COP1-mediated degradation of BBX22/LZF1 optimizes seedling development in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **156**, 228–239 (2011).
- Datta, S., Hettiarachchi, C., Johansson, H. & Holm, M. SALT TOLERANCEHOMOLOG2, a B-Box protein in Arabidopsis that activates transcription and positively regulates light-mediated development. *Plant Cell* **19**, 3242–3255 (2007).
- Gangappa, S. N., Holm, M. & Botto, J. F. Molecular interactions of BBX24 and BBX25 with HYH, HY5 HOMOLOG, to modulate Arabidopsis seedling development. *Plant. Signal. Behav.* **8**, 37–41 (2013).
- Rossi, M., Bermudez, L. & Carrari, F. Crop yield: challenges from a metabolic perspective. *Curr. Opin. Plant Biol.* **25**, 79–89 (2015).
- Liu, Y. *et al.* Manipulation of light signal transduction as a means of modifying fruit nutritional quality in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **26**, 9897–9902 (2004).
- Bianchetti, R. E. *et al.* Phytochromobilin deficiency impairs sugar metabolism through the regulation of cytokinin and auxin signalling in tomato fruits. *Sci. Rep.* **7**, 7822 (2017).
- Bianchetti, R. E. *et al.* Fruit-localized phytochromes regulate plastid biogenesis, starch synthesis, and carotenoid metabolism in tomato. *J. Exp. Bot.* **69**, 3573–3586 (2018).
- Llorente, B. *et al.* Tomato fruit carotenoid biosynthesis is adjusted to actual ripening progression by a light-dependent mechanism. *Plant J.* **85**, 107–119 (2016).

32. Cruz, A. B. *et al.* Light, ethylene and auxin signalling interaction regulates carotenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. *Front. Plant Sci.* **9**, 1370 (2018).
33. Lupi, A. C. D. *et al.* *Solanum lycopersicum* GOLDEN 2-LIKE 2 transcription factor affects fruit quality in a light- and auxin-dependent manner. *PLoS ONE* **14**, 1–22 (2019).
34. Rosado, D. *et al.* Downregulation of PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4 influences plant development and fruit production. *Plant Physiol.* **181**, 1360–1370 (2019).
35. Alves, F. R. R. *et al.* Beyond the limits of photoperception: constitutively active PHYTOCHROME B2 overexpression as a means of improving fruit nutritional quality in tomato. *Plant Biotechnol. J.* <https://doi.org/10.1111/pbi.13362> (2020).
36. Chu, Z. *et al.* Genomic organization, phylogenetic and expression analysis of the B-BOX gene family in tomato. *Front. Plant Sci.* **7**, 1552 (2016).
37. Xiong, C. *et al.* A tomato B-box protein SLBBX20 modulates carotenoid biosynthesis by directly activating PHYTOENE SYNTHASE 1, and is targeted for 26S proteasome-mediated degradation. *New Phytol.* **221**, 279–294 (2018).
38. Carvalho, R. F. *et al.* Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: ‘Micro-Tom’ as an effective toolkit for plant development research. *Plant Methods* **7**, 18 (2011).
39. Campos, M. L., Carvalho, R. F., Benedito, V. A. & Peres, L. E. P. The Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions. *Plant Signal. Behav.* **5**, 267–270 (2010).
40. Melo, N. K. G. *et al.* Nitric oxide, ethylene, and auxin cross talk mediates greening and plastid development in deetioliating tomato seedlings. *Plant Physiol.* **170**, 2278–2294 (2016).
41. Armougom, F. *et al.* Espresso: automatic incorporation of structure information in multiple sequence alignments using 3D-Coffee. *Nucleic Acids Res.* **34**, 604–608 (2006).
42. Lira, B. S. *et al.* Manipulation of a senescence-associated gene improves fleshy fruit yield. *Plant Physiol.* **175**, 77–91 (2017).
43. Quadrana, L. *et al.* Transcriptional regulation of tocopherol biosynthesis in tomato. *Plant Mol. Biol.* **81**, 309–325 (2013).
44. Ruijter, J. M., van der Velden, S. & IJgun, A. *LinReg PCR (11.0). Analysis of quantitative, e RT-PCR data [computer program]. Version 11.0* (Heart Failure Research, Center Academic Medical Centre, Amsterdam, 2009).
45. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & Dempfle, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucl. Acids Res.* **30**, e36 (2002).
46. Di Rienzo, J. A. *Statistical Software for the Analysis of Experiments of Functional Genomics*. RDND, Argentina. <https://sites.google.com/site/fgStatistics> (2009).
47. Karimi, M., Inzé, D. & Depicker, A. GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* **7**, 193–195 (2002).
48. Fujisawa, M., Nakano, T. & Ito, Y. Identification of potential target genes for the tomato fruit-ripening regulator RIN by chromatin immunoprecipitation. *BMC Plant Biol.* **11**, 26 (2011).
49. Di Rienzo, J. A. *et al.* *InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.* <https://www.infostat.com.ar> (2011).
50. Chow, C. N. *et al.* PlantPAN 2.0: an update of plant promoter analysis navigator for reconstructing transcriptional regulatory networks in plants. *Nucl. Acids Res.* **44**, D1154–D1160 (2016).
51. Talar, U., Kielbowicz-Matuk, A., Czarnecka, J. & Rorat, T. Genome-wide survey of B-box proteins in potato (*Solanum tuberosum*)—Identification, characterization and expression patterns during diurnal cycle, etiolation and de-etiolation. *PLoS ONE* **12**, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177471> (2017).
52. Huang, J., Zhao, X., Weng, X., Wang, L. & Xie, W. The rice B-box zinc finger gene family: genomic identification, characterization, expression profiling and diurnal analysis. *PLoS ONE* **7**, 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048242> (2012).
53. Wei, H. *et al.* Genome-wide identification and analysis of B-BOX gene family in grapevine reveal its potential functions in berry development. *BMC Plant Biol.* <https://doi.org/10.1186/s12870-020-2239-3> (2020).
54. Cao, Y. P. *et al.* B-BOX genes: genome-wide identification, evolution and their contribution to pollen growth in pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.). *BMC Plant Biol.* **17**, 156 (2017).
55. Powell, A. L. *et al.* Uniform ripening encodes a Golden 2-like transcription factor regulating tomato fruit chloroplast development. *Science* **336**, 1711–1715 (2012).
56. Yadav, V. *et al.* Light regulated modulation of Z-box containing promoters by photoreceptors and downstream regulatory components, COP1 and HY5, in Arabidopsis. *Plant J.* **31**, 741–753 (2002).
57. Lee, J. *et al.* Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development. *Plant Cell* **19**, 731–749 (2007).
58. Zhang, Y. *et al.* A quartet of PIF bHLH factors provides a transcriptionally centered signalling hub that regulates seedling morphogenesis through differential expression-patterning of shared target genes in Arabidopsis. *PLoS Gen.* <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003244> (2013).
59. Waters, M. T. *et al.* GLK transcription factors coordinate expression of the photosynthetic apparatus in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**, 1109–1128 (2009).
60. Alba, R., Kelmenson, P. M., Cordonnier-Pratt, M. M. & Pratt, L. H. The phytochrome gene family in tomato and the rapid differential evolution of this family in angiosperms. *Mol. Biol. Evol.* **17**, 362–373 (2000).
61. Vrebalov, J. *et al.* A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (rin) locus. *Science* **296**, 343–346 (2002).
62. Ito, Y. *et al.* DNA-binding specificity, transcriptional activation potential, and the rin mutation effect for the tomato fruit-ripening regulator RIN. *Plant J.* **55**, 212–223 (2008).
63. Fujisawa, M., Nakano, T., Shima, Y. & Ito, Y. A large-scale identification of direct targets of the tomato MADS box transcription factor RIPENING INHIBITOR reveals the regulation of fruit ripening. *Plant Cell* **25**, 371–386 (2013).
64. Liu, X., Li, R., Dai, Y. Q., Chen, X. S. & Wang, X. Y. Genome-wide identification and expression analysis of the B-box gene family in the apple (*Malus domestica* Borkh.) genome. *Mol. Gen. Genom.* **293**, 303–315 (2018).
65. Cao, Y. *et al.* Comparative analysis of B-BOX genes and their expression pattern analysis under various treatments in *Dendrobium officinale*. *BMC Plant Biol.* **19**, 245 (2019).
66. Jin, H., Xing, M., Cai, C. & Li, S. B-box proteins in *Arachis duranensis*: genome-wide characterization and expression profiles analysis. *Agronomy* **10**, 23 (2020).
67. Notredame, C. Recent evolutions of multiple sequence alignment algorithms. *PLoS Comput. Biol.* **3**, e123 (2007).
68. Llorente, B., Martínez-García, J. F., Stange, C. & Rodríguez-Concepción, M. Illuminating colors: regulation of carotenoid biosynthesis and accumulation by light. *Curr. Opin. Plant Biol.* **37**, 49–55 (2017).
69. Li, J., Li, G., Wang, H. & Deng, X. W. Phytochrome signalling mechanisms. *Am. Soc. Plant Biol.* **9**, e0198 (2011).
70. Lau, O. S. & Deng, X. W. The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later. *Trends Plant Sci.* **17**, 584–593 (2012).
71. Azari, R. *et al.* Light signalling genes and their manipulation towards modulation of phytonutrient content in tomato fruits. *Biotechnol. Adv.* **28**, 108–118 (2010).
72. Gramegna, G. *et al.* Phytochrome-Interacting Factor 3 mediates light-dependent induction of tocopherol biosynthesis during tomato fruit ripening. *Plant Cell Environ.* **42**, 1328–1339 (2019).
73. Egea, I. *et al.* Chloroplast to chromoplast transition in tomato fruit: spectral confocal microscopy analyses of carotenoids and chlorophylls in isolated plastids and time-lapse recording on intact live tissue. *Ann. Bot. Lond.* **108**, 291–297 (2011).

74. Li, S. *et al.* The RIN-MC fusion of MADS-box transcription factors has transcriptional activity and modulates expression of many ripening genes. *Plant Physiol.* **176**, 891–909 (2018).

Author contributions

B.S.L. designed and performed most of the experiments, analysed the data and wrote the article with contributions of all the authors; M.J.O., L.S., R.T.A.W., A.C.D.L. and D.R. performed the experiments. L.F. designed the experiments, contributed to data analysis and complemented the writing; M.R. designed the experiments, contributed to data analysis and wrote the article with contributions of all the authors.

Funding

B.S.L. and D.R. were recipients of FAPESP fellowships (2017/14953-0, 2015/14658-3). M.R., L.F., M.J.O. and L.S. were funded by a fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). A.C.D.L. was recipient of CAPES fellowship. This work was partially supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) 2016/01128-9 (Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Finance Code 001 (Brazil) and Universidade de São Paulo, Brazil.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76131-0>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.R.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

7. ANEXO 2

Iniciadores utilizados

NOME	SEQUÊNCIA	LOCUS
Construção dos vetores e genotipagem		
SIEXPRESSED	F- TGGGTGTGCCTTTCTGAATG	Solyc07g025390
	R- GCTAAGAACGCTGGACCTAATG	
M13	F- GTAAAACGACGGCCAG	
	R- GGAAACAGCTATGAC	
NPTII	F- GAACAAGATGGATTGCACGC	
	R- GAAGAACTCGTCAAGAAGGC	
35S-Promotor	CCCACTATCCTTCGCAAG	
35S-Terminador	CCAAAATCCAGTGACCTGCA	
SIBBX28-RNAi	F- GGAGGAAATTGATTTGGAAGATATTCAAG	Solyc12g005660
	R- GATTCTATCGGGTCGGGTTG	
RT-qPCR		
SITIP41	F- GCTGCGTTTCTGGCTTAGG	Solyc10g049850
	R- ATGGAGTTTTTGTAGTCTTCTGC	
SIEXPRESSED	F- TGGGTGTGCCTTTCTGAATG	Solyc07g025390
	R- GCTAAGAACGCTGGACCTAATG	
SIBBX28-RT-qPCR	F- GACAGAGAAGAGGAAGAGAAGG	Solyc12g005660
	R- CCACCGTCGCTGAACATC	
SIYUC8A	F- ACATCTTCCACCCTCTCTTTACT	Solyc06g008050
	R- TGAAAGCAGAACACGGGC	
SIYUC8C	F- TTGCTACTGGGGAGAATGCC	Solyc09g064160
	R- ACCAACGACCACCCTTTCT	
SISFT	F- GTTGTGGTTCGTGTGGTAG	Solyc03g063100
	R- ACTTCAACCCTTGGCTGGTT	
SIBBX29	F- GGTCCCACTGTTTCTGTTTG	Solyc02g079430
	R- CATCATCTTCTTCTTCTCCG	
SIBBX31	F- GTTTGTGTTGGGACTGTGATG	Solyc07g053140
	R- GGTGGAGGCGTCGTATTTGAC	
SIFUL2	F- ATCTCTGTGCTTTCGATGC	Solyc03g114830
	R- GCTCTTTCATACTCAATGTGTC	

F: Senso, R: Ante senso *LOCUS*: ID do gene de acordo com o banco de dados do Sol Genomics Network (<https://solgenomics.net>)