



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

THIAGO ALBERTO ORTIZ

**IDENTIFICAÇÃO E MAPEAMENTO REFINADO DE QTLs
PARA CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DE SEMENTE
DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* × *S. pimpinellifolium*)**

Londrina
2017

THIAGO ALBERTO ORTIZ

**IDENTIFICAÇÃO E MAPEAMENTO REFINADO DE QTLs
PARA CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DE SEMENTE
DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* × *S. pimpinellifolium*)**

Tese apresentada ao Departamento de
Agronomia da Universidade Estadual de
Londrina.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Lúcia Sadayo Assari
Takahashi

Co-orientador: Prof. Dr. Wilco Ligterink

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Ortiz, Thiago Alberto.

Identificação e mapeamento refinado de QTLs para característica de qualidade de semente de tomate (*Solanum lycopersicum* x *S. pimpinellifolium* / Thiago Alberto Ortiz. - Londrina, 2017.
132 f. : il.

Orientador: Lúcia Sadayo Assari Takahashi.

Coorientador: Wilco Ligterink.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, , 2017.
Inclui bibliografia.

1. Genética Molecular Endogâmicas Recombinadas - Tese. 2. Loci de Característica Quantitativas - Tese. 3. Qualidade de Sementes - Tese. 4. RIL - Tese. I. Takahashi, Lúcia Sadayo Assari . II. Ligterink, Wilco. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. . IV. Título.

THIAGO ALBERTO ORTIZ

**IDENTIFICAÇÃO E MAPEAMENTO REFINADO DE QTLs PARA
CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DE SEMENTE DE TOMATE
(*Solanum lycopersicum* × *S. pimpinellifolium*)**

Tese apresentada ao Departamento de
Agronomia da Universidade Estadual de
Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lúcia Sadayo Assari
Takahashi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr^a. Maria Paula Barion Alves Nunes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr^a. Thaís de Souza Rocha
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Eli Carlos de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr^a. Christina da Silva Wanderley
Centro Universitário Filadélfia - Unifil

Prof. Dr. José Roberto Pinto de Souza
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Denis Santiago da Costa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 22 de fevereiro de 2017.

Dedico este trabalho aos meus pais, Luis Ortiz e Maria de Fatima Ortiz, aos quais sou grato pela minha vida e por tudo que sou... AMO VOCÊS

AGRADECIMENTO (S)

Agradeço a Universidade Estadual de Londrina (UEL) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – UEL pela oportunidade de realizar o doutorado

A Wageningen University (WUR) por ter me recebido de portas abertas e ter oferecido toda a sua infra-estrutura para desenvolver o trabalho durante o período do doutorado sanduíche

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo durante todo o doutorado e ao Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE)

A minha orientadora Dr^a. Lúcia Sadayo Assari Takahashi pelo ensejo e ajuda desprendida durante todos estes anos

Ao meu Co-orientador Dr. Wilco Ligterink e ao Dr. Henk Hilhorst pela oportunidade e confiança em permitir a realização do período do doutorado sanduíche em Wageningen University (Holanda), e pela ajuda e apoio quando necessários

A Dr^a. Maria Paula Barion Alves Nunes, Dr^a. Thaís de Souza Rocha, Dr. Eli Carlos de Oliveira, Dr^a. Christina da Silva Wanderley, Dr. José Roberto Pinto de Souza e Dr. Denis Santiago da Costa que aceitaram participar da minha banca de defesa e que desprenderam o seu tempo para contribuir ao meu trabalho

A todos os professores do programa de pós-graduação da UEL que compartilharam os seus conhecimentos

A doutoranda Nafiseh Geshnizjani, e aos técnicos do laboratório da WUR Leo Willems e Juriaan Rienstra pela calma e atenção em ensinar novas técnicas, e pela ajuda na condução dos experimentos e na análise dos dados

Ao meu pai Luis Ortiz e a minha mãe Maria de Fatima Ortiz, pelo amor, compreensão e dedicação ofertados por toda a minha vida e por serem meu porto seguro e meu exemplo de vida

A minha irmã Graziela Ortiz e ao meu amigo Geyzom Aragão pelo companheirismo, carinho e apoio

A todos os amigos aqui do Brasil e aos que tive a honra de conhecer e compartilhar momentos inesquecíveis na Europa

A toda a minha família que estiveram comigo durante esta caminhada

A todos que me apoiaram e me ajudaram direta ou indiretamente
E principalmente a Deus pela saúde dada a mim e a toda a minha
família e pela determinação para enfrentar as oportunidades concebidas

CONFIAR sem entender aquilo que Deus vai fazer em nossas vidas é muito mais complicado quando passamos por essa SITUAÇÃO. Mas, de nada adiantaria, entrarmos em DESESPERO em meio aos nossos momentos de LUTA.

O verdadeiro servo do Senhor, é aquele que mesmo em meio ao SOFRIMENTO, consegue entender os PROPÓSITOS de Deus em sua vida. Apenas CONFIE nesse Deus, que você tem servido, CREIA que o que Ele tem preparado para tua VIDA é muito além daquilo que você têm ESPERADO ou até PEDIDO a Ele. Ele está no CONTROLE de nossas vidas, e Ele sabe o que é MELHOR! Nada é do nosso jeito, nada é como queremos, Deus tem outra VISÃO...

Deus tem o MELHOR sempre!!!

(Autor desconhecido)

ORTIZ, Thiago Alberto. **Identificação e mapeamento refinado de QTLs para características de qualidade de semente de tomate (*Solanum lycopersicum* × *S. pimpinellifolium*)**. 2017. 132 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Dado a complexidade das características de qualidade de semente, a sua base genética ainda não é totalmente compreendida. Por esta razão, o trabalho teve como objetivo identificar e realizar o mapeamento refinado de loci de características quantitativas (QTLs) para qualidade de semente de tomate. As Linhagens Endogâmicas Recombinantes (RILs) foram obtidas do cruzamento entre *Solanum lycopersicum* (cv. MoneyMaker, 'Money') × *S. pimpinellifolium* (G1.1554, 'Pimp') em diferentes ambientes maternos. A fenotipagem das características relacionadas à germinação de semente da população de RILs e seus progenitores foi obtida a partir do teste de germinação sob quatro condições: Água (controle), -0.5 MPa de NaCl (estresse salino), -0.5 MPa de Manitol (estresse osmótico) e 35°C – Alta Temperatura (estresse térmico) e as variáveis analisadas foram: Germinação máxima (G_{max}), Taxa de germinação (t_{50}^{-1}), Área sob a curva de germinação (AUC) e Uniformidade (U_{8416}^{-1}). A fenotipagem da massa de semente foi obtida por pesagem das amostras em balança analítica, e a do tamanho de semente a partir da análise de imagem pelo software ImageJ. Com base na população de RILs, a genotipagem foi obtida por mapa de ligação gênica, a partir de marcadores de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs). Com o auxílio do software MapQTL[®]6.0 foram identificados QTLs para as variáveis analisadas. Considerou-se significativo QTLs com escore LOD igual ou superior a 2,00. No total 124 QTLs foram identificados para características relacionadas a germinação (G_{max} , t_{50}^{-1} , AUC e U_{8416}^{-1}) e 23 QTLs para tamanho e massa de semente. Observou-se que há interações genótipo × ambiente na detecção de QTLs, tanto dos ambientes maternos como de germinação, e que as condições foram eficientes para detectar QTLs significativos. Para as características de germinação identificou-se QTLs significativos nos 12 cromossomos do tomateiro, no entanto observou-se que os intervalos de confiança entre 0-104,3 cM no cromossomo 6 e entre 0-36,1 cM no cromossomo 11 são regiões genômicas que mostram influência sobre QTLs para a qualidade de semente (características de germinação); constatando sobreposição de QTLs. Essas regiões identificadas em diferentes ambientes de germinação poderão ser utilizadas na seleção assistida por marcadores (SAM) ou na clonagem gênica. A investigação de QTLs para tamanho e massa de semente em tomateiro revelou que as RILs são suficientes para o desenvolvimento de Famílias Heterogêneas Endogâmicas (HIFs). A partir desta análise foi possível confirmar e estreitar o QTL para tamanho e massa de semente no cromossomo 11 (intervalo de confiança entre 0,0 e 13,4 cM). Com o início do mapeamento refinado do QTL no cromossomo 11, a HIF 211 poderá ser utilizada como ponto de partida para aprimorar o mapeamento do QTL e na identificação e clonagem do gene(s) causal dos processos interligados ao tamanho e massa de semente. A variação fenotípica nos progenitores e na população de RIL e a resolução e o tamanho dessa população foi suficiente para encontrar QTLs para qualidade de semente, mostrando ser uma ferramenta para o estudo das características quantitativas. O mapeamento de QTLs associados à características

de qualidade de semente em tomateiro possibilitará a eficiência de melhoramento e seleção de plantas para linhagens com maior vigor de semente. Os marcadores moleculares ligados aos QTLs podem ser utilizados na SAM, proporcionando um método rápido para selecionar genótipos específicos sem a necessidade de avaliar extensivamente fenótipos em todas as fases do programa de melhoramento.

Palavras-chave: Genética Molecular. Linhagens Endogâmicas Recombinantes. Loci de Características Quantitativas. Qualidade de Sementes. RIL.

ORTIZ, Thiago Alberto. **Identification and fine-mapping of QTLs for seed quality characteristics of tomato (*Solanum lycopersicum* × *S. pimpinellifolium*)**. 2017. 132 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Due the complexity of seed quality traits, its genetic basis is still not fully understood. For this reason, the aim of this study was to identify and fine-mapping of quantitative trait loci (QTLs) to tomato seed quality. Recombinant inbred lines (RILs) were obtained from the crossing between *Solanum lycopersicum* (cv. MoneyMaker, 'Money') × *S. pimpinellifolium* (G1.1554, 'Pimp') under different maternal environments. The phenotype of the traits related to seed germination of the RILs population and their parents was obtained from the germination assay under four conditions: Water (control), -0.5 MPa of NaCl (salt stress), -0.5 MPa of Mannitol (osmotic stress) and 35°C - High Temperature (thermal stress) and the analyzed variables were: Maximum Germination (G_{max}), Germination Rate (t_{50}^{-1}), Area Under the Germination Curve (AUC) and Uniformity (U_{8416}^{-1}). Phenotyping of the seed mass was obtained by weighing the samples on analytical balance and of the seed size from the image analysis by the ImageJ software. Based on the RILs population, genotyping was obtained by binding map of gene from single nucleotide polymorphisms markers (SNPs). With the aid of MapQTL[®]6.0 software, QTLs were identified for the analyzed variables. QTLs with a LOD score equal to or greater than 2.00 were considered significant. In total 124 QTLs were identified for germination traits (G_{max} , t_{50}^{-1} , AUC and U_{8416}^{-1}) and 23 QTLs for seed size and seed weight. We observed genotype × environment interactions in the detection of QTLs, both from the maternal and germination environments, and that the conditions were efficient to detect significant QTLs. Significant QTLs were identified on the 12 tomato chromosomes, however, it was observed that the confidence intervals between 0-104.3 cM on chromosome 6 and between 0-36.1 cM on chromosome 11 are genomic regions which show influence on QTLs for seed quality (germination traits); showing overlapping of QTLs. These identified regions in different germination environments may be used in marker assisted selection (MAS) or gene cloning. The investigation of QTLs for seed size and seed weight of tomato revealed that RILs were sufficient for the development of Heterogeneous Inbred Families (HIFs). From this analysis it was possible to confirm and narrow the QTL for seed size and seed weight on chromosome 11 (confidence interval between 0.0 and 13.4 cM). Since making a start with fine-mapping of the QTL on chromosome 11, HIF 211 can be used as a starting point to improve this mapping of QTL and in the identification and cloning of the causal gene(s) of the processes linked to the seed size and seed weight. The phenotypic variation in both parents and in the RIL population and the size and resolution of this population was enough to find QTLs for seed quality, showing to be a tool for the study of the quantitative traits. Fine-mapping of the QTLs associated with tomato seed quality traits will enable the efficiency of plant breeding and selection for lines with higher seed vigor. Molecular markers linked to QTLs can be used in MAS, providing a rapid method for selecting specific genotypes without the need to extensively evaluate phenotypes at all stages of the breeding program.

Key words: Molecular Genetics. Recombinant Inbred Lines. Quantitative Trait Loci. Seed Quality. RIL.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 3.1** – *Heatmap* de QTLs identificados para características de qualidade de semente. Os cromossomos de tomate são identificados por números (1-12), em centimorgans (cM) ascendendo da esquerda para a direita; os cromossomos são separados por linhas brancas. G_{\max} = Germinação máxima, t_{50}^{-1} = Taxa de germinação, AUC = Área sob a curva de germinação e U_{8416}^{-1} = Uniformidade. As cores indicam QTLs significativos (p -valor = 0,05) em modelos de mapeamento de QTL múltiplos (intervalos 1-LOD). As cores azul e azul claro indicam um efeito maior da característica em *S. pimpinellifolium* e as cores amarelo e vermelho em *S. lycopersicum*.....92
- Figura 4.1** – Geles de agarose com os resultados da análise específica para os marcadores dCAPS: SI11m3576, SI11m3584, SI11m3590, SI11m3598, SI11m3604 e SI11m3618 e a bandagem dos parentais por marcador para os alelos Money (M), Pimp (P) e Heterozigoto (H) 116
- Figura 4.2** – Genótipos de HIFs segregando para os marcadores SI11m3576, SI11m3584, SI11m3618, SI11m3590, SI11m3598 e SI11m3604. Os genótipos dos marcadores flanqueando cada QTL são indicados para cada HIF. Os alelos derivados de *S. lycopersicum* (cv. Moneymaker, 'Money') estão indicados em regiões vermelhas no grupo de ligação, os alelos derivados de *S. pimpinellifolium* (G1.1554, 'Pimp') em regiões amarelas e as regiões heterozigóticas em laranja. As regiões brancas correspondem aos dados não identificados 119
- Figura 4.3** – (A) Tamanho de semente e (B) Massa de semente para NILs com genitor Money (vermelho) e genitor Pimp (amarelo) para cada HIF (211, 286, 277, 268 e 298) 122

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Valor nutricional de tomate maduro (quantidades por 100 g de fruto).....	26
Tabela 3.1 – População de RILs de <i>S. lycopersicum</i> (cv. MoneyMaker, 'Money') × <i>S. pimpinellifolium</i> (G1.1554, 'Pimp') cultivadas em cinco ambientes maternos em casa-de-vegetação	79
Tabela 3.2 – QTLs significativos associados as características de qualidade de semente de tomate (G_{max} , t_{50}^{-1} , AUC e U_{8416}^{-1}) em população de RILs (<i>S. lycopersicum</i> × <i>S. pimpinellifolium</i>) cultivada em cinco ambientes maternos (RIL 1, RIL 2, RIL 3, RIL 4 e RIL 5) sob condição de germinação em Água	84
Tabela 3.3 – QTLs significativos associados as características de qualidade de semente de tomate (G_{max} , t_{50}^{-1} , AUC e U_{8416}^{-1}) em população de RILs (<i>S. lycopersicum</i> × <i>S. pimpinellifolium</i>) cultivada em cinco ambientes maternos (RIL 1, RIL 2, RIL 3, RIL 4 e RIL 5) sob condição de germinação em NaCl	86
Tabela 3.4 – QTLs significativos associados as características de qualidade de semente de tomate (G_{max} , t_{50}^{-1} , AUC e U_{8416}^{-1}) em população de RILs (<i>S. lycopersicum</i> × <i>S. pimpinellifolium</i>) cultivada em cinco ambientes maternos (RIL 1, RIL 2, RIL 3, RIL 4 e RIL 5) sob condição de germinação em Manitol	87
Tabela 3.5 – QTLs significativos associados as características de qualidade de semente de tomate (G_{max} , t_{50}^{-1} , AUC e U_{8416}^{-1}) em população de RILs (<i>S. lycopersicum</i> × <i>S. pimpinellifolium</i>) cultivada em cinco ambientes maternos (RIL 1, RIL 2, RIL 3, RIL 4 e RIL 5) sob condição de germinação em Alta Temperatura	89
Tabela 4.1 – População de RILs de <i>S. lycopersicum</i> (cv. MoneyMaker, 'Money') × <i>S. pimpinellifolium</i> (G1.1554, 'Pimp') cultivadas em cinco ambientes maternos em casa-de-vegetação	112
Tabela 4.2 – Marcadores dCAPS utilizados na genotipagem de cada HIF	114
Tabela 4.3 – Sequência inicial e final dos marcadores dCAPS e suas enzimas.....	115

Tabela 4.4 – QTLs significativos associados as características de tamanho e massa de semente de tomate em população de RILs (<i>S. lycopersicum</i> × <i>S. pimpinellifolium</i>) cultivada em cinco ambientes maternos (RIL 1, RIL 2, RIL 3, RIL 4 e RIL 5)	117
Tabela 4.5 – ANOVA para tamanho de semente: Causa de variação (CV), graus de liberdade (gl), soma de quadrados (SQ), soma média de quadrados (SMQ), valor-F e <i>p</i> -valor.....	120
Tabela 4.6 – ANOVA para massa de semente: Causa de variação (CV), graus de liberdade (gl), soma de quadrados (SQ), soma média de quadrados (SMQ), valor-F e <i>p</i> -valor.....	120
Tabela 4.7 – Número de plantas por genitor (NPG), média (<i>x</i>) e desvio padrão (<i>s</i>) para Money e Pimp e <i>p</i> -valor para as cinco HIFs para tamanho e massa de semente	121

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	TOMATE	19
2.1.1	Taxonomia	19
2.1.2	Origem	20
2.1.3	Espécies de Tomate.....	20
2.1.4	Propagação e Características Edafoclimáticas	22
2.1.5	Morfologia	23
2.1.6	Importância Econômica e Demanda	24
2.1.7	Importância Nutricional: Composição Química e Propriedades Nutracêuticas	26
2.2	SEMENTES	27
2.2.1	Cenário Mundial: Importância e Perspectivas das Sementes	28
2.2.2	Desenvolvimento de Sementes.....	29
2.2.3	Qualidade da Semente.....	32
2.2.3.1	Ambiente materno	35
2.2.3.2	Germinação de sementes	37
2.2.3.2.1	<i>Atributos do processo de germinação</i>	37
2.2.3.2.2	<i>Condições de germinação</i>	38
2.2.3.3	Tamanho e massa de semente	41
2.2.3.3.1	<i>Hipóteses e fatores genéticos para o tamanho de semente</i>	43
2.3	TECNOLOGIA GENÔMICA	45
2.3.1	Análise de Loci de Características Quantitativas (QTLs)	46
2.3.2	Análises e Métodos pós-QTL	48
2.3.3	Genes Relacionados ao Tamanho de Semente.....	53
2.4	REFERÊNCIAS	55
3	ARTIGO A: IDENTIFICAÇÃO DE QTLs PARA CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DE SEMENTE DE TOMATE SOB INFLUÊNCIA DO AMBIENTE MATERNO E DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE NA GERMINAÇÃO	72

3.1	RESUMO	72
3.2	ABSTRACT.....	73
3.3	INTRODUÇÃO	75
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	79
3.4.1	Material Vegetal e Condições de Crescimento	79
3.4.2	Coleção de Sementes	79
3.4.3	Fenotipagem de Características de Qualidade de Semente de População de RILs	80
3.4.3.1	Teste de germinação.....	80
3.4.3.2	Cálculo de G_{max} , t_{50}^{-1} , AUC e U_{8416}^{-1}	81
3.4.4	Genotipagem.....	81
3.4.5	Identificação de QTLs	82
3.5	RESULTADOS	83
3.5.1	Variação Fenotípica em Características Relacionados à Qualidade de Semente - Mapeamento de QTLs para Diferentes Características	83
3.5.2	Influência do Ambiente Materno na Identificação de QTLs	90
3.5.3	Efeito Aditivo dos Progenitores	90
3.5.4	Localização e Sobreposição de QTLs.....	91
3.5.5	Explorando a Análise de QTLs.....	93
3.6	DISCUSSÃO	93
3.6.1	Controle Genético - Efeito Aditivo dos Parentais	93
3.6.2	Influência do Ambiente Materno na Identificação de QTL.....	94
3.6.3	Interpretação das Características de Germinação de Semente.....	96
3.6.4	Influência do Ambiente de Germinação - Sobreposição de QTL entre os Fenótipos de Qualidade de Semente	97
3.6.5	Considerações	99
3.7	REFERÊNCIAS	100
4	ARTIGO B: CONFIRMAÇÃO E MAPEAMENTO REFINADO DE QTLs PARA TAMANHO E MASSA DE SEMENTE DE TOMATE NO CROMOSSOMO 11 A PARTIR DE FAMÍLIAS ENDOGÂMICAS HETEROGÊNEAS (HIFS)	106
4.1	RESUMO	106

4.2	ABSTRACT.....	107
4.3	INTRODUÇÃO	108
4.4	MATERIAL E MÉTODOS	112
4.4.1	Material Vegetal: Condições de Crescimento e Coleta de Sementes	112
4.4.2	Fenotipagem: Análise de Massa e Tamanho de Semente.....	113
4.4.3	Genotipagem.....	113
4.4.4	Identificação de QTLs	113
4.4.5	Desenvolvimento de Famílias Heterogêneas Endogâmicas (HIFs)	114
4.4.5.1	Genotipagem de HIFs - teste para marcador dCAPS	115
4.4.5.2	Análise do tamanho e massa de semente das HIFs	116
4.4.6	Análise Estatística.....	116
4.5	RESULTADOS	117
4.5.1	Identificação de QTLs para Tamanho e Massa de Semente	117
4.5.2	Desenvolvimento de Famílias Heterogêneas Endogâmicas (HIFs)	118
4.5.3	Confirmação do(s) QTL(s) para Tamanho e Massa de Semente em HIFs para o Cromossomo 11	119
4.5.4	Resumo dos Resultados	122
4.6	DISCUSSÃO	123
4.7	REFERÊNCIAS	126
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	131

1 INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma das plantas de importância econômica mundial, com aumento gradativo da produção per capita. Esta espécie tem grande adaptabilidade climática, e pode ser cultivada em climas tropicais, subtropicais e temperados, o que permite o seu cultivo em várias regiões.

O tomate pode ser consumido *in natura* ou processado. Devido à sua relevância como alimento, o tomateiro tem sido material de pesquisa, principalmente na área da genética e da tecnologia e produção de sementes; sendo que as espécies selvagens e afins têm se mostrado essenciais para o melhoramento vegetal, como fontes de características desejáveis e para estudos evolutivos.

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de tomate. Na safra 2016, 54,7 mil ha foram destinados para o seu cultivo no país, com produção de 3.544,6 mil t e produtividade de 64.814 kg ha⁻¹; sendo Goiás, São Paulo e Minas Gerais os principais estados produtores. Outro país onde a produção de tomate se destaca é a Holanda, que é um dos países com maior rendimento de fruto e com alta qualidade do produto final; tendo este como um dos seus principais produtos de exportação.

A Holanda também destaca-se no mercado de sementes, sendo líder mundial na produção e exportação de sementes de alta qualidade, a exemplo do tomate. Portanto, a manutenção e a melhoria da sua qualidade é de importância para o país, o que proporciona investimentos consideráveis em pesquisa e desenvolvimento relacionado ao tema.

Dado ao aumento da população mundial, se faz necessário dar-se a devida importância para a qualidade de sementes, tendo em vista que a maior parte dos recursos alimentares provêm destas. O desempenho das sementes é determinado por três componentes: genética, qualidade fisiológica e ambiente. Portanto, pesquisas são direcionadas para avaliar características relacionadas à qualidade de semente e a influência das condições ambientais que interferem nos estádios fenológicos das culturas.

Desta forma, elucidar os elementos genéticos responsáveis pelo controle de características da qualidade de semente beneficiará a pesquisa básica e aplicada. Assim, uma abordagem para este objetivo é a análise de Loci de Características Quantitativas (QTLs) com base na comparação de dados fenotípicos

e genotípicos, a partir de combinações diferentes e conhecidas de dois tipos de DNA parental distintos.

A compreensão da base genética da variação em caracteres quantitativos é uma tarefa desafiadora, já que são, muitas vezes, o resultado da variação de muitos genes que, além disso, são influenciados pelas interações genótipo x ambiente. A dissecção genética-molecular dessas características e a sua relação com os fenótipos permitem a identificação dos genes reguladores e vias de sinalização envolvidas e, assim, proporcionar os meios para prever e melhorar a qualidade de semente.

As Linhagens Endogâmicas Recombinantes (RILs) tem sido utilizadas na análise de QTL por desempenharem um papel fundamental na obtenção de valores de características sob diferentes condições ambientais. Para o mapeamento de alta precisão que leva ao mapeamento refinado e clonagem de gene(s) responsáveis pela variação de características complexas, geralmente, requer a confirmação e validação de QTLs em diferentes populações; podendo ser obtido pelo desenvolvimento de Famílias Endogâmicas Heterogêneas (HIFs) através de RILs.

Por meio de seleção dentro de HIFs, Linhagens Quase Isogênicas (*Near Isogenic Lines* ou NILs) contrastando nos QTLs de interesse são desenvolvidas. Assim, as NILs que diferem apenas para marcadores flanqueando um QTL específico é uma das soluções para reduzir a posição do mapa de um QTL, facilitar a confirmação de QTLs e, finalmente, a identificação de genes subjacentes às características complexas.

Estudos de análise de características quantitativas em diferentes espécies de importância agrícola, como em soja, milho, feijão e girassol, já foram conduzidos: regiões genômicas que regem uma gama de características fenotípicas são conhecidas e alguns destes QTLs foram clonados, como em *Arabidopsis* e arroz. Porém, ainda há carência de estudos em muitas espécies, a exemplo do tomateiro.

A qualidade de semente é uma característica complexa e a genética dos fenótipos não é totalmente compreendida. Por uma razão, este estudo teve como objetivos:

(1) Identificar QTLs para características de qualidade de semente de tomate, em população de RILs sob influência do ambiente materno e diferentes condições de estresse na germinação;

(2) Confirmar e realizar o mapeamento refinado de QTLs para o tamanho e a massa de semente de tomate no cromossomo 11 a partir de Famílias Endogâmicas Heterogêneas (HIFs) obtidas do cruzamento entre *S. lycopersicum* × *S. pimpinellifolium*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TOMATE

2.1.1 Taxonomia

O tomateiro é uma planta dicotiledônea e pertence à ordem Tubiflorae, família Solanaceae, gênero *Lycopersicon* e sub-gênero *Eulycopersicum*. A família Solanaceae inclui aproximadamente 1.500 espécies tropicais e subtropicais (TAYLOR, 1986; LAZAR, 1994; MONTEIRO, 2008). Como o nome original do tomate, *Solanum lycopersicum*, foi reintroduzido (HEISER; ANDERSON, 1999), em vez de *Lycopersicon esculentum*, nome comumente aceito e ainda válido, desta forma, o primeiro será usado neste estudo.

O gênero *Lycopersicon* inclui 13 espécies, que podem ser agrupadas em dois complexos, denominados *Esculentum* e *Peruvianum* (PERALTA; SPOONER, 2006). Esta divisão é devida à incompatibilidade sexual unilateral entre as espécies *S. peruvianum* e *S. lycopersicum* (HOGENBOOM, 1972, GOULD, 1992). O complexo *Esculentum* consiste em oito espécies: *Solanum lycopersicum* L. (*Lycopersicon esculentum* Miller), *S. pimpinellifolium* L. [*L. pimpinellifolium* (L.) Miller], *S. cheesmaniae* (L. Riley) Fosberg (*L. cheesmaniae* L. Riley), *S. neorickii* D. M. Spooner et al. (*L. parviflorum* C. M. Rick et al.), *S. habrochaites* S. Knapp & D. M. Spooner (*L. hirsutum* Dunal), *S. pennellii* Correll [*L. pennellii* (Correll) D'Arcy], *S. chmielewskii* (C. M. Rick et al.) D.M. Spooner et al. (*L. chmielewskii* C. M. Rick et al.) e *S. galapagense* S.C. Darwin e Peralta [*L. cheesmaniae* f. minor (Hook. f.)]. O complexo *Peruvianum* é constituído por cinco espécies: *Solanum peruvianum* L. [*L. peruvianum* (L.) Miller], *S. chilense* (Dunal) Reiche (*L. chilense* Dunal), *S. huaylasense* Peralta, *S. corneliomulleri* J. F. Macbr. (também conhecida como *L. glandulosum* C. F. Müll) e *S. arcanum* Peralta; sendo que estas três últimas são também consideradas parcialmente como *L. peruvianum* (L.) Miller (PERALTA; SPOONER; KNAPP, 2008; EBERT, 2013).

A maioria das espécies pertencentes ao complexo *Esculentum* são selvagens e inexploradas em razão dos seus frutos serem pequenos e às vezes pubescentes. No entanto, a utilização dessas espécies é notável em programas de melhoramento de tomate, visando a introdução de genes que podem conferir

características desejadas, como resistência a pragas e doenças e melhora da qualidade do fruto e da qualidade nutricional (STEVENS, 1986). Vale ressaltar que o tomate cultivado, *Solanum lycopersicum*, também pertence a este complexo.

2.1.2 Origem

O tomateiro (*S. lycopersicum*) é uma planta nativa do oeste da América do Sul, especificamente na região entre o Equador e o norte do Chile. Porém, muitas espécies podem ser encontradas da costa do Pacífico até uma altitude de 2.000 metros na região dos Andes (COSTA; HEUVELINK, 2005; SPOONER; PERALTA; KNAPP, 2005).

A cultura se expandiu para a América Central por tribos indígenas e para outras partes do mundo por viajantes europeus, no século XV. No período anterior à colonização espanhola, foi levado para o México onde foi cultivado e geneticamente melhorado (ROCHA, 2007).

Sua domesticação ocorreu no México, de onde foi introduzida na Europa em meados do século XVI. Na Europa, a nova cultura foi rapidamente adotada pelos países do Sul, especialmente na Itália e na Espanha. No entanto, nos países do Norte e Central foi temida como venenosa, sendo inicialmente usado principalmente na ornamentação, devido à beleza do fruto. A maior expansão global do cultivo de tomate ocorreu nas primeiras décadas do século XX como resultado do desenvolvimento da indústria de processamento de concentrado (COSTA; HEUVELINK, 2005, ALMEIDA, 2006). Sua crescente popularidade levou à introdução de centenas de variedades e um enorme aumento na sua produção (GOULD, 1992).

2.1.3 Espécies de Tomate

Sabe-se que há substancial variação natural para a tolerância ao estresse abiótico no tomateiro cultivado (*S. lycopersicum*), bem como nas espécies selvagens afins. O germoplasma de tomate de tipo selvagem é uma rica fonte de variabilidade genética desejável, uma vez que muitas espécies selvagens foram identificadas com alta tolerância a estresses bióticos e abióticos (KIMURA; SINHA, 2008; BOLGER et al., 2014).

A estreita base genética do tomateiro cultivado necessita de introgressão de novas variações de espécies afins. Assim, como as espécies de tomateiro silvestre representam uma rica fonte de genes e características úteis (ASHRAFI; KINKADE; FOOLAD, 2009), estas podem ser uma opção à ser usada para este propósito e por isso, estudos devem ser desenvolvidos. Segundo Ashrafi, Kinkade e Foolad (2009), a exploração da variação genética dentro das espécies selvagens pode ser facilitada pelo uso de marcadores moleculares e mapas genéticos.

Além disso, alterações nos teores de metabólitos foram identificadas nas espécies selvagens que são potencialmente importantes no que diz respeito às respostas ao estresse, bem como em metabólitos de importância nutricional. A importância destas mudanças é discutido quanto ao uso das várias espécies selvagens para a engenharia metabólica dentro de estratégias amplas de melhoramento (SCHAUER; ZAMIR; FERNIE, 2005).

Em comparação com outras espécies de tomateiro silvestre, *S. pimpinellifolium* possui menos características hortícolas indesejáveis e oferece vários benefícios para o estudo da variação genética natural e caracteres morfológicos. Assim, tem sido frequentemente utilizada como um recurso genético em programas de melhoramento de tomateiro (KAZMI et al., 2012). Além disso, esta espécie é relativamente bem conhecida geneticamente, acessível à experimentação, de crescimento rápido, altamente reprodutiva e com características excepcionalmente desejáveis, incluindo resistência à doença, tolerância ao estresse abiótico, frutos de alta qualidade nutricional e com alto teor de licopeno (ASHRAFI; KINKADE; FOOLAD, 2009). Filogeneticamente, é a espécie selvagem mais relacionada a *S. lycopersicum* e, portanto, prontamente hibridizada (EBERT, 2013), que facilita o desenvolvimento de gerações avançadas. Além disso, a natureza interespecífica do cruzamento fornece amplo polimorfismo de DNA para o mapeamento (DOGANLAR et al., 2002).

Uma vez que *S. lycopersicum* pode ser facilmente cruzado com espécies selvagens afins, este germoplasma exótico pode fornecer uma fonte valiosa para a melhoria de características de importância agrícola (SCHAUER; ZAMIR; FERNIE, 2005). No entanto, apesar da estreita relação entre *S. lycopersicum* e *S. pimpinellifolium*, as duas espécies apresentam grande variação natural em muitas características morfológicas e economicamente interessantes, não

apenas no tamanho de fruto, qualidade de plântula e características de crescimento, mas também no tamanho de semente (DOGANLAR et al., 2002).

No tomateiro, grande variação fenotípica tem sido observada entre as sementes de diferentes espécies. Apesar disso, as sementes de tomateiro cultivado têm sido desenvolvidas para ser várias vezes maior do que suas contrapartes selvagens como resultado da domesticação e reprodução (DOGANLAR; FRARY; TANKSLEY, 2000).

2.1.4 Propagação e Características Edafoclimáticas

A propagação do tomate pode ser de forma assexuada, através de mudas, ou sexualmente, por meio de sementes. O uso de sementes se destaca em programas de melhoramento para selecionar materiais com informação genética desejável, apresentando características utilizadas na seleção de genótipos. Pois, sabe-se que a semente é portadora de informações genéticas de uma variedade vegetal (como produtividade, tipo de fruto, resistência a patógenos, entre outros), devido à sua variabilidade.

A semeadura direta no sulco é o método mais simples de propagação, utilizado predominantemente em lavouras para a produção de tomate para a indústria, mas o plantio de tomate para consumo fresco é feito por transplante de mudas provenientes de sementes (MACHADO NETO, 2014).

O tomateiro é classificado como uma cultura cosmopolita, devido à tolerância às variações climáticas, conduzido em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (FILGUEIRA, 2013). Esta cultura não responde significativamente ao fotoperíodo, desenvolvendo-se bem tanto em condições de dias curtos como de dias longos, entre 9 e 15 horas de luz por dia (ALVARENGA, 2013).

As plantas de tomate normalmente não toleram temperaturas extremas, mas isso depende da cultivar. Em cada estágio do ciclo do tomateiro, há uma temperatura ótima, sendo que para a germinação situa-se entre 16 e 29°C (SILVA et al., 2006). Por sua vez, a floração e a frutificação são beneficiadas por temperaturas diurnas de 18 a 25°C e temperaturas noturnas entre 13 e 24°C (SILVA; GIORDANO, 2000).

Para o cultivo do tomate, recomenda-se temperatura média de 21°C, mas a planta pode tolerar uma amplitude de 10 a 34°C. Em temperaturas inferiores a

12°C, o tomateiro tem seu crescimento reduzido e em temperaturas médias superiores a 28°C, a firmeza e a cor dos frutos são afetados, os quais tornam-se amarelados em razão da redução/inibição da síntese de licopeno (pigmento responsável pela coloração vermelha típica dos frutos) e aumento da concentração de caroteno (pigmento que confere coloração amarelada à polpa). Além disso, temperaturas noturnas próximas a 32°C causam abortamento de flores, mau desenvolvimento dos frutos e formação de frutos ocos. A produção de pólen é afetada tanto por temperaturas altas (> 40°C) quanto por temperaturas baixas (< 10°C) (LUZ; SABOYA; PEREIRA, 2002; SILVA et al., 2006).

Outro fator essencial para o desenvolvimento do tomateiro é a umidade relativa (UR). O ambiente de cultivo deve ter uma percentagem de umidade que varia de 50 a 70%. UR abaixo de 50% associada à alta temperatura pode prejudicar a absorção de água e nutrientes pela planta, devido ao fechamento estomático e conseqüente redução da taxa de transpiração; sendo medidas de proteção fisiológica sob condições adversas. Em contraste, a alta umidade pode promover a incidência de patógenos, especialmente fungos, como *Phytophthora* sp. (ALVARENGA, 2013).

2.1.5 Morfologia

O tomateiro cultivado é uma planta anual, herbácea, de haste redonda, pilosa, flexível, e com abundância de brotos laterais. As folhas são pecioladas, compostas e de número ímpar de folíolos (MINAMI; HAAG, 1989; NAIKA et al., 2006; FILGUEIRA, 2013).

A planta, sobre o hábito de crescimento, é dividido em dois tipos, o indeterminado e o determinado. O hábito indeterminado ocorre na maioria das espécies destinadas à produção de tomate fresco e é adequado para a cultura tutorada. No entanto, aqueles cujo hábito de crescimento é o tipo determinado são, em sua maioria, mais adequados à industrialização, mas há algumas espécies cuja produção é destinada ao consumo *in natura*. Como o tipo determinado tem altura entre 0,70 a 1,20 m, tem sido favorecido seu crescimento em casa-de-vegetação (FILGUEIRA, 2013).

As flores são hermafroditas, pequenas, amarelas, se reúnem na forma de aglomerado e, geralmente, ocorrem entre 3 e 12 flores por cacho

(FONTES; SILVA, 2002). Botanicamente, o fruto é classificado como baga, carnosos e suculentos e é dividido em pericarpo, locus ou cavidades loculares [variando de 2 (bilocular) a 12 (plurilocular)] e conteúdo locular (MADHAVI, SALUNKHE, 1998; FONTES; SILVA, 2002; ALMEIDA, 2006). A parede do ovário é chamada de pericarpo, a qual tem três camadas: um epicarpo membranoso revestido com uma cutícula rica em ceras e ácidos cuticulares, um mesocarpo carnosos e suculentos, e uma membrana tênue (HUI; EVRANUZ, 2015). Todos são tecidos epidérmicos, exceto o mesocarpo que circunda o tecido placentário onde estão as sementes, que é o óvulo fertilizado (FONTES; SILVA, 2002).

A semente de tomate é composta de um embrião completamente rodeado por um revestimento relativamente duro, um endosperma frágil, e uma fina testa (casca da semente). A extremidade da radícula do embrião é circundada por um tecido endospermático especializado, denominado capa do endosperma, e o restante do endosperma é chamado de endosperma lateral (HARDING et al., 2004). Cada uma destas três estruturas é geneticamente distinta e poderia potencialmente contribuir para a variação da massa de semente. O embrião desenvolve-se a partir do óvulo fecundado e contém uma representação igual dos genomas materno e paterno, enquanto o endosperma é normalmente formado pela fusão de dois núcleos polares e um núcleo do gameta masculino e, portanto, contém duas doses dos genes materno e uma dos genes paterno (KHAN, 2013).

As sementes encontram-se imersas em tecido locular ou placentário. Durante a maturação, este tecido forma uma mucilagem que preenche as cavidades loculares. Após a maturação, o tomate geralmente tem uma cor vermelha, embora algumas variedades são amarelo, rosa, laranja ou até verde (espécies selvagens) (MADHAVI; SALUNKHE, 1998; ALMEIDA, 2006).

2.1.6 Importância Econômica e Demanda

O tomateiro é uma das culturas mais importantes, entre os vegetais, não só em termos de produção, mas também em valor econômico e é considerada uma das hortícolas mais cultivadas e consumidas em todo o mundo, além de ser uma importante *commodity* global (BROWN; DEMMENT; LUMPKIN, 2005; KIMURA; SINHA, 2008; FENG et al., 2011).

A produção de tomate tem uma demanda cada vez maior, mostrando que sua expansão ainda não atingiu seu pico, tendo em vista o aumento da produção, incluindo em ambiente protegido; com uma produção mundial de 163,4 milhões de toneladas e rendimento de 348,6 mil de kg ha⁻¹, na safra 2013-2014 (FAOSTAT, 2016).

O tomate ocupa um lugar proeminente na mesa do consumidor, o que leva a perspectiva promissora para a evolução da cultura. O setor de tomate e seus produtos processados faz parte de um mercado mundial competitivo. Nos últimos anos, registrou-se uma expansão da cultura como resultado do crescimento do seu consumo, quer como produto fresco, tal como produto processado (concentrado, suco, desidratado, ketchup, etc) (CARVALHO; PAGLIUCA, 2007). Por esta razão, existem diferentes variedades dentro da espécie para complementar as demandas do mercado, tanto para o tomade de mesa quanto para a transformação industrial (FERREIRA, 2004). No entanto, a maior parte de sua produção é destinada ao consumo *in natura* (AGUIAR, 2011).

Na safra 2013-2014, os principais países produtores foram: China, Índia, Estados Unidos, Turquia e Egito e os que apresentaram os maiores rendimentos foram: Bélgica (499,6 M Kg ha⁻¹), Holanda (483,6 M Kg ha⁻¹), Irlanda (470,0 M Kg ha⁻¹), Reino Unido (417,8 M Kg ha⁻¹) e Islândia (390,0 M Kg ha⁻¹) (FAOSTAT, 2016).

A mudança nos hábitos alimentares, devido à necessidade de preparar os alimentos mais rapidamente, vem causando um aumento na demanda de produtos processados ou semi-processados, bem como o aumento do consumo devido à consolidação de *fast-food* e *self-service*. Paralelamente, a procura por uma dieta mais saudável por parte da população mundial também tem favorecido o crescimento das vendas de produtos para consumo *in natura* (CARVALHO; PAGLIUCA, 2007).

Como todos os produtos destinados ao processamento em larga escala, os preços dos derivados do tomate são fortemente influenciados pelo mercado mundial. Portanto, a tecnologia de produção deve buscar competitividade, reduzindo os custos de produção e aumentando os índices de produtividade e qualidade.

2.1.7 Importância Nutricional: Composição Química e Propriedades Nutraceuticas

A importância dos vegetais na dieta humana é devido ao fato de que eles não são apenas fonte substancial de carboidratos e proteínas, mas também fornecem vitaminas e minerais. Entre os atributos mais importantes relacionados à qualidade e preferência de consumo de tomate, entre as hortícolas, está a aparência, sabor, aroma, textura, valor nutricional e facilidade de preparo (ALVARENGA, 2013).

A composição do tomate depende da variedade, maturação e condições de produção (temperatura, nutrição, irrigação, etc). No entanto, de um modo geral, tomate maduro é composto principalmente de água, o que representa cerca de 94% da sua constituição total. Os restantes 6% correspondem à matéria seca, composta por 50% de açúcares solúveis (principalmente glicose e frutose), 25% de ácidos orgânicos (cítrico e málico), aminoácidos dicarboxílicos, lípidios e minerais e 25% de sólidos insolúveis em álcool, incluindo proteínas, substâncias pecticas, celulose e hemicelulose (HUI, EVRANUZ, 2015; USDA, 2015). Na tabela 2.1 é possível verificar o valor nutricional de tomate maduro.

Tabela 2.1 – Valor nutricional de tomate maduro* (quantidades por 100 g de fruto).

	Nutriente	Unidade	Concentração
Composição	Água	g	94,52
	Energia	kcal	18,0
	Proteína	g	0,88
	Lipídio total (gordura)	g	0,20
	Carboidrato, por diferença	g	3,89
	Fibra, total dietético	g	1,2
	Açúcares, total	g	2,63
Minerais	Cálcio, Ca	mg	10,0
	Ferro, Fe	mg	0,27
	Magnésio, Mg	mg	11,0
	Fósforo, P	mg	24,0
	Potássio, K	mg	237,0
	Sódio, Na	mg	5,0
	Zinco, Zn	mg	0,17
Vitaminas	Vitamina C, ácido ascórbico total	mg	13,7
	Tiamina	mg	0,037
	Riboflavina	mg	0,019
	Niacina	mg	0,594
	Vitamina B6	mg	0,080

Continua

Tabela 2.1 – Continuação...

	Nutriente	Unidade	Concentração
Vitaminas	Folato, EFD ¹	µg	15,0
	Vitamina A, EAR ²	µg	42,0
	Vitamina A, UI ³	µg	833,0
	Vitamina E (alfa-tocoferol)	mg	0,54
	Vitamina K (filoquinose)	µg	7,9
Lipídios	Ácidos graxos, saturado total	g	0,028
	Ácidos graxos, monoinsaturado total	g	0,031
	Ácidos graxos, poliinsaturado total	g	0,083

* Tomates, vermelho, maduro, cru, média anual.

¹ Equivalente de folato dietético, ² Equivalente da atividade de retinol e ³ Unidade internacional.

Fonte: USDA (2015).

O consumo de tomate é recomendado por nutricionistas porque constitui um alimento rico em licopeno (média de 3,31 mg 100 g⁻¹), vitaminas A e B, e minerais importantes, como fósforo e potássio, além de ácido fólico, cálcio e frutose. A cor avermelhada é devida ao acúmulo de licopeno, que é uma das substâncias fotoquímicas com propriedades anticancerígenas (ALVARENGA, 2013). O licopeno é um carotenóide sem atividade de pró-vitamina A, lipossolúvel, predominantemente no tegumento do tomate; tem propriedades antioxidantes e pode prevenir doenças cardiovasculares (SHAMI; MOREIRA, 2004; LUCIA et. al., 2008; SILVA; SÁ, 2012).

O corpo humano é incapaz de sintetizar carotenóides, assim eles devem ser obtidos apenas pela dieta. Este nutriente é encontrado em um número limitado de alimentos (MORITZ; TRAMONTE, 2006), e o tomate e seus derivados são fontes desse composto.

Além da importância econômica e nutricional, a produção de tomate exerce uma notável influência social, gerando um grande número de empregos diretamente no campo e nas diversas etapas da cadeia produtiva (FONTES; SILVA, 2002; HORA et al., 2004).

2.2 SEMENTES

A semente é o meio pelo qual o novo indivíduo será disperso. Assim, a semente ocupa uma posição crítica na história de vida das plantas superiores. A semente é o principal meio de regeneração de plantas, bem como fonte de alimento,

fibra, biocombustíveis e bioativos, e seu valor reside principalmente nas reservas de armazenamento de proteína, amido e óleo, que são sintetizados durante o desenvolvimento e maturação das sementes (BEWLEY et al., 2013).

A semente é um produto vivo e deve ser propagada, cultivada, colhida, processada e armazenada corretamente e com cuidado, a fim de manter e maximizar o seu vigor e a viabilidade para a produtividade subsequente. O sucesso com que o novo indivíduo é estabelecido (o tempo, o lugar e o vigor da plântula jovem) é em grande parte determinado pelas características fisiológicas e bioquímicas da semente. Tanto as respostas de uma semente ao seu ambiente, como a reserva de alimentos que essa contém são de importância fundamental para esse sucesso, pois a reserva estará disponível para sustentar a planta jovem nos estádios iniciais de crescimento antes de se tornar um organismo autotrófico independente, capaz de usar a energia solar (BEWLEY et al., 2013).

Mudanças revolucionárias na agricultura no último século transformaram o status de sementes de grandes culturas e variedades vegetais de uma mercadoria para uma propriedade intelectual. A premissa da agricultura que deseja colheitas abundantes muitas vezes não tem acesso às sementes de alta qualidade. Assim, estas tornaram-se um sistema de entrega e um ativo valioso na agricultura moderna, mecanizada e comercializada (KAZMI, 2013).

O desempenho das sementes é determinado por três componentes vinculados e interativos que constituem um triângulo entre genética, qualidade fisiológica e ambiente. Nessa conjuntura, até agora, tem havido pouca ou nenhuma discussão sobre a análise genética de sementes e características de plântulas em tomate em um nível de sistemas (KAZMI, 2013).

2.2.1 Cenário Mundial: Importância e Perspectivas das Sementes

Dado o rápido aumento da população mundial, o próximo século pode testemunhar sérios problemas de escassez mundial de alimentos (SONG et al., 2007). Assim, o aumento das safras é um grande desafio para o século XXI. Uma vez que a maior parte dos recursos alimentares do mundo para os seres humanos provêm de sementes, uma forma de enfrentar este desafio é criar culturas que produzam mais sementes (HERRIDGE et al., 2011).

Portanto, pesquisas têm sido direcionadas para entender a dispersão e o estabelecimento da próxima geração, como unidades de rendimento agrícola e melhorar sua qualidade (MOORE et al., 2013). Nas culturas, as sementes são os principais produtos para o consumo, e o tamanho e a massa de semente são características importantes do rendimento. Ademais, a sobrevivência pós-germinação e o subsequente desenvolvimento da próxima geração dependem de parâmetros de semente, como o tamanho (MANNING; HOUSTON; EVANS, 2009). Por estas e outras razões, desde o início da agricultura, durante a domesticação, as plantas foram submetidas a seleção para maior tamanho de sementes (SONG et al., 2007; SHOMURA et al., 2008; FAN et al., 2009; VAN DAELE et al., 2012).

Desta forma, elucidar os elementos genéticos responsáveis pelo controle do tamanho e massa de sementes beneficiará a pesquisa básica e aplicada em biologia vegetal (MOORE et al., 2013). A análise de Loci de Características Quantitativas (QTL) com base em dados fenotípicos de muitas plantas que abrigam combinações diferentes e conhecidas de dois tipos de DNA parental distintos é uma abordagem comprovada para este objetivo (ALONSO-BLANCO et al., 2009).

Apesar de estudos, principalmente na planta modelo *Arabidopsis thaliana* (L.), relatarem transgenes e mutantes com efeitos no tamanho e massa de sementes, o conhecimento sobre os parâmetros de produção de sementes permanece fragmentado (VAN DAELE et al., 2012).

2.2.2 Desenvolvimento da Semente

As sementes são órgãos complexos, e a melhoria por meio de um *design* racional requer um entendimento da contribuição de tecidos específicos durante estádios do desenvolvimento das sementes (DAY et al., 2008). O desenvolvimento da semente é importante para a produtividade agrícola e envolve um conjunto essencial, mas complexo, de processos iniciados pelas interações das células gametofíticas masculinas e femininas, incluindo a expansão e o crescimento dos tegumentos maternos do óvulo e o desenvolvimento do zigoto diplóide (SCHRUFF et al., 2006; JIANG et al., 2013).

Em Angiospermas, o desenvolvimento das sementes é um processo crucial no ciclo de vida da planta (LI; LI, 2015). Ela começa com a dupla fertilização, o que leva à formação de um embrião diplóide e um endosperma triplóide. O óvulo

contém os dois gametas femininos, a oosfera (haplóide) e a célula central - dois núcleos polares (diplóides), inclusos ao saco embrionário e o tubo polínico fornece dois gametas masculinos (haplóides). Um gameta masculino fertiliza a oosfera e produz o embrião. O zigoto sofre alongamento e uma transição progressiva para estabelecer o padrão embrionário básico. O embrião possui um meristema apical caulinar, cotilédone(s), hipocótilo, raiz e meristema apical radicular (CHAUDHURY et al., 2001; BERGER, 2003; SUNDARESAN, 2005).

A fertilização da célula central pelo outro gameta masculino produz o endosperma (triplóide), responsável pelo papel nutritivo para o desenvolvimento do embrião e das plântulas (BERGER, 2003, OHTO et al., 2005, DRESSELHAUS, 2006). Esses gametas maternos que estão dentro do saco embrionário se desenvolvem na região nucelar do óvulo (COLOMBO; BATTAGLIA; KATER, 2008).

A camada mais externa da semente é o revestimento ou testa, que se diferencia após a fertilização de tecidos derivados da mãe, incluindo os tegumentos, que circunda o saco embrionário (SCHRUFF et al., 2006; DU et al., 2014; FANG et al. 2012). Portanto, o embrião é rodeado pelo endosperma, que, por sua vez, é cercado dentro do revestimento materno da semente (FANG et al., 2012).

Durante os estádios iniciais do desenvolvimento das sementes, os recursos maternos são utilizados principalmente para a rápida divisão celular e o desenvolvimento de novos tecidos. Uma vez que a divisão celular diminui, a semente entra numa fase de maturação, durante a qual os recursos são realocados para a síntese de compostos de armazenamento, tal como amido, seguido pelo acúmulo de óleos e proteínas. A atividade biossintética então diminui à medida que a semente se move através de uma fase de maturação tardia e prepara-se para dessecar (DAY et al., 2008).

O endosperma em desenvolvimento desempenha vários papéis durante o desenvolvimento da semente (BERGER, 2003; OLSEN, 2004). Em muitas espécies, o desenvolvimento do endosperma evolui através de quatro fases: sincicial, celularização, diferenciação e morte (BERGER, 1999). Após a fertilização em eudicotiledôneas, os núcleos triplóides do endosperma se dividem repetidamente sem a formação de parede celular, resultando na formação de uma grande célula multinucleada, o sincício (OLSEN, 2004). Após a oitava rodada de mitoses sinciciais, o sincício é dividido por um tipo específico de citocinese chamada celularização, inicialmente na região que envolve o embrião, avançando para a região calazal

(SØRENSEN et al., 2002). A divisão nuclear continua através da terceira fase de desenvolvimento do endosperma, que é marcada por uma migração de núcleos para a região calazal, levando à formação de nódulos calazais e cistos. No final desta fase, o endosperma consiste em aproximadamente 200 domínios nucleocitoplasmáticos e o embrião atinge o estágio globular de desenvolvimento. Já na quarta fase, há o início da celularização do endosperma e redução das taxas de mitose (MANSFIELD; BRIARTY, 1990a, 1990b; BOISNARD-LORIG et al., 2001).

O posicionamento do endosperma calazal e o fato de que as sementes com endosperma severamente defeituoso não poder completar o desenvolvimento, sugerem o papel do endosperma no apoio à formação e ao crescimento do embrião durante os estágios iniciais de desenvolvimento (SCOTT et al., 1998). Durante os estágios de maturação, são produzidas celularizações do endosperma e reservas de armazenamento que se acumulam nas células do endosperma (SØRENSEN et al., 2002).

A proliferação precoce do endosperma, portanto, está associada ao crescimento e ao tamanho final das sementes (SCOTT et al., 1998). A alteração da taxa e da duração da divisão celular no endosperma tem sido proposta como uma estratégia biotecnológica para a alteração do tamanho de semente (TIWARI et al., 2006).

O tamanho e a massa final de semente são obtidos através de um crescimento coordenado de três elementos que se desenvolvem simultaneamente nas sementes: embrião, endosperma e tecido materno (LUO et al., 2005; BERGER; GRINI; SCHNITTGER, 2006; KONDOU et al., 2008; ZHOU et al., 2009). Assim, a interação entre os órgãos influencia o tamanho de semente, uma vez que o reduzido tamanho do tegumento materno diminui o tamanho final das sementes (GARCIA; FITZ GERALD; BERGER, 2005) e a redução da proliferação do endosperma reprime o alongamento celular no tegumento (GARCIA et al. 2003).

Vale ressaltar que a proporção embrião/endosperma é variável de acordo com a espécie. No entanto, é relativamente uniforme dentro da mesma espécie. Isso sugere a presença de regulações genéticas para manter o equilíbrio de tamanho entre embrião e endosperma dentro do espaço das sementes delimitados pelos tecidos maternos (NAGASAWA et al., 2013). De acordo com Luo et al. (2005), os principais controles de sementes são fornecidos por genes que definem o

desenvolvimento do tegumento materno e da nova geração de embrião e endosperma.

As contribuições parentais ao tamanho de semente de *Arabidopsis* foram identificadas em cruzamentos envolvendo plantas diplóides e tetraplóides. As mães tetraplóides produziram sementes mais leves quando cruzadas com pais diplóides, porém, os pais tetraplóides cruzados para mães diplóides produziram sementes mais pesadas (SCOTT et al., 1998). Assim, o tamanho de semente é aumentado por um excesso de genoma paterno e restringido por um excesso de genoma materno (FITZGERALD et al., 2008).

De acordo com Li et al. (2008) e Kesavan, Song e Seo (2013), o crescimento de sementes até o tamanho específico de sua espécie é predominantemente determinado pelos sinais internos de desenvolvimento dos tecidos esporofíticos e zigóticos maternos, embora o crescimento das sementes seja afetado por sinais ambientais.

Embora as sementes tenham sido estudadas extensivamente, muitos aspectos do desenvolvimento de sementes, ainda, não são bem compreendidos, apesar da importância das sementes, incluindo os mecanismos genéticos que determinam seu tamanho e massa final (OHTO et al., 2005; SCHRUFF et al., 2006; SONG et al., 2007).

2.2.3 Qualidade de Sementes

A qualidade de semente é um importante atributo agronômico e uma característica quantitativamente herdada. Além disso, é um dos fatores mais importantes para afetar o sucesso de uma cultura e está associado com características fisiológicas e genéticas interligadas (HILHORST; KOORNNEEF, 2007; HILHORST et al., 2010).

Por ser uma característica complexa, pouco se entende, a nível molecular/genético, sobre o estado fisiológico final e o estabelecimento da qualidade de semente (KAZMI, 2013). Além disso, a regulação genética da qualidade de semente dificilmente tem sido investigada para ser usada em programas de melhoramento (KHAN, 2013).

A qualidade e o vigor de semente são características estreitamente relacionadas e interligadas. A qualidade de semente é definida como "o atributo de

viabilidade e vigor de uma semente que permite a emergência e o estabelecimento de plântulas normais sob uma vasta gama de ambientes" (KHAN et al., 2012).

O vigor denota a capacidade de um lote de sementes germinar uniformemente até sua porcentagem máxima em uma ampla gama de condições ambientais (indicando o grau de tolerância ao estresse) e estabelecer plântulas saudáveis; sendo determinado pela interação de componentes genéticos e ambientais (BRADFORD, NONOGAKI, 2007). Assim, o vigor de semente revela-se de suma importância para avaliar a qualidade da mesma, pois o sucesso da germinação, crescimento e rendimento final de cada cultura depende da qualidade das sementes utilizadas para o cultivo (KHAN, 2013).

A qualidade de semente é determinada por uma série de processos fisiológicos relacionados a eventos de desenvolvimento da planta, tais como embriogênese, crescimento, resistência ao estresse e a transição de uma semente para uma plântula autotrófica. Ademais, a condição fisiológica das sementes durante o desenvolvimento e maturação tem efeito sobre a qualidade final (OUYANG et al., 2002; SPANÒ et al., 2007).

O termo qualidade de semente tem um significado amplo que inclui essencialmente os atributos genéticos, fisiológicos e físicos. Além disso, alguns aspectos ou atributos de semente na produção agrícola ultrapassam os limites de qualidade e são melhor descritos e compreendidos em termos de desempenho. Entre estes estão a pureza física, o vigor, a viabilidade, as características da germinação (porcentagem, taxa e uniformidade), a dormência, o vigor de sementes e de plântulas (germinação/crescimento em condições de estresse), a uniformidade no tamanho de semente, a massa seca de plântulas, a morfologia normal dos embriões e das plântulas, a capacidade de estocagem, a ausência de danos mecânicos e a capacidade de se tornar uma planta vigorosa normal (FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006; BRADFORD; NONOGAKI, 2007).

Os produtores de sementes redefiniram o termo "qualidade de semente" para incluir atributos importantes como "plantas utilizáveis" e "estabelecimento das plântulas e das culturas". O atributo "plantas utilizáveis" é uma das principais características da qualidade das sementes utilizadas pelos produtores de sementes e pelos melhoristas de plantas (LIGTERINK; JOOSEN; HILHORST, 2012). A alta qualidade das sementes representa lucro para agricultores e produtores (MOREJON, 2013).

A qualidade de semente é adquirida principalmente durante o seu desenvolvimento e maturação e é afetada drasticamente pelas interações entre o genoma e as condições ambientais prevalentes. Este processo é parte da adaptação normal das plantas para a variação de ambiente e é destinada a maximizar a possibilidade de sucesso da prole (HUANG et al., 2010). No entanto, o componente genético da interação entre o genoma e o ambiente podem ser investigadas e esta variação na adaptação genética pode oferecer oportunidades para os melhoristas de plantas e empresas de sementes para produzir melhor qualidade (KHAN, 2013).

Fatores ambientais, como temperatura, umidade, luz e nutrientes durante o enchimento e a maturação das sementes, bem como os processos de colheita, secagem e beneficiamento contribuem para o "dano acumulado" que influencia a qualidade (SPANÒ et al. 2007, WANG; FREI, 2011). Assim, a qualidade de semente é uma complexa característica governada pelas interações entre o genoma e o ambiente nas várias etapas e, portanto, pode ser influenciada em toda a sua cadeia de produção (KOORNNEEF; BENTSINK; HILHORST, 2002).

No tomateiro, a qualidade de semente está associada a características fisiológicas e genéticas interconectadas e a utilização de sementes diretamente de espécies silvestres ou híbridas de cruzamentos oriundos de espécies silvestres pode afetar negativamente esta característica. No entanto, há carência de informações disponíveis sobre os componentes genéticos de características de qualidade de sementes e plântulas e suas interações mútuas (KHAN, 2013; MOREJON, 2013).

Essa abordagem sistemática, que estuda populações genéticas que diferem nos parâmetros de qualidade de semente e de plântula, pode fornecer uma visão do envolvimento dos genes e dos processos que eles controlam na aquisição da qualidade de semente (LIGTERINK; JOOSEN; HILHORST, 2012). Além disso, o tamanho e a massa de semente são também características que determinam a qualidade (PANTHEE et al., 2005), que por sua vez são as características mais variáveis no reino vegetal (ORSI; TANKSLEY, 2009).

Embora alguns estudos tenham documentado QTLs associados às características de sementes em tomateiro (DOGANLAR; FRARY; TANKSLEY, 2000; FOOLAD; ZHANG; SUBBIAH, 2003; KAZMI et al., 2012; KHAN et al., 2012), porém ainda há a carência de estudos sistemáticos da genética na qualidade de semente, a

fim de desvendar abordagens integrativas que possam facilitar a compreensão das causas subjacentes às características da qualidade de semente de tomate. Assim, tornaria possível a obtenção de métodos para dissecar os componentes genéticos da qualidade de semente integrando a fisiologia, genética, genômica e metabolômica de sementes com o propósito de identificar loci, e subsequentemente genes que controlam essas características em tomate. Para isso, diversos fatores que têm influência nessas características devem ser testados, a exemplo de diferentes ambientes como materno e de germinação, tendo em vista haver diferentes fontes de variação capazes de intervir nas variáveis avaliadas em estudos de qualidade de sementes.

2.2.3.1 Ambiente materno

O fenômeno biológico comumente referido como efeito materno ocorre sempre que o ambiente exerce uma influência sobre a planta mãe que é posteriormente expressa em características de seus descendentes. Plantas superiores apresentam estratégias para se adaptarem ao ambiente e maximizar o êxito dos descendentes. Estas estratégias podem resultar na dispersão de sementes com resposta variável ao ambiente, o que depende da história da semente durante o desenvolvimento e a maturação, já que as condições ambientais experimentadas por uma planta mãe durante a floração e a frutificação podem modificar a qualidade de semente de seus descendentes, e até mesmo interromper seu desenvolvimento. Estudos têm avaliado o efeito do ambiente materno em diferentes aspectos da qualidade de semente, incluindo dormência, tamanho, massa e germinação, constatando que a qualidade de semente é dependente do ambiente durante a sua formação (VALENCIA-DÍAZ; MONTAÑA, 2005; CONTRERAS et al., 2008; ZAS; CENDÁN; SAMPEDRO, 2013; HE et al., 2014).

No entanto, apesar da importância da produção de sementes de alta qualidade na agricultura em geral e na horticultura, os mecanismos durante o seu desenvolvimento que controlam a germinabilidade das sementes maduras ainda são pouco compreendidos (CONTRERAS et al., 2008). De acordo com Herman e Sultan (2011), as plantas respondem às condições ambientais não apenas por mudanças em seu próprio desenvolvimento e fisiologia, mas também pela alteração dos fenótipos expressos por seus descendentes, tendo em vista que em alguns

casos, esses efeitos ambientais herdados podem incluir ajustes específicos do crescimento que são funcionalmente adaptáveis às condições parentais que os induzem.

Os efeitos dos ambientes maternos têm sido reconhecidos como uma fonte relevante de variação fenotípica que pode ter um papel essencial nas adaptações locais (HERMAN; SULTAN, 2011; HOLESKI et al., 2012); aumentando as evidências desses efeitos serem adaptativos, devido as plantas apresentam respostas adaptativas a alguns fatores, a exemplo da luz (GALLOWAY; ETTERSON, 2007). O abastecimento de sementes é frequentemente reduzido quando as plantas maternas são privadas de recursos como luz ou minerais, resultando em diminuição das taxas iniciais de crescimento, tamanho de plântula e capacidade competitiva. Estudos avaliando o efeito do ambiente materno também têm sido realizados considerando a temperatura (YAKOVLEV et al., 2010), a seca (HERMAN et al., 2012), a salinidade (BOYKO et al., 2010) e a deficiência de nitrogênio (KOU et al., 2011).

As condições ambientais podem determinar a quantidade de recursos que as plantas mãe alocam às sementes em desenvolvimento, o que, por sua vez, pode afetar a massa de semente, moldando assim características no estabelecimento de plântulas e crescimento precoce, especialmente sob condições competitivas e de estresse (CASTRO et al., 2006, METZ et al., 2010). Assim, a massa de semente pode ser simplesmente determinada passivamente pelos recursos disponíveis no ambiente materno, onde as condições de déficit levam a redução da variável e, portanto, reduzem o desempenho das plântulas. No entanto, as plantas mãe também podem responder ativamente ao estresse ambiental, mantendo ou mesmo aumentando a massa de semente, a fim de aumentar a taxa de sucesso do número de descendentes inevitavelmente reduzido (VIOLLE et al., 2009). As respostas das plantas mãe às condições ambientais podem afetar não apenas a média, mas também a variação da massa de semente dentro de plantas individuais (HALPERN, 2005; VIOLLE et al., 2009).

Quanto ao tamanho de semente, é comum a variação dentro de espécies e indivíduos e essa variação pode ser adaptativa em ambientes heterogêneos, podendo também surgir de restrições que limitam o controle desta característica (HALPERN, 2005). Produzir sementes de diferentes tamanhos pode ser vantajoso, especialmente em ambientes heterogêneos (HALPERN, 2005;

CHARPENTIER et al., 2012), justificando a importância do efeito do ambiente materno como métodos de sobrevivência, adaptabilidade e domínio de novos territórios.

Embora os efeitos do ambiente materno sejam cada vez mais reconhecidos como uma fonte importante de variação fenotípica com impactos relevantes em processos evolutivos, estudos ainda se fazem necessários, a exemplo dos que objetivam avaliar o efeito dos ambientes maternos na identificação de QTLs, já que sabe-se que o ambiente materno influencia importantes características das plantas e das sementes.

2.2.3.2 Germinação de sementes

2.2.3.2.1 Atributos do processo de germinação

A germinação da semente é a primeira decisão adaptativa no desenvolvimento de muitas plantas terrestres (PENFIELD; KING, 2009). A conclusão da germinação é definida como a protrusão da radícula através do endosperma e do revestimento da semente, e o sucesso da germinação é determinada pelo equilíbrio entre duas forças opostas. Durante a embebição o eixo embrionário alonga-se e rompe através da testa e do endosperma (BEWLEY et al., 2013).

A capacidade germinativa das sementes é um atributo qualitativo do processo de germinação, geralmente convertido em um atributo quantitativo (comumente percentual). Isso retrata o potencial de germinação geral das espécies com base numa resposta binária: germinada ou não germinada. Independentemente da germinabilidade no tempo ou no final das observações, deve ser claro que a sua importância, significado e método de cálculo são um consenso entre os pesquisadores (RANAL; SANTANA, 2006).

Embora a germinação final (G_{max}) seja um fator importante para estimar o rendimento esperado de plântulas de um lote de sementes, esta pode ser parcialmente independente de outras características importantes de germinação, como: Início da germinação [t_{10}^{-1} ; Tempo recíproco para a germinação de 10% das sementes viáveis (h^{-1})], Taxa de germinação [t_{50}^{-1} ; Tempo recíproco para a germinação de 50% das sementes viáveis (h^{-1})], Área sob a curva de germinação [AUC; Integração da curva ajustada entre $t = 0$ e um ponto final definido pelo usuário

(x)] e Uniformidade [U_{8416}^{-1} ; Intervalo recíproco de tempo entre a germinação de 16 e 84% das sementes viáveis (h^{-1})].

A quantificação das respostas de germinação foi simplificada, pois tanto a taxa quanto a porcentagem poderiam ser incorporadas na AUC. A análise da germinação foi enriquecida pela interação dos valores de início/taxa de germinação e AUC além da germinação final, medindo, assim, diferentes aspectos do processo de germinação (EL-KASSABY, 1991). Portanto, analisar diferentes aspectos da curva de germinação cumulativa é um importante atributo fenotípico de um lote de sementes e é importante em relação às consequências da diversidade genética para a qualidade da semente (KAZMI, 2013).

2.2.3.2.2 Condições de germinação

As plantas necessariamente estarão no ambiente em que a semente foi dispersa. Por esta razão, elas evoluíram para viver onde são frequentemente expostas a diferentes fatores de estresse em combinação. Assim, para sobreviver em ambientes diversos e capacitar a produção, as plantas desenvolveram mecanismos específicos que lhes permitem detectar mudanças ambientais e responder às diferentes condições de estresse, minimizando os danos e conservando recursos valiosos para o crescimento e a reprodução; o que resulta em considerável variação genética, que é um formidável recurso para explorar os mecanismos de adaptação (ATKINSON; URWIN, 2012; KHAN, 2013).

No passado, o melhoramento de plantas centrou-se principalmente na produção e na resistência de doenças. Atualmente tornou-se essencial produzir sementes que germinem rápido e uniformemente, além de estabelecer plântulas vigorosas sob vários ambientes (KHAN, 2013).

O estresse abiótico, como temperaturas extremas, baixa disponibilidade de água, altos níveis de sal e deficiência e toxicidade de mineral, são frequentemente encontrados por plantas tanto em sistemas naturais quanto agrícolas. Esses estresses estão se tornando cada vez mais importantes devido à diminuição da disponibilidade de água de qualidade, degradação da terra e pressão das comunidades para afastar-se da intervenção química na agricultura (LANGRIDGE; PALTRIDGE; FINCHER, 2006).

A qualidade de semente é afetada por várias condições ambientais durante o desenvolvimento das sementes, bem como pelos subseqüentes métodos de colheita, manuseio e armazenamento. Todos esses fatores interagem com a composição genética da semente (KOORNNEEF; BENTSINK; HILHORST, 2002).

As respostas das plantas a diferentes estresses são altamente complexas e envolvem mudanças nos níveis transcriptômico, celular e fisiológico. Evidências recentes mostram que as plantas respondem a vários estresses de forma diferente aos estresses individuais, ativando um programa específico de expressão gênica relacionado às exatas condições ambientais encontradas. Em vez de ser aditivo, a presença de um estresse abiótico pode ter o efeito de reduzir ou aumentar a susceptibilidade a um estresse biótico, como uma praga ou patógeno e vice-versa (ATKINSON; URWIN, 2012).

Correlações genéticas significativas entre as respostas de germinação sob diferentes condições de estresse indicam que genes semelhantes ou idênticos podem contribuir para a resposta de germinação (FOOLAD et al., 2003; FOOLAD; SUBBIAH; ZHANG, 2007). Assim, a seleção para a germinação rápida em uma condição de estresse resultaria em progênie com germinação de sementes melhorada em uma ampla gama de condições ambientais (FOOLAD, 2003).

O crescimento produtivo e sustentável da safra necessita de cultivo de plantas em ambientes subótimos, com menor contribuição de recursos essenciais. Assim, explorar a variação fenotípica entre indivíduos, de espécies iguais ou diferentes, pode melhorar a compreensão de como as espécies se adaptam ao seu ambiente e quão extensas são as diferenças individuais devidas aos efeitos ambientais, aos efeitos genéticos ou a ambos (SLATE, 2005).

A variação natural entre espécies de culturas pode ser usada para cruzar características desejadas de parentes silvestres e, para o tomateiro, a tolerância extensiva ao estresse abiótico foi identificada em cultivares tradicionais e espécies selvagens relacionadas. No entanto, há relativamente pouco conhecimento sobre as bases moleculares da tolerância ao estresse abiótico em espécies de tomateiro e ainda há amplo espaço para melhorias (KHAN, 2013).

Embora o tomateiro cultivado seja amplamente adaptado a diversos climas, seu crescimento e desenvolvimento é bastante sensível a diferentes estresses ambientais como salinidade, seca, umidade excessiva, temperaturas extremas, toxicidade e deficiência mineral e poluição ambiental (FOOLAD, 2007).

Estes estresses podem atrasar o início, taxa e uniformidade de germinação. Assim, se faz necessário incluir os vários aspectos cumulativos da germinação para quantificar as diferentes características de qualidade de semente sob várias condições (SAEEDIPOUR, 2013).

No entanto, o impacto do ambiente depende em grande medida da interação entre a composição genética da planta e do ambiente e acredita-se que a resposta da planta ao estresse ambiental é controlada por muitos genes. Existe variação genética substancial para estresse abiótico no tomateiro cultivado (*S. lycopersicum*), bem como nas espécies selvagens relacionadas, como em *S. habrochaitis*, *S. pimpinellifolium* e *S. pennellii*. Em um estudo de avaliação de germoplasma, espécies de tomate selvagem foram identificadas com a habilidade de germinar rapidamente sob estresse abiótico, oferecendo recursos genéticos para tolerância ao frio, salinidade e ao estresse hídrico em relação à qualidade das sementes; já a maioria das cultivares comerciais são sensíveis ao estresse ambiental durante a germinação das sementes e crescimento precoce das plântulas (FOOLAD et al., 2003).

De acordo com Foolad, Subbiah e Zhang (2007), a semente da espécie selvagem germinou significativamente mais rapidamente do que a semente da linhagem melhorada em condições de não-estresse, bem como em condições de frio, salinidade e seca. Isto pode ser justificado pelo fato do germoplasma de espécie selvagem ser uma fonte rica de variabilidade genética desejável e muitas delas têm sido identificadas com maior tolerância ao estresse abiótico.

Como a investigação da base genética da variabilidade da germinação de sementes ainda permanece aberta, devido à falta de estudos integrativos em uma escala populacional; existe a necessidade de determiná-la sob diferentes condições ambientais. Em particular, é fundamental saber se os mesmos ou diferentes loci estão contribuindo para a germinação de semente sob estresse ambiental; dado que o desempenho da cultura é o resultado final da ação de milhares de genes e sua interação com o ambiente (KHAN, 2013).

Este mesmo autor já conduziu estudo com sementes de tomate germinadas sob condições de estresse controlado e variável e detectou QTLs para qualidade de semente. Porém, como se sabe que o ambiente tem influência na qualidade de sementes, e não só o ambiente no momento da germinação, novos estudos se fazem necessários com o intuito de avaliar outras fontes de variação

ambiental, a exemplo do ambiente materno onde as plantas são conduzidas, ou até mesmo ambas fontes de variação ambiental, objetivando avaliar o efeito deste(s) na identificação de QTL(s) relacionado a características de qualidade de semente.

2.2.3.3 Tamanho e massa de semente

O tamanho de semente é determinante da aptidão evolutiva nas plantas e é também uma importante característica agrônômica na domesticação das culturas com respeito à ecologia e à agricultura; sendo um componente fundamental da qualidade de semente (GEGAS et al., 2010; LI, LI, 2015). Embora, o tamanho e/ou massa de semente seja benéfico para o estabelecimento de plântulas e características relacionadas ao vigor, parece não haver associação consistente entre a massa de semente e o seu desempenho na germinação (KHAN et al., 2012).

O controle do tamanho de semente envolve interações complexas entre o embrião zigótico e o endosperma, o revestimento da semente de procedência maternal e a planta mãe. Entre as Angiospermas, há um alto grau de variação no tamanho de embrião/endosperma em sementes maduras (SCHRUFF et al., 2006; FANG et al., 2012; XIA et al., 2013). Conforme relatado por Nagasawa et al. (2013), há duas questões fundamentais, na biologia vegetal, que ainda permanecem sem resposta: (1) Existe uma interação não-celular autônoma nas plantas para determinar o tamanho do embrião e do endosperma? e, (2) Quais são os genes que controlam o equilíbrio desses tecidos no desenvolvimento de sementes?

A maioria das culturas domesticadas muitas vezes produzem sementes significativamente maiores do que seus antepassados selvagens. Esta alteração no tamanho/massa de semente foi provavelmente em resposta à pressão de seleção para o rendimento, uniformidade de germinação e vigor das plântulas que foi exercido pelos seres humanos durante a domesticação (DOGANLAR; FRARY; TANKSLEY, 2000).

No tomateiro, o aumento no tamanho de semente pode ser devido à seleção indireta do tamanho do fruto, já que há correlação positiva entre ambas características (GOLDMAN, PARAN, ZAMIR, 1995; GRANDILLO; TANKSLEY, 1996). Como relatado por Orsi e Tanksley (2009), o tamanho ou massa de semente

pode ser afetado pelo genótipo de três tecidos de sementes de tomate: a testa materna, o endosperma triplóide e o embrião diplóide.

A variação interespecífica do tamanho de semente tem sido associada a diferentes características de habitat como uma importância na adaptação (GERITZ; MEIJDEN; METZ, 1999). Entretanto, como apontado por Silvertown (1989), a adaptabilidade do tamanho de semente é um exemplo das dificuldades gerais à interpretação evolutiva de um caráter considerado isoladamente do resto.

O tamanho de semente é frequentemente herdado quantitativamente e a grande variação desta característica pode ser observada não apenas entre táxons, mas também dentro do táxon. (WESTOBY; JURADO; LEISHMAN, 1992, ORSI; TANKSLEY, 2009). Essa variação é explicada por *trade-offs* entre fecundidade e qualidade, para os quais uma solução é a dependência ambiental. Entender a base genética do tamanho e do número de sementes, bem como quaisquer restrições genéticas que impedem a maximização de ambos, é crucial tanto a partir de uma perspectiva evolutiva como aplicada (GNAN; PRIEST; KOVER, 2014).

O gênero *Solanum* contém um conjunto de nove espécies compatíveis, relacionadas com o tomateiro. Apesar de suas estreitas afinidades taxonômicas, há uma variação de 10 vezes no tamanho de semente, sugerindo uma rápida taxa de mudança evolutiva. Há tipicamente pelo menos uma variação de 105 vezes da massa de semente entre as espécies dentro de uma única área. Estudos enfatizaram que o tamanho de semente varia significativamente dentro da mesma espécie, e entre diferentes populações e diferentes plantas mãe e mesmo entre diferentes sementes da mesma planta (WESTOBY; JURADO; LEISHMAN, 1992; WESTOBY et al., 1996; DOGANLAR; FRARY; TANKSLEY, 2000; ORSI; TANKSLEY, 2009).

O porquê do tamanho de semente ter aumentado durante a domesticação em culturas não consumidas pelas suas sementes é desconhecida. Vários estudos sugerem que as sementes grandes acumulam substâncias nutritivas suficientes, de modo que normalmente têm melhor adaptabilidade durante a germinação, devido a uma maior oferta de nutrientes, e suas plântulas serem capazes de tolerar condições ambientais adversas durante o estabelecimento, mostrando taxas de sobrevivência competitivas, crescimento e biomassa. No

entanto, considera-se que as plantas de semente pequena são consideradas como tendo eficiência na dispersão, superior capacidade de colonização e maior probabilidade de escapar da predação, porque produzem um grande número de sementes (WESTOBY et al., 2002; GÓMEZ, 2004; MOLES; WESTOBY, 2004; MOLES et al., 2005).

De acordo com Li, Thomson e McCouch (2004), a semente pequena normalmente é favorecida pela seleção natural, porque é comumente associada a um grande número de sementes por planta, maturidade mais rápida e distribuição geográfica mais ampla. Frequentemente, as correlações negativas são encontradas entre tamanho e número de semente. Em consequência, as teorias ecológicas e fisiológicas assumiram que isso se deve aos recursos limitados da planta mãe (VENABLE, 1992). Quanto à agricultura, o aumento do tamanho de semente é um contribuinte crucial para o aumento do rendimento das plantas cultivadas durante a domesticação (SHOMURA et al., 2008).

Nos últimos anos, os mecanismos genéticos e moleculares do desenvolvimento e do tamanho de semente começaram a ser elucidados. Progressos tem ocorrido no domínio do controle do tamanho de semente, sendo que vias genéticas já foram identificadas para regular esta característica em plantas. No entanto, essas vias genéticas estão cheias de lacunas e pouco se sabe sobre as relações entre elas. Ainda não está claro como os tecidos maternos e os tecidos zigóticos controlam de forma coordenada o tamanho de semente em plantas (LI; LI, 2015).

Assim, a pesquisa está enfrentando desafios para entender completamente os mecanismos reguladores do tamanho de semente. Um dos maiores desafios no futuro é construir estruturas genéticas para o controle desta característica e definir os mecanismos moleculares dos fatores conhecidos no seu controle (LI; LI, 2015).

2.2.3.3.1 Hipóteses e fatores genéticos para o tamanho de semente

Na agricultura, o tamanho de semente é um dos componentes mais importantes do rendimento e propuseram hipóteses adaptativas e não adaptativas para explicar essa variação. Isto pode ser o resultado de uma evolução adaptativa admitindo que ela fornece benefícios diretos de aptidão para o pai, de modo que a

seleção favorece os que produzem tamanhos múltiplos. Produzir descendentes de diferentes tamanhos pode ser vantajoso se a prole variar em qualidade genética e obter provisões diferenciadas; assumindo que os efeitos do tamanho de semente sobre a distância de dispersão, dormência ou tempo de germinação reduzem a competição entre irmãos ou se o tamanho ideal da semente varia ao longo do tempo ou do espaço (GÓMEZ, 2004; HALPERN, 2005; XIA et al., 2013).

A evolução do tamanho de sementes envolve muitos fatores seletivos, incluindo a história de vida, os predadores de sementes e as estratégias de dispersão e de estabelecimento de plântulas (por exemplo, dormência × germinação imediata) (FLEMING; KRESS, 2013). Sabe-se que o ambiente materno também pode influenciar o tamanho, mas poucos estudos examinaram a correlação entre ambientes maternos e descendentes, ou o valor adaptativo de produzir diferentes tamanhos de sementes em ambientes contrastantes (HALPERN, 2005).

Por outro lado, a variação no tamanho de semente pode ser não-adaptativa (HALPERN, 2005). Alguns autores consideram que a variação se deve a fatores genéticos com efeitos diretos ou indiretos no tamanho, como a captação de recursos, os determinantes do histórico de vida e/ou a variação não genética. Uma compreensão da variação natural no tamanho de semente requer, portanto, a consideração simultânea das estratégias de variação genética e estratégias de história de vida. É importante determinar a existência e o mecanismo por trás dos *trade-offs*, já que os ambientalmente causados podem ser modificados por seleção ou manipulação genética (GNAN; PRIEST; KOVER, 2014).

Apesar do significado evolutivo e agrônômico do tamanho e/ou massa de semente, sabe-se relativamente pouco sobre os processos genéticos e moleculares subjacentes à variação natural e se o tamanho reflete a atividade do gene local ou as alterações fisiológicas globais (ADAMSKI et al., 2009).

Estudos identificaram fatores que agem materna ou zigoticamente para regular o tamanho de semente (LI; LI, 2015). No entanto, nenhum dos genes nesta via foram isolados de qualquer espécie vegetal, embora Orsi e Tanksley (2009) clonaram o QTL *Sw4.1* para a massa de semente, mas ainda não identificaram o gene causal. Esses mesmos autores, em estudo com tomateiro utilizando análise genética, associaram a causa de um QTL de massa de semente com um gene transportador ABC.

No tomateiro, o mapeamento de QTL para tamanho e massa de semente tem sido conduzido, e esses estudos, envolvendo cruzamentos entre cultivares de tomate e seus antepassados selvagens, identificaram alguns QTLs relacionados a essas características (ORSI; TANKSLEY, 2009; KHAN, 2013). No entanto, é necessário desenvolver pesquisas para identificar e clonar o gene causal para o tamanho e a massa de semente. Por tanto, estudos voltados à área da tecnologia genômica tem se intensificado e ferramentas genômicas têm sido cada vez mais utilizadas quando o assunto é identificar QTL(s)/gene(s) reponsáveis por características ligadas a qualidade de semente, tendo em vista diferentes fatores serem capaz de influenciar os resultados.

2.3 TECNOLOGIA GENÔMICA

A qualidade de semente é um característica complexa, sendo o resultado de uma variedade de processos de desenvolvimento. A dissecção genética-molecular destes processos e a sua relação com os fenótipos permitem a identificação dos genes reguladores e vias de sinalização envolvidas e, assim, proporcionar os meios para prever e melhorar a qualidade de semente (LIGTERINK; JOOSEN; HILHORST, 2012).

Nas últimas décadas, a tecnologia genômica avançou na criação de técnicas e estratégias para entender o nível molecular da função da planta e, claro, o tamanho de semente (HAMILTON; BUELL, 2012). As avaliações mutagêneses têm sido bem sucedidas para identificar os reguladores desta característica. O uso de novas tecnologias de edição de genoma irá facilitar a análise funcional de genes redundantes envolvidos no controle do tamanho de semente (GAJ; GERSBACH; BARBAS, 2013; LI; LI, 2015).

O mapeamento de QTL e os estudos de associação pangênômico (GWAS) são abordagens promissoras para identificar novos reguladores do tamanho de semente. Como conjuntos de dados estão sendo gerados pela biotecnologia moderna, abordagens de biologia de sistemas, como a análise de transcriptomas, proteomas e metabolomas devem ajudar a acelerar a compreensão das funções moleculares dos reguladores de tamanho de semente. Assim, a compreensão da base genética e molecular dos *trade-off* do tamanho/número de semente ajudará os

melhoristas a utilizar alelos benéficos de genes para melhorar o rendimento da cultura (LI; LI, 2015).

2.3.1 Análise de Loci de Características Quantitativas (QTLs)

Com o advento de marcadores moleculares e o desenvolvimento de procedimentos de mapeamento de QTL, as análises genéticas e correlativas de características quantitativas tornaram-se viáveis. QTL é uma região do genoma que contém uma diferença alélica que causa uma alteração no fenótipo (LORENZ; COHEN, 2012); em outras palavras, os QTLs representam as regiões genômicas contendo um locus ou vários loci intimamente ligados, e eles contribuem para a variância total da característica (KHAN, 2013).

A variação genética de muitas características já foram atribuídas à ação conjunta de muitos genes (QTLs), os quais podem ser mapeados no genoma através de marcadores genéticos (CAUSSE et al., 2002). Um dos desafios na biologia é entender a base genética da variação para as características quantitativas. Assim, houve um aumento considerável em tecnologias de marcadores moleculares e métodos estatísticos específicos, que tem estabelecido a posição do mapa e os efeitos de QTL (MACKAY; STONE; AYROLES, 2009).

A revolução genômica permite incorporar a variação genética na abundância de transcritos e outros fenótipos moleculares intermediários em uma estrutura de mapeamento de QTL. Esta abordagem genética de sistemas permite entender a biologia que está entre o genótipo e o fenótipo de redes causais de genes interagentes (MACKAY; STONE; AYROLES, 2009).

Para identificar os genes subjacentes de QTLs em plantas, a análise de ligação e o mapeamento de associação são abordagens utilizadas. A análise de ligação é um método tradicional baseado em populações de progênies derivadas de cruzamentos biparentais. O objetivo é detectar intervalos contendo os loci pelo teste de progênie de plantas recombinantes selecionadas a partir de populações de progênies. A vantagem da análise de ligação está em utilizar um menor número de marcadores para o mapeamento de QTL, porém tem menor poder de resolução, o comprimento do intervalo detectado contendo o locus é muitas vezes grande demais em pequenas populações segregantes, porque apenas um número limitado de eventos de recombinação ocorre devido ao limitado número de gerações

(MAURICIO, 2001; DOERGE, 2002; MACKAY; STONE; AYROLES, 2009). As análises de QTL nem sempre são reproduzíveis em diferentes estudos na população. Além disso, a análise é baseada na variação genotípica e fenotípica entre apenas dois parentais e, portanto, outros alelos funcionais em uma espécie podem não ser detectados por esta abordagem (HOLLAND, 2007).

Coerente com a proposição de que as características de vigor de sementes e de plântulas têm uma base genética complexa, que provavelmente são controladas por vários genes e são, portanto, adequadas para a análise de QTL; os estudos de QTL sobre a qualidade de semente geralmente revelaram a influência de numerosos QTLs de pequeno a grande efeito fenotípico. O mapeamento de características quantitativas de qualidade de semente em *Helianthus annuus* L., *A. thaliana*, *Phaseolus vulgaris* L., *S. lycopersicum*, *Glycine soja* (L.) Merrill, *Brassica napus* L. e *Zea mays* L. revelou numerosos QTLs (EBRAHIMI et al., 2008; BENTSINK et al., 2010; PEREZ-VEGA et al., 2010; JOOSEN et al., 2012; KHAN et al., 2012; WANG et al., 2014; BASNET et al., 2015; WANG et al., 2016; ZHAO et al., 2016).

Para assumir os desafios manifestados na descoberta dos polimorfismos causais para QTLs, ferramentas genômicas também estão disponíveis para *S. lycopersicum* e estes oferecem oportunidades promissoras para desvendar os mecanismos de rede subjacentes às características quantitativas complexas. A partir da literatura é sabido que os genes que regulam o tamanho de semente podem ser descobertos pela análise de QTL para identificar os genes implícitos à variação natural nesta característica entre diferentes acessos (HERRIDGE et al., 2011). Desta forma, estudos de mapeamento genômico têm identificado QTLs para tamanho/massa de sementes em espécies de culturas e os genes que regem essas características foram clonados em plantas como *Arabidopsis* e arroz através da análise de mutante e clonagem baseado em mapa (TENG et al., 2009; FAN et al., 2010; RAMYA et al., 2010; TSILO et al., 2010; SUN; SHANTHARAJ; KANG, 2010; XING; ZHANG, 2010; LI et al., 2011; ZHANG et al., 2011; JOOSEN et al., 2012).

Estudos de QTL realizados em populações de cruzamentos interespecíficos entre tomateiro cultivado e seus parentes silvestres permitiram a identificação de loci controlando a qualidade de semente, incluindo entre outras características, o tamanho e a massa de semente (ORSI; TANKSLEY, 2009; KAZMI et al., 2012; KHAN et al., 2012; KHAN, 2013). Logo, os genes que regulam o

tamanho de semente podem ser identificados pela análise de QTL para identificar os subjacentes a variação natural nesta característica entre diferentes acessos (HERRIDGE et al., 2011). Há um crescente interesse no estudo da variação entre os acessos de tomateiro, tendo em vista que esses estudos têm explorado a variação natural para responder a uma série de questões relacionadas com a base molecular de características quantitativas nesta espécie (FOOLAD; SUBBIAH; ZHANG, 2007; SALINAS et al., 2013).

O mapeamento de QTL com mapas de ligação baseados em polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) fornece uma avaliação da arquitetura genética do genoma do tomateiro: dos efeitos de QTL, interações QTL x ambiente e pleiotropia putativa. Esta abordagem ajuda na melhoria simultânea das características de sementes e no progresso da identificação dos genes que controlam a qualidade e o desempenho de sementes (KHAN, 2013).

2.3.2 Análises e Métodos pós-QTL

A genética quantitativa teve um renascimento na última década e ganhou aceitação geral como uma ferramenta para descrever a variação genética de caracteres fenotípicos em populações naturais e para prever sua resposta à seleção. Foram realizados estudos de análise de características quantitativas em diferentes espécies, como *Arabidopsis*, arroz, tomate, entre outras, que produziram uma lista de regiões genômicas que regem uma série de características fenotípicas. Muitos destes QTLs foram clonados e alguns dos genes causais foram identificados. As adições recentes à identificação de vários QTLs de qualidade de semente e de plântula em tomateiro e *Arabidopsis* aumentaram a procura para a dissecção genética-molecular destas características (SWEENEY; MCCOUCH, 2007; JOOSEN et al., 2012; KAZMI et al., 2012; KHAN et al., 2012; RAJJOU et al., 2012).

Com o reconhecimento de que a expressão da maioria dos caracteres seja influenciada por múltiplos genes e fatores ambientais, a genética quantitativa tornou-se o paradigma para a análise da variação fenotípica e da evolução. Assim, a análise de características quantitativas é uma abordagem comum para a quantificação de características complexas em uma população derivada de um cruzamento entre genótipos distintos. Em tal análise, os marcadores genéticos

estão associados com a variação fenotípica e são definidos como QTLs (LIU, 1997; LYNCH; WALSH, 1998).

Vários recursos e ferramentas genômicas, como os marcadores moleculares, tornaram-se disponíveis, o que permite o mapeamento de QTL e clonagem dos genes correspondentes que governam o fenótipo em diferentes genótipos (BOREVITZ; CHORY, 2004); revelando os *hotspots* no mapa genético contendo um locus, ou vários loci estreitamente ligados, e sua contribuição para a variância total da característica (KHAN, 2013).

Marcadores moleculares, sequências genômicas, *microarrays* e coleções de desativação gênica (*knock-out*) estão sendo usados para mapeamento de QTL, facilitando o uso da variação natural para a descoberta de genes (BOREVITZ; CHORY, 2004). O mapeamento refinado (*Fine-mapping*) é geralmente uma etapa de acompanhamento detalhado e caracterização abrangente de loci individuais. No entanto, antes do mapeamento refinado, a confirmação e validação dos QTLs identificados é essencial, sendo aplicada num programa de melhoramento (KHAN, 2013).

Embora tenha ocorrido avanço considerável no mapeamento refinado e na clonagem de genes subjacentes à QTLs e na redução de alguns deles para Nucleotídeos de Característica Quantitativo (QTNs), decifrar a base genética da variação natural em características quantitativas ainda é uma tarefa desafiadora porque a variação é muitas vezes contínua. Além disso, há extensas interações genótipo \times ambiente ($G \times A$), o que também tem contribuído para esta variação. Devido aos grandes intervalos genéticos produzidos, bem como QTLs com grandes efeitos, estes podem ser fragmentados em QTLs múltiplos, explicando apenas uma pequena proporção da variância total. Isso torna uma tarefa formidável para determinar os genes causais (CAUSSE et al., 2002; WU; LIN, 2006, RON; WELLER, 2007, BALASUBRAMANIAN et al., 2009). Ademais, os efeitos fenotípicos de QTLs individuais são complexos pela variabilidade resultante da segregação de outros loci que influenciam a mesma característica (LOUDET et al., 2005).

A identificação de variantes de sequência causal exige a confirmação de QTL e sua caracterização molecular (BALASUBRAMANIAN et al., 2009), já a caracterização molecular da variação alélica requer que os respectivos genes sejam clonados. A fim de delinear os intervalos de QTL para a identificação de genes causais, é necessário incorporar análise pangenômica adicional, que está

cada vez mais acessível. Para identificar a posição exata e caracterizar QTL, métodos e experimentos adicionais são essenciais (GLAZIER; NADEAU; AITMAN, 2002).

O uso das denominadas "populações de mapeamento imortal", consistindo de Linhagens Endogâmicas Recombinantes (RILs) homozigóticas, é também uma ferramenta para uso na análise de QTL e desempenha um papel fundamental na obtenção de valores de características sob diferentes condições ambientais. Este tipo de população é obtida pelo método SSD (*Single Seed Descent* ou Descendente de uma Única Semente) de plantas F_2 até F_6 ou mais gerações, até as RILs se tornarem predominantemente homozigóticas. Estas são importantes, uma vez que permitem a realização de repetições e múltiplas análises da mesma população e, portanto, um grande número de características podem ser mapeadas (KOORNNEEF; ALONSO-BLANCO; VREUGDENHIL, 2004).

Além disso, uma população de RIL é mais eficiente do que a população F_2 , por exemplo, dos mesmos parentais, já que menos indivíduos são necessários para detectar ligação de mesma magnitude entre marcadores e QTL (BURR; BURR, 1991). Segundo estudo conduzido por Capel et al. (2015), foi relatado que as análises genéticas enfatizam a importância do desenvolvimento e caracterização de populações de RIL geradas a partir de espécies silvestres como uma fonte genética e de variabilidade fenotípica.

Assim, os resultados de estudos quantitativos levam à descoberta de que alguns loci controlam mais de uma característica e a co-localização de QTLs fornecem uma pista para os caminhos envolvidos em características complexas. A variação natural suficiente e a natureza complexa das características de qualidade de semente e de plântula tornam-as características adequadas para decifrar com uma abordagem de QTL (KAZMI, 2013).

O mapeamento de alta precisão que leva ao mapeamento refinado e clonagem de gene(s) responsáveis pela variação de características complexas, geralmente, requer a confirmação e validação de QTLs em diferentes populações; podendo ser obtido pelo desenvolvimento de Linhagens Quase Isogênicas (NILs). As NILs que diferem apenas para marcadores flanqueando um QTL específico é uma das soluções para reduzir a posição do mapa de um QTL, facilitar a confirmação de QTLs e, finalmente, a identificação de genes subjacentes às

características complexas (KAEPLER; PHILLIPS; KIM, 1993; BALASUBRAMANIAN et al., 2009; KOOKE; WIJNKER; KEURENTJES, 2012).

Com a ajuda desta abordagem, pode-se identificar uma pequena região do genoma que é associada a uma característica quantitativa e definir precisamente a posição do mapa para o QTL. As NILs então serão usadas para adquirir uma compreensão das magnitudes das interações QTL x Ambiente, QTL x Genética e QTL x QTL, bem como o mapeamento refinado de QTLs, eliminar os efeitos indesejáveis causados pelo arrasto de ligação e, eventualmente, realizar a clonagem posicional dos genes causais para os QTLs. Assim, as NILs servem para muitas funções, que vão do auxílio em fins de melhoramento até a dissecação genética de características quantitativas complexas (KHAN, 2013).

A análise de NIL permite a identificação de QTLs em intervalos genômicos menores, uma vez que diferem em relação às regiões sobrepostas do genoma indicadas por análises de QTL (TUINSTRA; EJETA; GOLDSBROUGH, 1997). À vista disso, fornecerá um recurso para o mapeamento de QTL de alta precisão, servindo como material de partida para mapeamento refinado e clonagem de gene(s) responsáveis pela variação de características complexas (FRIDMAN; PLEBAN; ZAMIR, 2000).

As NILs apresentam um recurso genético comum no qual a comparação direta de duas linhagens pode ser usada para avaliar o fenótipo condicionado por um QTL (TOUZET; WINKLER; HELENTJARIS, 1995; TANKSLEY; NELSON, 1996). Apesar do sucesso das NILs em estreitar os intervalos de QTL, esta área da pesquisa tem sido limitada pelo custo, pelo tempo e pelo esforço substancial requerido para desenvolver os materiais genéticos apropriados (TUINSTRA; EJETA; GOLDSBROUGH, 1997).

Esforços consideráveis foram feitos para resolver os problemas associados ao desenvolvimento de NILs que diferem em QTLs individuais. A seleção assistida por marcadores sobre uma ou duas gerações adicionais em populações de retrocruzamento avançado (AB-QTL) para QTLs identificados, pode levar as NILs contrastantes nos QTLs específicos (TANKSLEY; NELSON, 1996). Assim, uma combinação de um experimento de mapeamento de QTL com estudos subsequentes para confirmar e avaliar QTLs específicos em NILs pode resultar em intervalos menores de QTL (TANKSLEY et al., 1996).

As NILs podem ser construídas, dependendo dos recursos disponíveis, por: Retrocruzamentos Avançados (BCs), RILs, Duplo Haplóides (DHs), Famílias Endogâmicas Heterogêneas (HIFs) ou outras populações mapeadas. No entanto, o ponto de partida é um cruzamento entre dois genótipos que segregam em gerações subsequentes, sendo necessário de um a vários ciclos de retrocruzamento e/ou autofecundação para recuperar a composição genômica desejada. Embora desenvolvido a partir de progênies heterogêneas de cruzamentos selecionados, as NILs são preferencialmente homozigóticas (KOOKE; WIJNKER; KEURENTJES, 2012).

As NILs contrastando nos QTLs de interesse podem ser desenvolvidas por seleção dentro de HIFs, um tipo de NIL. As HIFs são linhagens derivadas de RILs que são geneticamente semelhantes, mas não atingiram homozigose e têm heterozigosidade residual abrangendo o locus de interesse, segregando na região do QTL de interesse. Como as HIFs são misturas de duas linhagens parentais distintas, isto proporciona a seleção de mais de uma HIF com a opção de validar o mesmo locus em progenitores genéticos distintos (TUINSTRÁ; EJETA; GOLDSBROUGH, 1997).

Cada RIL é então autopolinizada e genotipada de modo que cada genótipo homozigoto no local de interesse pode ser identificado e estudado. As HIFs não devem ser comparados com o genótipo parental de referência, mas com outra dentro dos descendentes da RIL escolhida. Uma vez que as HIFs são originárias de uma população de RIL, a base genética das HIFs é uma mistura dos dois parentais da população de RIL, ao contrário das NILs "convencionais". Os marcadores moleculares podem ser utilizados para rastrear uma população de HIFs derivados de diferentes endogamias para identificar famílias que segregam para uma região genômica específica, na qual um QTL foi detectado (TUINSTRÁ; EJETA; GOLDSBROUGH, 1997).

As famílias que segregam para uma região genômica específica que abrigam o QTL são identificadas e uma série de NILs que contrastam para esta região genômica específica pode ser desenvolvida. Este conceito de HIF é viável, eficaz e menos demorado quando comparado com uma estratégia de NIL "convencional", porque não há necessidade de desenvolver primeiro as NILs, o que normalmente é laborioso e requer várias gerações de retrocruzamento e seleção assistida por marcador (SAM) (KHAN, 2013).

O uso de NILs e/ou HIFs permite a validação/confirmação da presença e o efeito de um QTL. Uma vantagem adicional de HIFs é a sua composição genômica que, embora homocigótica, é uma mistura das duas linhagens parentais distintas em comparação com NILs que têm uma base genética constituído por apenas um genótipo (LOUDET et al., 2005). Para localizar a posição genômica de um QTL, as linhagens com eventos recombinantes na região do QTL podem ser fenotipadas. As linhagens que revelam a influência esperada de acordo com a detecção/validação do QTL devem carregar o gene responsável pelo efeito do QTL (KHAN, 2013).

Um subconjunto de RILs com heterozigosidade residual pode ser usado para desenvolver famílias de HIFs para delinear o intervalo de QTLs e permitir a validação e, portanto, o mapeamento refinado. Esta estratégia é utilizada com sucesso para o mapeamento refinado, em que linhagens com eventos de recombinação sobrepostos na região do QTL são fenotipadas e a correlação entre o fenótipo e o genótipo assim, estreita a região de interesse para o gene subjacente (KHAN, 2013). A análise de transcriptoma pode ser utilizada em paralelo com uma abordagem de mapeamento refinado para identificar genes expressos diferencialmente na região de interesse como possíveis genes candidatos para um QTL (KAZMI, 2013).

Os estudos de acompanhamento possibilitam o mapeamento integrativo das vias; desta forma são identificadas classes particulares de genes que contribuem para a compreensão da natureza complexa da qualidade de semente. A integração de múltiplas camadas de informação biológica do DNA ao fenótipo para o ambiente criará modelos ao nível do sistema de qualidade de semente (KAZMI, 2013).

2.3.3 Genes Relacionados ao Tamanho de Semente

Genes de tamanho de semente foram isolados de espécies vegetais, como *Arabidopsis* e arroz (LUO et al., 2005; GARCIA; FITZ GERALD; BERGER, 2005; SCHRUFF et al., 2006; FAN et al., 2006; LI et al., 2008), proporcionando a compreensão dos mecanismos genéticos e moleculares que regulam estas características (MAO et al., 2010). Os mecanismos moleculares do desenvolvimento da semente têm sido estudados, e alguns genes já foram identificados. Estes

incluem SHORT HYPOCOTYL UNDER BLUE1 (*SHB1*), HAIKU1 (*IKU1*), HAIKU2 (*IKU2*) e MINISEED3 (*MINI3*), que promovem o desenvolvimento do endosperma e do embrião e regulam positivamente o tamanho de semente em *Arabidopsis* (GARCIA et al., 2003; LUO et al., 2005; ZHOU et al., 2009; WANG et al., 2010).

IKU1, *IKU2* e *MINI3* atuam sucessivamente na mesma via que é requerida para expandir a cavidade da semente e para induzir o crescimento do endosperma na fase inicial do desenvolvimento da semente; em que codifica uma proteína - *VQ motif* (FXhVQChTG), um receptor quinase - proteínas ricas em leucina (LRR) e uma proteína da família WRKY - um fator de transcrição putativo que regula o crescimento do endosperma, respectivamente. A baixa regulação desses genes leva à celularização precoce do endosperma, reduzindo o crescimento do endosperma, a proliferação do embrião após o estágio inicial de torpedo e subsequentemente diminui o tamanho da semente na maturidade (GARCIA et al., 2003; LUO et al., 2005; ZHOU et al., 2009; WANG et al., 2010).

Em *Arabidopsis*, o pequeno tamanho de sementes dos mutantes *haiku* está correlacionado com o impedimento prematuro da celularização do endosperma sincicial; resultando da redução coordenada do tamanho do endosperma, da proliferação de embriões e do alongamento celular do tegumento derivado da mãe (GARCIA et al., 2003). Estes dados dão suporte à proposição de que o desenvolvimento do endosperma é determinante do tamanho da semente (WANG et al., 2010).

Tanto *MINI3* como *IKU2* mostram diminuição da expressão no mutante *iku1*. A expressão de *IKU2* é reduzida em presença de *mini3*, enquanto a expressão de *MINI3* foi inalterada em mutantes *iku2* (LUO et al., 2005). *IKU2* e *MINI3* são ambos regulados pelo *SHB1*, que se liga aos seus promotores para promover uma grande cavidade de semente e crescimento do endosperma na fase inicial do desenvolvimento da semente. Além disso, *SHB1* é um regulador positivo do desenvolvimento da semente e melhora a proliferação e expansão das células embrionárias através de uma via desconhecida, independente de *IKU2* (ZHOU et al., 2009).

A perda de função dos mutantes nesses genes formaram sementes pequenas. O tamanho pequeno dessas sementes nesses mutantes é determinado pelo genótipo de tecidos zigóticos em vez do genótipo de tecidos maternos, indicando que esses genes atuam zigoticamente para regular o crescimento da

semente (LI; LI, 2015). O controle genético do tamanho de semente por esses genes tem sido discutido em algumas revisões (SUNDARESAN, 2005; SUN; SHANTHARAJ; KANG, 2010; KESAVAN; SONG; SEO, 2013).

Em contraste, fatores que agem maternalmente para regular o tamanho de semente também foram descritos (JOFUKU et al., 2005; OHTO et al., 2005; LI et al., 2008; ADAMSKI et al., 2009; XIA et al., 2013). Nestes casos, o tamanho da semente é determinado pelo genótipo dos tecidos maternos. Os tegumentos maternos que rodeiam o óvulo formam o revestimento da semente após a fertilização, que proporciona a cavidade para o crescimento do embrião e do endosperma. O revestimento da semente foi proposto para estabelecer um limite ao seu tamanho final (ADAMSKI et al., 2009; FANG et al., 2012; XIA et al., 2013; DU et al., 2014).

Além disso, o mutante TRANSPARENT TESTA GLABRA2 (*ttg2*) mostra uma redução no alongamento das células do tegumento e é deficiente para a síntese de proantocianidina e deposição de mucilagem no revestimento da semente. Cruzamentos de *ttg2* com *iku2* resultam em maior redução no tamanho de semente do que em cada mutação individualmente, aumentando o abortamento (GARCIA; FITZ GERALD; BERGER, 2005). Com o avanço da tecnologia genômica, uma estrutura para juntar uma via genética para o controle do tamanho de semente foi proposta por Luo et al. (2005).

Apesar do progresso na área de tecnologia genômica, muitas interrogações ainda permeiam sobre o tema. Sabe-se que há diversos fatores isolados ou interligados e que não se conhece como agem ou interferem. Por conseguinte, perante a complexidade do assunto, estudos se fazem necessários para preencher as lacunas existentes.

2.4 REFERÊNCIAS

ADAMSKI, N. M.; ANASTASIOU, E.; ERIKSSON, S.; O'NEILL, C. M.; LENHARD, M. Local maternal control of seed size by *KLUH/CYP78A5*-dependent growth signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 47, p. 20115-20120, 2009.

AGUIAR, R. A. **Manejo do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum* L.) em tomateiro industrial**. 2011. 96 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Goiânia, 2011.

ALMEIDA, D. **Manual de Culturas Hortícolas**. 1. ed. Lisboa: Editorial Presença, 2006.

ALONSO-BLANCO, C.; AARTS, M. G. M.; BENTSINK L.; KEURENTJES J. J. B, REYMOND, M.; VREUGDENHIL, D.; KOORNNEEF, M. What has natural variation taught us about plant development, physiology, and adaptation? **The Plant Cell**, v. 21, n. 7, p. 1877-1896, 2009.

ALVARENGA, M. A. R. **Tomate: produção em campo, casa-de-vegetação e hidroponia**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2013.

ASHRAFI, H.; KINKADE, M.; FOOLAD, M. R. A new genetic linkage map of tomato based on a *Solanum lycopersicum* × *S. pimpinellifolium* RIL population displaying locations of candidate pathogen response genes. **Genome**, v. 52, n. 11, p. 935-956, 2009.

ATKINSON, N. J.; URWIN, P. E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 10, p. 3523-3543, 2012.

BALASUBRAMANIAN, S.; SCHWARTZ, C.; SINGH, A.; WARTHMAN, N.; KIM, M. C.; MALOOF, J. N.; LOUDET, O.; TRAINER, G. T.; DABI, T.; BOREVITZ, J. O. QTL mapping in new *Arabidopsis thaliana* advanced intercross-recombinant inbred lines. **PLoS One**, v. 4, n. 2, p. e4318, 2009.

BASNET, R. K.; DUWAL, A.; TIWARI, D. N.; XIAO, D.; MONAKHOS, S.; BUCHER, J.; VISSER, R. G. F.; GROOT, S. P. C.; BONNEMA, G.; MALIEPAARD, C. Quantitative Trait Locus Analysis of Seed Germination and Seedling Vigor in *Brassica rapa* Reveals QTL Hotspots and Epistatic Interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 1032, p. 1-15, 2015.

BENTSINK, L.; HANSON, J.; HANHART, C. J.; BLANKESTIJN-DE VRIES, H.; COLTRANE, C.; KEIZER, P.; EL-LITHY, M.; ALONSO-BLANCO, C.; DE ANDRES, M. T.; REYMOND, M.; VAN EEUWIJK, F.; SMEEKENS, S.; KOORNNEEF, M. Natural variation for seed dormancy in *Arabidopsis* is regulated by additive genetic and molecular pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 9, p. 4264-4269, 2010.

BERGER, F. Endosperm development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, n. 1, p. 28-32, 1999.

BERGER, F. Endosperm: the crossroad of seed development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 1, p. 42-50, 2003.

BERGER, F.; GRINI, P. E.; SCHNITTGER, A. Endosperm: an integrator of seed growth and development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 6, p. 664-670, 2006.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K.; HILHORST, H.; NONOGAKI, H. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3. ed. New York: Springer-Verlag, 2013.

BOISNARD-LORIG, C.; COLON-CARMONA, A.; BAUCH, M.; HODGE, S.; DOERNER, P.; BANCHAREL, E.; DUMAS, C.; HASELOFF, J.; BERGERA, F. Dynamic analyses of the expression of the HISTONE::YFP fusion protein in Arabidopsis show that syncytial endosperm is divided in mitotic domains. **The Plant Cell**, v. 13, n. 3, p. 495-509, 2001.

BOLGER, A.; SCOSSA, F.; BOLGER, M. E.; LANZ, C.; MAUMUS, F.; TOHGE, T.; QUESNEVILLE, H.; ALSEEKH, S.; SØRENSEN, I.; LICHTENSTEIN, G.; FICH, E. A.; CONTE, M.; KELLER, H.; SCHNEEBERGER, K.; SCHWACKE, R.; OFNER, I.; VREBALOV, J.; XU, Y.; OSORIO, S.; AFLITOS, S. A.; SCHIJLEN, E.; JIMÉNEZ-GOMÉZ, J. M.; RYNGAJLLO, M.; KIMURA, S.; KUMAR, R.; KOENIG, D.; HEADLAND, L. R.; MALOOF, J. N.; SINHA, N.; VAN HAM, R. C. H. J.; LANKHORST, R. K.; MAO, L.; VOGEL, A.; ARSOVA, B.; PANSTRUGA, R.; FEI, Z.; ROSE, J. K. C.; ZAMIR, D.; CARRARI, F.; GIOVANNONI, J. J.; WEIGEL, D.; USADEL, B.; FERNIE, A. R. The genome of the stress-tolerant wild tomato species *Solanum pennellii*. **Nature Genetics**, v. 46, n. 9, 1034-1038, 2014.

BOREVITZ, J. O.; CHORY, J. Genomics tools for QTL analysis and gene discovery. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 2, p. 132-136, 2004.

BOYKO, A.; BLEVINS, T.; YAO, Y.; GOLUBOV, A.; BILICHAK, A.; ILNYTSKYY, Y.; HOLLANDER, J.; MEINS JR, F.; KOVALCHUK, I. Transgenerational adaptation of Arabidopsis to stress requires DNA methylation and the function of Dicer-Like Proteins. **PLoS One**, v. 5, n. 3, p. e9514, 2010.

BRADFORD, K. J.; NONOGAKI, H. Seed development, dormancy and germination. Sheffield: Blackwell Publishing. 2007.

BROWN, P.; DEMMENT, M.; LUMPKIN, T. Global Horticulture Assessment. Davis: University of California. 2005.

BURR, B.; BURR, F. A. Recombinant inbreeds for molecular mapping in maize: theoretical and practical considerations. **Trends in Genetics**, v. 7, p. 55-60, 1991.

CAPEL, C.; DEL CARMEN, A. F.; ALBA, J. M.; LIMA-SILVA, V.; HERNANDEZ-GRAS, F.; SALINAS, M.; BORONAT, A.; ANGOSTO, T.; BOTELLA, M. A.; FERNANDEZ-MUNOZ, R.; GRANELL, A.; CAPEL, J.; LOZANO, R. Wide-genome QTL mapping of fruit quality traits in a tomato RIL population derived from the wild-relative species *Solanum pimpinellifolium* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 128, p. 2019-2035, 2015.

CARVALHO, J. L.; PAGLIUCA, L. G. Tomate: Um mercado que não pára de crescer globalmente. **Hortifruti Brasil**, Piracicaba, v. 6, n. 58, p. 6-14, jun. 2007.

- CASTRO, J.; HÓDAR, J. A.; GÓMEZ, J. M. Seed size. In: Basra, A. S. (Eds.). **Handbook of Seed Science and Technology**. New York: CRC Press, 2006, p. 397-428.
- CAUSSE, M.; SALIBA-COLOMBANI, V.; LECOMTE, L.; DUFFEÂ, P.; ROUSSELLE, P.; BURET, M. QTL analysis of fruit quality in fresh market tomato: a few chromosome regions control the variation of sensory and instrumental traits. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 377, p. 2089-2098, 2002.
- CHARPENTIER, A.; ANAND, M.; BAUCH, C. T. Variable offspring size as an adaptation to environmental heterogeneity in a clonal plant species: integrating experimental and modelling approaches. **Journal of Ecology**, v. 100, n. 1, p.184-195, 2012.
- CHAUDHURY, A. M.; KOLTUNOW, A.; PAYNE, T.; LUO, M.; TUCKER, M. R.; DENNIS, E. S.; PEACOCK, W. J. Control of early seed development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 17, p. 677-699, 2001.
- COLOMBO, L.; BATTAGLIA, R.; KATER, M. M. *Arabidopsis* ovule development and its evolutionary conservation. **Trends Plants Sci**, v. 13, n. 8, p. 444-450, 2008.
- CONTRERAS, S.; BENNETT, M. A.; METZGER, J. D.; TAY, D. Maternal light environment during seed development affects lettuce seed weight, germinability, and storability. **HortScience**, v. 43, n. 3, p. 845-852, 2008.
- COSTA, J. M.; HEUVELINK, E. Introduction: The tomato crop and industry. In: HEUVELINK, E. **Tomatoes**. 1. ed. Cambridge: CABI Publishing, 2005. p. 1-20.
- DAY, R. C.; HERRIDGE, R. P.; AMBROSE, B. A.; MACKNIGHT, R. C. Transcriptome analysis of proliferating *Arabidopsis* endosperm reveals biological implications for the control of syncytial division, cytokinin signaling, and gene expression regulation. **Plant Physiology**, v. 148, n. 4, p. 1964-1984, 2008.
- DOGANLAR, S.; FRARY, A.; KU, H.; TANKSLEY, S. Mapping quantitative trait loci in inbred backcross lines of *Lycopersicon pimpinellifolium* (LA1589). **Genome**, v. 45, p. 1189-1202, 2002.
- DOGANLAR, S.; FRARY, A.; TANKSLEY, S. D. The genetic basis of seed-weight variation: tomato as a model system. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, n. 8, p. 1267-1273, 2000.
- DOERGE R. W. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, p. 43-52, 2002.
- DRESSELHAUS, T. Cell-cell communication during double fertilization. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 1, p. 41-47, 2006.
- DU, L.; LI, N.; CHEN, L.; XU, Y.; LI, Y.; ZHANG, Y.; LI, C.; LI, Y. The ubiquitin receptor DA1 regulates seed and organ size by modulating the stability of the ubiquitin-specific protease UBP15/SOD2 in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 26, n. 2, p. 665-677, 2014.

EBERT, A. W. Ex situ conservation of plant genetic resources of major vegetables. In: NORMAH, M. N.; CHIN, H. F.; REED, B. M. **Conervation of tropical plant species**. New York: Springer, 2013, p. 373-418.

EBRAHIMI, A.; MAURY, P.; BERGER, M.; KIANI, S. P.; NABIPOUR, A.; SHARIATI, F.; GRIEU, P.; SARRAFI, A. QTL mapping of seed-quality traits in sunflower recombinant inbred lines under different water regimes. **Genome**, v. 51, n. 8, p. 599-615, 2008.

EL-KASSABY, Y. A. Genetic variation within and among conifer populations: review and evaluation of methods. In: FINESCHI, S.; MALVOLTI, M. E.; CANNATA, F.; HATTEMER, H. H. (Eds.). **Biochemical markers in the population genetics of forest trees**. The Hague: SPB Academic Publishing bv, 1991. p. 61-76.

FAN, C.; CAI, G.; QING, J.; LI, Q.; YANG, M.; WU, J.; FU, T.; LIU, K.; ZHOU, Y. M. Mapping of quantitative trait loci and development of allele-specific markers for seed weight in *Brassica napus*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 121, n. 7, p. 1289-1301, 2010.

FAN, C.; XING, Y.; MAO, H.; LU, T.; HAN, B.; XU, C.; LI, X.; ZHANG, Q. GS3, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, n. 6, p. 1164-1171, 2006.

FAN, C.; YU, S.; WANG, C.; XING, Y. A causal C-A mutation in the second exon of GS3 highly associated with rice grain length and validated as a functional marker. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 118, n. 3, p. 465-472, 2009.

FANG, W.; WANG, Z.; CUI, R.; LI, J.; LI, Y. Maternal control of seed size by EOD3/CYP78A6 in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 70, n. 6, p. 929-939, 2012.

FAOSTAT. **Food and agriculture organization of the united nations statistics division: Browse data - Production/Crops**. 2016. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 24 fev. 2016.

FENG, W.; CHEN, J.; ZHENG, X.; LIU, Q. Thyme oil to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo as fumigant and contact treatments. **Food Control**, v. 22, 1 p. 78-81, jan 2011.

FERREIRA, S. M. R. **Características de qualidade do tomate de mesa (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivado nos sistemas convencional e orgânico comercializado na região metropolitana de Curitiba**. 2004. 231 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

FLEMING, T. H.; KRESS, W. J. **The ornaments of life: Coevolution and conservation in the tropics**. Chicago and London: The University of Chicago Press, 2013.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. rev. ampl. Viçosa: UFV. 2013.

FINCH-SAVAGE, W. E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytologist**, v. 171, n. 3, p. 501-523, 2006.

FITZGERALD, J.; LUO, M.; CHAUDHURY, A.; BERGER, F. DNA methylation causes predominant maternal controls of plant embryo growth. **PLOS ONE**, v. 3, n. 5, p. e2298, 2008.

FONTES, P. C. R.; SILVA, D. J. H. **Produção de tomate de mesa**. 1. ed. Viçosa: Aprenda fácil, 2002.

FOOLAD, M. R. Genome mapping and molecular breeding of tomato. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2007, 52 p., 2007.

FOOLAD, M. R.; SUBBIAH, P.; KRAMER, C.; HARGRAVE, G.; LIN, G. Y. Genetic relationships among cold, salt and drought tolerance during seed germination in an interspecific cross of tomato. **Euphytica**, v. 130, n. 2, p. 199-206, 2003.

FOOLAD, M. R.; SUBBIAH, P.; ZHANG, L. Common QTL affect the rate of tomato seed germination under different stress and nonstress conditions. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2007, 10 p., 2007.

FOOLAD, M. R.; ZHANG, L. P.; SUBBIAH, P. Genetics of drought tolerance during seed germination in tomato: inheritance and QTL mapping. **Genome**, v. 46, n. 4, p. 536-545, 2003.

FRIDMAN, E.; PLEBAN, T.; ZAMIR, D. A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 9, p. 4718-4723, 2000.

GAJ, T.; GERSBACH, C. A.; BARBAS, C. F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 7, p. 397-405, 2013.

GALLOWAY, L. F.; ETTERSON, J. R. Transgenerational plasticity is adaptive in the wild. **Science**, v. 318, n. 5853, p. 1134-1136, 2007.

GARCIA, D.; FITZ GERALD, J. N.; BERGER, F. Maternal control of integument cell elongation and zygotic control of endosperm growth are coordinated to determine seed size in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 17, n. 1, p. 52-60, 2005.

GARCIA, D.; SAINGERY, V.; CHAMBRIER, P.; MAYER, U.; JÜRGENS, G.; BERGER, F. Arabidopsis haiku mutants reveal new controls of seed size by endosperm. **Plant Physiology**, v. 131, n. 4, p. 1661-1670, 2003.

GEGAS, V. C.; NAZARI, A.; GRIFFITHS, S.; SIMMONDS, J.; FISH, L.; ORFORD, S.; SAYERS, L.; DOONAN, J. H.; SNAPE, J. W. A genetic framework for grain size and shape variation in wheat. **The Plant Cell**, v. 22, n. 4, p. 1046-1056, 2010.

GERITZ, S. A. H.; MEIJDEN, E. VAN DER; METZ, J. A. J. Evolutionary dynamics of seed size and seedling competitive ability. **Theoretical Population Biology**, v. 55, n. 3, p. 324-343, 1999.

GLAZIER, A. M.; NADEAU, J. H.; AITMAN, T. J. Finding genes that underlie complex traits. **Science**, v. 298, n. 5602, p. 2345-2349, 2002.

GNAN, S.; PRIEST, A.; KOVER, P. X. The genetic basis of natural variation in seed size and seed number and their trade-off using *Arabidopsis thaliana* MAGIC Lines. **Genetics**, v. 198, n. 4, p. 1751-1758, 2014.

GOLDMAN, I. L.; PARAN, I.; ZAMIR, D. Quantitative trait locus analysis of a recombinant inbred line population derived from a *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon cheesmanii* cross. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 90, n. 7, p. 925-932, 1995.

GÓMEZ, J. M. Bigger is not always better: conflicting selective pressures on seed size in *Quercus ilex*. **Evolution**, v. 58, n. 1, p. 71-80, 2004.

GOULD, W. A. Introduction & history of the tomato industry. In: GOULD, W. A. **Tomato production, processing and technology**. 3. ed. Baltimore: CTI Publications Inc., 1992. p. 3-17.

GRANDILLO, S.; TANKSLEY, S. D. QTL analysis of horticultural traits differentiating the cultivated tomato from the closely related species *Lycopersicon pimpinellifolium*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, n. 8, p. 935-951, 1996.

HALPERN, S. L. Sources and consequences of seed size variation in *Lupinus perennis* (Fabaceae): adaptive and non-adaptive hypotheses. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 2, p. 205-213, 2005.

HAMILTON, J. P.; BUELL, C. R. Advances in plant genome sequencing. **The Plant Journal**, v. 70, n. 1, p. 177-190, 2012.

HARDING, S. A.; TSAI, C. J.; CSEKE, L. J.; KAUFMAN, P. B.; CHANG, S. C.; CHEN, F. Localization of gene expression. In: CSEKE, L. J.; KAUFMAN, P. B.; PODILA, G. K.; TSAI, C. J. **Molecular and cellular methods in biology and medicine**. 2. ed. United States of America: CRC PRESS, 2004. p. 487-508.

HE, H.; VIDIGAL, D. S.; SNOEK, L. B.; SCHNABEL, S.; NIJVEEN, H.; HILHORST, H.; BENTSINK, L. Interaction between parental environment and genotype affects plant and seed performance in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 22, p. 6603-6615, 2014.

HEISER, C.; ANDERSON, G. 'New' solanums. In: JANICK, J. **Perspectives on new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press, 1999. p. 379-384.

HERMAN, J. J.; SULTAN, S. E. Adaptive transgenerational plasticity in plants: case studies, mechanisms, and implications for natural populations. **Frontiers in Plant Science**, v. 2, p. 1-10, 2011.

HERMAN, J. J.; SULTAN, S. E.; HORGAN-KOBELSKI, T.; RIGGS, C. Adaptive transgenerational plasticity in an annual plant: grandparental and parental drought stress enhance performance of seedlings in dry soil. **Integrative & Comparative Biology**, v. 52, n. 1, 77-88, 2012.

HERRIDGE, R. P.; DAY, R. C.; BALDWIN, S.; MACKNIGHT, R. C. Rapid analysis of seed size in Arabidopsis for mutant and QTL discovery. **Plant Methods**, v. 7, n. 3, 2011.

HILHORST, H. W. M.; FINCH-SAVAGE, W. E.; BUITINK, J.; BOLINGUE, W.; LEUBNER-METZGER, G. Dormancy in plant seeds. In: Lubzens, E.; Cerda, J.; Clark, M. Dormancy and Resistance in Harsh Environments. Springer, 2010. p 43-67.

HILHORST, H. W. M.; KOORNNEEF, M. Dormancy in Plants. In: JOHN WILEY & SONS, Ltd. **Encyclopedia of life sciences**. Cichester: Wiley, 2007. p. 1-4.

HOGENBOOM, N. G. Breaking breeding barriers in *Lycopersicon*. 4. Breakdown of unilateral incompatibility between *L. peruvianum* (L.) MILL. and *L. esculentum* MILL. **Euphytica**, v. 21, n. 3, p. 397-404, 1972.

HOLESKI, L. M.; JANDER, G.; AGRAWAL, A. A. Transgenerational defense induction and epigenetic inheritance in plants. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 27, n. 11, p. 618-626, 2012.

HOLLAND, J. B. Genetic architecture of complex traits in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, n. 2, p. 156-161, 2007.

HORA, R. C.; GOTO, R.; BRANDÃO FILHO, J. U. T. O lugar especial da produção de hortaliças no agronegócio. In: FNP (Ed.). **Agriannual: Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP, 2004. p.322-323.

HUANG, X.; SCHMITT, J.; DORN, L.; GRIFFITH, C.; EFFGEN, S.; TAKAO, S.; KOORNNEEF, M.; DONOHUE, K. The earliest stages of adaptation in an experimental plant population: strong selection on QTLs for seed dormancy. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 7, p. 1335-1351, 2010.

HUI, Y. H.; EVRANUZ, E. O. **Handbook of vegetable preservation and processing**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 2015.

JIANG, W. B.; HUANG, H. Y.; HU, Y. W.; ZHU, S. W.; WANG, Z. Y.; LIN, W. H. Brassinosteroid regulates seed size and shape in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 162, n. 4, p. 1965-1977, 2013.

JOFUKU, K. D.; OMIDYAR, P. K.; GEE, Z.; OKAMURO, J. K. Control of seed mass and seed yield by the floral homeotic gene *APETALA2*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 8, p. 3117-3122, 2005.

JOOSEN, R. V.; ARENDS, D.; WILLEMS, L. A.; LIGTERINK, W.; JANSEN, R. C.; HILHORST, H. W. Visualizing the genetic landscape of Arabidopsis seed performance. **Plant Physiology**, v. 158, n. 2, p. 570-589, 2012.

KAEPLER, S.; PHILLIPS, R.; KIM, T. Use of near-isogenic lines derived by backcrossing or selfing to map qualitative traits. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 87, n. 1-2, p. 233-237, 1993.

KAZMI, R. H. **Genes for seed quality: Integrating physiology and genetical genomics to mine for seed quality genes in tomato**. 2013. 243 f. Thesis (Doctor of Plant Sciences) - Wageningen University, Wageningen, 2013.

KAZMI, R. H.; KHAN, N.; WILLEMS, L. A.; VAN HEUSDEN, A. W.; LIGTERINK, W.; HILHORST, H. W. Complex genetics controls natural variation among seed quality phenotypes in a recombinant inbred population of an interspecific cross between *Solanum lycopersicum* x *Solanum pimpinellifolium*. **Plant Cell & Environment**, v. 35, n. 5, p. 929-951, 2012.

KESAVAN, M.; SONG, J. T.; SEO, H. S. Seed size: a priority trait in cereal crops. **Physiologia Plantarum**, v. 147, n. 2, p. 113-120, 2013.

KHAN, N. **Genetic and physiological quality of tomato seed and seedlings**. 2013. 249 f. Thesis (Doctor of Plant Sciences) - Wageningen University, Wageningen, 2013.

KHAN, N.; KAZMI, R. H.; WILLEMS, L. A. J.; VAN HEUSDEN, A. W.; LIGTERINK, W.; HILHORST, H. W. M. Exploring the Natural Variation for Seedling Traits and Their Link with Seed Dimensions in Tomato. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e43991, 2012.

KIMURA, S.; SINHA, N. Tomato (*Solanum lycopersicum*): A Model Fruit-Bearing Crop. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 3, n. 11, p. 1-18, 2008.

KONDOU, Y.; NAKAZAWA, M.; KAWASHIMA, M.; ICHIKAWA, T.; YOSHIZUMI, T.; SUZUKI, K.; ISHIKAWA, A.; KOSHI, T.; MATSUI, R.; MUTO, S.; MATSUI, M. RETARDED GROWTH OF EMBRYO1, a new basic helix-loop-helix protein, expresses in endosperm to control embryo growth. **Plant Physiology**, v. 147, n. 4, p. 1924-1935. 2008.

KOOKE, R.; WIJNKER, E.; KEURENTJES, J. Backcross populations and near isogenic lines. **Methods in Molecular Biology**, v. 871, p. 3-16, 2012.

KOORNNEEF, M.; ALONSO-BLANCO, C.; VREUGDENHIL, D. Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 141-172, 2004.

KOORNNEEF, M.; BENTSINK, L.; HILHORST, H. Seed dormancy and germination. **Current opinion in plant biology**, v. 5, n. 1, p. 33-36, 2002.

KOU, H. P.; LI, Y.; SONG, X. X.; OU, X. F.; XING, S. C.; MA, J.; VON WETTSTEIN, D.; LIU, B. Heritable alteration in DNA methylation induced by nitrogen-deficiency stress accompanies enhanced tolerance by progenies to the stress in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 14, p. 1685-1693, 2011.

LANGRIDGE, P.; PALTRIDGE, N.; FINCHER, G. Functional genomics of abiotic stress tolerance in cereals. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v. 4, n. 4, p. 343-354, 2006.

LAZAR, G. Somatic hybridization of medicinal plants in the family solanaceae. IN: BAJAJ, Y. P. S. **Somatic hybridization in crop improvement I (Biotechnology in agriculture and forestry)**. Springer-Verlag, 1994, p. 345-359.

LI, J.; THOMSON, M.; McCOUCH, S. R. Fine mapping of a grain-weight quantitative trait locus in the pericentromeric region of rice chromosome 3. **Genetics**, v. 168, n. 4, p. 2187-2195, 2004.

LI, N.; LI, Y. Maternal control of seed size in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 4, p. 1087-1097, 2015.

LI, Y.; FAN, C.; XING, Y.; JIANG, Y.; LUO, L.; SUN, L.; SHAO, D.; XU, C.; LI, X.; XIAO, J.; HE, Y.; ZHANG, Q. Natural variation in *GS5* plays an important role in regulating grain size and yield in rice. **Nature Genetics**, v. 43, n. 12, p. 1266-1269, 2011.

LI, Y.; ZHENG, L.; CORKE, F.; SMITH, C.; BEVAN, M. W. Control of final seed and organ size by the DA1 gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Genes & Development**, v. 22, n 10, p. 1331-1336, 2008.

LIGTERINK, W.; JOOSEN, R. V.; HILHORST, H. W. Unravelling the complex trait of seed quality: using natural variation through a combination of physiology, genetics and -omics technologies. **Seed Science Research**, v. 22, n. S1, p. S45-S52, 2012.

LIU, B. H. **Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis**. CRC Press, 1997.

LORENZ, K.; COHEN, B. A. Small- and large-effect quantitative trait locus interactions underlie variation in yeast sporulation efficiency. **Genetics**, v. 192, n. 3, p. 1123-1132, 2012.

LOUDET, O.; GAUDON, V.; TRUBUIL, A.; DANIEL-VEDELE, F. Quantitative trait loci controlling root growth and architecture in *Arabidopsis thaliana* confirmed by heterogeneous inbred family. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 110, n. 4, p. 742-753, 2005.

- LUCIA, C. M. D.; CAMPOS, F. M.; MATA, G. M. S. C.; SANT'ANA, H. M. P. Controle de perdas de carotenóides em hortaliças preparadas em unidade de alimentação e nutrição hospitalar. **Ciência e Saúde Coletiva**, Viçosa, v. 13, n. 5, p. 1627-1636, set./out. 2008.
- LUO, M.; DENNIS, E. S.; BERGER, F.; PEACOCK, W. J.; CHAUDHURY, A. MINISEED3 (MINI3), a WRKY family gene, and HAIKU2 (IKU2), a leucine-rich repeat (LRR) KINASE gene, are regulators of seed size in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 48, 17531-17536, 2005.
- LUZ, F. J. F.; SABOYA, R. C. C.; PEREIRA, P. R. V. **O cultivo do tomate em Roraima**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2002.
- LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sunderland: Sinauer Associates, 1998.
- MACHADO NETO, A. S. **Viabilidade agroeconômica da produção de tomate de 'mesa' sob diferentes sistemas de cultivo e manejo de adubação**. 2014. 87 f. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologias Agropecuárias) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2014.
- MACKAY, T. F. C.; STONE, E. A.; AYROLES, J. F. The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 565-577, 2009.
- MADHAVI, D. L.; SALUNKHE, D. K. Tomato. In: SALUNKHE, D. K.; KADAM, S. S. **Handbook of vegetable science and technology: Production, composition, storage and processing**. 1. ed. New York: CRC Press. 1998. p. 171-202.
- MANNING, P.; HOUSTON, K.; EVANS, T. Shifts in seed size across experimental nitrogen enrichment and plant density gradients. **Basic and Applied Ecology**, v. 10, n. 4, p. 300-308, 2009.
- MANSFIELD, S. G.; BRIARTY, L. G. Development of the free-nuclear endosperm in *Arabidopsis thaliana* (L.). **Arabidopsis Information Service**, v. 27, p. 53-64, 1990a.
- MANSFIELD, S. G.; BRIARTY, L.G. Endosperm cellularization in *Arabidopsis thaliana* L. **Arabidopsis Information Service**, v. 27, p. 65-72, 1990b.
- MAO, H.; SUN, S.; YAO, J.; WANG, C.; YU, S.; XU, C.; LI, X.; ZHANG, Q. Linking differential domain functions of the GS3 protein to natural variation of grain size in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 45, p. 19579-19584, 2010.
- MAURICIO, R. Mapping quantitative trait loci in plants: uses and caveats for evolutionary biology. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, p. 370-381, 2001.
- METZ, J.; LIANCOURT, P.; KIGEL, J.; HAREL, D.; STERNBERG, M.; TIELBÖRGER, K. Plant survival in relation to seed size along environmental gradients: a long-term study from semi-arid and Mediterranean annual plant communities. **Journal of Ecology**, v. 98, n. 3, p. 697-704, 2010.

MINAMI, K.; HAAG, H. P. **O Tomateiro**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1989.

MOLES, A. T.; ACKERLY, D. D.; WEBB, C. O.; TWEDDLE, J. C.; DICKIE, J. B.; WESTOBY, M. A brief history of seed size. **Science**, v. 307, n. 5709, p. 576-580, 2005.

MOLES, A. T.; WESTOBY, M. Seedling survival and seed size: a synthesis of the literature. **Journal of Ecology**, v. 92, p. 372-383, 2004.

MONTEIRO, C. S. **Desenvolvimento de molho de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill formulado com cogumelo *Agaricus brasiliensis***. 2008. 176 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

MOORE, C. R.; GRONWALL, D. S.; MILLER, N. D.; SPALDING, E. P. Mapping quantitative trait loci affecting *Arabidopsis thaliana* seed morphology features extracted computationally from images. **G3**, v. 3, n. 1, p. 109-118, 2013.

MOREJON, N. H. **Genetic and Environmental Factors Affecting Improvement of Rootstocks for Tomato**. 2013. 134 f. Thesis (Master of Science) - The Ohio State University, Columbus, 2013.

MORITZ, B.; TRAMONTE, V. L. C. Biodisponibilidade do licopeno. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 2, p. 265-273, mar./apr. 2006.

NAGASAWA, N.; HIBARA, K. I.; HEPPARD, E. P.; VANDER VELDEN, K. A.; LUCK, S.; BEATTY, M. NAGATO, Y.; SAKAI, H. GIANT EMBRYO encodes CYP78A13, required for proper size balance between embryo and endosperm in rice. **The Plant Journal**, v. 75, n. 4, p. 592-605, 2013.

NAIKA, S.; JEUDE, J. V. L.; GOFFAU, M.; HILMI, M.; DAM, B. V. **A Cultura do tomate: Produção, processamento e comercialização**. 1. ed. Wageningen: Fundação Agromisa e CTA, 2006.

OHTO, M. A.; FISCHER, R. L.; GOLDBERG, R. B.; NAKAMURA, K.; HARADA, J. J. Control of seed mass by *APETALA2*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 8, p. 3123-3128, 2005.

OLSEN, O. A. Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**, v. 16, n. suppl 1, p. S214-S227, 2004.

ORSI, C. H.; TANKSLEY, S. D. Natural variation in an ABC transporter gene associated with seed size evolution in tomato species. **PLOS Genetics**, v. 5, n. 1, p. e1000347, 2009.

OUYANG, X.; VAN VOORTHUYSEN, T.; TOOROP, P. E.; HILHORST, H. W. M. Seed vigor, aging, and osmopriming affect anion and sugar leakage during imbibition of maize (*Zea mays* L.) caryopses. **International Journal of Plant Sciences**, v. 163, n. 1, p. 107-112, 2002.

PANTHEE, D. R.; PANTALONE, V. R.; WEST, D. R.; SAXTON, A. M.; SAMS, C. E. Quantitative trait loci for seed protein and oil concentration, and seed size in soybean. **Crop Science**, v. 45, n. 5, p. 2015-2022, 2005.

PENFIELD, S.; KING, J. Towards a systems biology approach to understanding seed dormancy and germination. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1673, p. 3561-3569, 2009.

PERALTA, I. E.; SPOONER, D. M. History, origin and early cultivation of tomato (Solanaceae). In: RAZDAN M. K.; MATTOO A. K. **Genetic Improvement of Solanaceous Crops**. Enfield: Science Publishers, 2006. p. 1-25.

PERALTA, I. E.; SPOONER, D. M.; KNAPP, S. **Systematic Botany Monographs: Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (Solanum sect. Lycopersicoides, sect. Juglandifolia, sect. Lycopersicon; Solanaceae)**. v. 84. United States of America: The American Society of Plant Taxonomists, 2008.

PEREZ-VEGA, E.; PANEDA, A.; RODRIGUEZ-SUAREZ, C.; CAMPA, A.; GIRALDEZ, R.; FERREIRA, J. J. Mapping of QTLs for morpho-agronomic and seed quality traits in a RIL population of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 120, n. 7, p. 1367-1380, 2010.

RAJJOU, L.; DUVAL, M.; GALLARDO, K.; CATUSSE, J.; BALLY, J.; JOB, C.; JOB, D. Seed germination and vigor. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 507-533, 2012.

RAMYA, P.; CHAUBAL, A.; KULKARNI, K.; GUPTA, L.; KADDOO, N.; DHALIWAL, H. S.; CHHUNEJA, P.; LAGU, M.; GUPTA, V. QTL mapping of 1000-kernel weight, kernel length, and kernel width in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Applied Genetics**, v. 51, n. 4, p. 421-429, 2010.

RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. How and why to measure the germination process? **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 1, p. 1-11, 2006.

ROCHA, R. C. **Uso de diferentes telas de sombreamento no cultivo protegido do tomateiro**. 2007. 90 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2007.

RON, M.; WELLER, J. From QTL to QTN identification in livestock – winning by points rather than knock-out: a review. **Animal Genetics**, v. 38, 429-439, 2007.

SAEEDIPOUR, S. Effects of phytohormone seed priming on germination and seedling growth of cowpea (*Vigna sinensis* L.) under different duration of treatment. **International Journal of Biosciences**, v. 3, n. 12, p. 187-192, 2013.

SALINAS, M.; CAPEL, C.; ALBA, J. M.; MORA, B.; CUARTERO, J.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; LOZANO, R.; CAPEL, J. Genetic mapping of two QTL from the wild tomato *Solanum pimpinellifolium* L. controlling resistance against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, n. 1, p. 83-92, 2013.

SCHAUER, N.; ZAMIR, D.; FERNIE, A. R. Metabolic profiling of leaves and fruit of wild species tomato: a survey of the *Solanum lycopersicum* complex. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 410, p. 297-307, 2005.

SCHRUFF, M. C.; SPIELMAN, M.; TIWARI, S.; ADAMS, S.; FENBY, N.; SCOTT, R. J. The *AUXIN RESPONSE FACTOR 2* gene of *Arabidopsis* links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. **Development**, v. 133, n. 2, 251-261, 2006.

SCOTT, R. J.; SPIELMAN, M.; BAILEY, J.; DICKINSON, H. G. Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana*. **Development**, v. 125, n. 17, p. 3329-3341, 1998.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n.2, p. 227-236, 2004.

SHOMURA, A.; IZAWA, T.; EBANA, K.; EBITANI, T.; KANEGAE, H.; KONISHI, S.; YANO, M. Deletion in a gene associated with grain size increased yields during rice domestication. **Nature Genetics**, v. 40, p. 1023-1028, 2008.

SILVA, I. M. C.; SÁ, E. Q. C. Alimentos funcionais: Um enfoque gerontológico. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 24-28, jan./fev. 2012.

SILVA, J. B. C.; GIORDANO, L. B. **Tomate para processamento industrial**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2000.

SILVA, J. B. C.; GIORDANO, L. B.; FURUMOTO, O.; BOITEUX, L. S.; FRANÇA, F. H.; VILLAS BOAS, G. L.; CASTELO BRANCO, M.; MEDEIROS, M. A.; MAROUELLI, W.; SILVA, W. L. C.; LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C.; NASCIMENTO, W. M.; PEREIRA, W. **Cultivo de tomate para industrialização**. 1 - 2. ed. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2006.

SILVERTOWN, J. The paradox of seed size and adaptation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 4, p. 24-26, 1989.

SLATE, J. Quantitative trait locus mapping in natural populations: progress, caveats and future directions. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 363-379, 2005.

SONG, X. J.; HUANG, W.; SHI, M.; ZHU, M. Z.; LIN, H. X. A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase. **Nature Genetics**, v. 39, n. 5, p. 623-630, 2007.

SØRENSEN, M. B.; MAYER, U.; LUKOWITZ, W.; ROBERT, H.; CHAMBRIER, P.; JÜRGENS, G.; SOMERVILLE, C.; LEPINIEC, L.; BERGER, F. Cellularisation in the endosperm of *Arabidopsis thaliana* is coupled to mitosis and shares multiple components with cytokinesis. **Development**, v. 129, n. 24, p. 5567-5576, 2002.

SPANÒ, C.; BUSELLI, R., RUFFINI CASTIGLIONE, M.; BOTTEGA, S.; GRILLI, I. RNases and nucleases in embryos and endosperms from naturally aged wheat seeds stored in different conditions. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 4, p. 487-495, 2007.

SPOONER D. M.; PERALTA, I. E.; KNAPP, S. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [Solanum L. section Lycopersicon (Mill.) Wettst.]. **Taxon**, v. 54, n. 1, p. 43-61, 2005.

STEVENS, M. A. Inheritance of tomato fruit quality components. In: JANICK, J. **Plant breeding reviews**. Westport: The AVI Publishing Company, Inc., 1986. p. 273-311.

SUN, X.; SHANTHARAJ, D.; KANG, X.; NI, M. Transcriptional and hormonal signaling control of Arabidopsis seed development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 5, p. 611-620, 2010.

SUNDARESAN, V. Control of seed size in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 50, p. 17887-17888, 2005.

SWEENEY, M.; MCCOUCH, S. The complex history of the domestication of rice. **Annals of Botany**, v. 100, p. 951-957, 2007.

TANKSLEY, S.; GRANDILLO, S.; FULTON, T.; ZAMIR, D.; ESHED, Y.; PETIARD, V.; LOPEZ, J.; BECK-BUNN, T. Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, n. 2, p. 213-224, 1996.

TANKSLEY, S.; NELSON, J. Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, n. 2, p. 191-203, 1996.

TAYLOR, I. B. Biosystematics of the tomato. In: ATHERTON, J. G.; RUDICH, J. **The tomato crop: A scientific basis for improvement**. New York: Chapman & Hall, 1986. p. 1-34.

TENG, W.; HAN, Y.; DU, Y.; SUN, D.; ZHANG, Z.; QIU, L.; SUN, G.; LI, W. QTL analyses of seed weight during the development of soybean (*Glycine max* L. Merr.). **Heredity**, v. 102, n. 4, p. 372-380, 2009.

TIWARI, S.; SPIELMAN, M.; DAY, R. C.; SCOTT, R. J. Proliferative phase endosperm promoters from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Biotechnology Journal**, v. 4, n. 4, p. 393-407, 2006.

TOUZET, P.; WINKLER, R.; HELENTJARIS, T. Combined genetic and physiological analysis of a locus contributing to quantitative variation. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, n. 2, p. 200-205, 1995.

TSILO, T. J.; HARELAND, G. A.; SIMSEK, S.; CHAO, S.; ANDERSON, J. A. Genome mapping of kernel characteristics in hard red spring wheat breeding lines. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 121, n. 4, p. 717-730, 2010.

TUINSTRA, M.; EJETA, G.; GOLDSBROUGH, P. Heterogeneous inbred family (HIF) analysis: a method for developing near-isogenic lines that differ at quantitative trait loci. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, n. 5, p. 1005-1011, 1997.

USDA – United States Department of Agriculture. National nutrient database for standard reference release 27. 2015. Disponível em: <<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3258?manu=&fgcd=>>. Acesso em: 18 ago. 2015.

VALENCIA-DÍAZ, S.; MONTAÑA, C. Temporal variability in the maternal environment and its effect on seed size and seed quality in *Flourensia cernua* DC. (Asteraceae). **Journal of Arid Environments**, v. 63, n. 4, p. 686-695, 2005.

VAN DAELE, I.; GONZALEZ, N.; VERCAUTEREN, I.; de SMET, L.; INZÉ, D.; ROLDÁN-RUIZ, I.; VUYLSTEKE, M. A comparative study of seed yield parameters in *Arabidopsis thaliana* mutants and transgenics. **Plant Biotechnology Journal**, v. 10, n. 4, p. 488-500, 2012.

VENABLE, D. L. Size-number trade-offs and the variation of seed size with plant resource status. **The American Naturalist**, v. 140, n. 2, p. 287-304, 1992.

VIOLLE, C.; CASTRO, H.; RICHARTE, J.; NAVAS, M. L. Intraespecific seed trait variations and competition: passive or adaptive response? **Functional Ecology**, v. 23, n. 3, p. 612-620, 2009.

WANG, A.; GARCIA, D.; ZHANG, H.; FENG, K.; CHAUDHURY, A.; BERGER, F.; PEACOCK, W. J.; DENNIS, E. S.; LUO, M. The VQ motif protein IKU1 regulates endosperm growth and seed size in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 63, n. 4, p. 670-679. 2010.

WANG, B.; ZHANG, Z.; FU, Z.; LIU, Z.; HU Y.; TANG, J. Comparative QTL analysis of maize seed artificial aging between an immortalized F2 population and its corresponding RILs. **The Crop Journal**, v. 4, p. 30-39, 2016.

WANG, W.; HE, Q.; YANG, H.; XIANG, S.; XING, G.; ZHAO, T.; GA, J. Identification of QTL/segments related to seed-quality traits in *G. soja* using chromosome segment substitution lines. **Plant Genetic Resources**, v. 12, n. S1, p. S65-S69, 2014.

WANG, Y.; FREI, M. Stressed food – The impact of abiotic environmental stresses on crop quality. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 141, n. 3-4, p. 271-286, 2011.

WESTOBY, M.; FALSTER, D. S.; MOLES, A. T.; VESK, P. A.; WRIGHT, I. J. Plant ecological strategies: some leading dimensions of variation between species. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 33, p. 125-159, 2002.

WESTOBY, M.; JURADO, E.; LEISHMAN, M. Comparative evolutionary ecology of seed size. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 7, n. 11, p. 368-372, 1992.

WESTOBY, M.; LEISHMAN, M.; LORD, J.; POORTER, H.; SCHOEN, D. J. Comparative ecology of seed size and dispersal [and discussion]. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 351, n. 1345, p. 1309-1318, 1996.

WU, R.; LIN, M. Functional mapping-how to map and study the genetic architecture of dynamic complex traits. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, p. 229-237, 2006.

XIA, T.; LI, N.; DUMENIL, J.; LI, J.; KAMENSKI, A.; BEVAN, M. W.; GAO, F.; LI, Y. The ubiquitin receptor DA1 interacts with the E3 ubiquitin ligase DA2 to regulate seed and organ size in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 25, n. 9, p. 3347-3359, 2013.

XING, Y.; ZHANG, Q.: Genetic and molecular bases of rice yield. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 421-442, 2010.

YAKOVLEV, I. A.; FOSSDAL, C. G.; JOHNSEN, O. MicroRNAs, the epigenetic memory and climatic adaptation in Norway spruce. **New Phytologist**, v. 187, n. 4, p. 1154-1169, 2010.

ZAS, R.; CENDÁN, C.; SAMPEDRO, L. Mediation of seed provisioning in the transmission of environmental maternal effects in Maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton). **Heredity**, v. 111, n. 3, p. 248-255, 2013.

ZHANG, L.; YANG, G.; LIU, P.; HONG, D.; LI, S.; HE, Q. Genetic and correlation analysis of silique-traits in *Brassica napus* L. by quantitative trait locus mapping. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 122, n. 1, p. 21-31, 2011.

ZHAO, W.; WANG, X.; WANG, H.; TIAN, J.; LI, B.; CHEN, L.; CHAO, H.; LONG, Y.; XIANG, J.; GAN, J.; LIANG, W.; LI, M. Genome-Wide Identification of QTL for Seed Yield and Yield-Related Traits and Construction of a High-Density Consensus Map for QTL Comparison in *Brassica napus*. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 17, p. 1-14, 2016.

ZHOU, Y.; ZHANG, X.; KANG, X.; ZHAO, X.; ZHANG, X.; NI, M. SHORT HYPOCOTYL UNDER BLUE1 associates with MINISEED3 and HAIKU2 promoters in vivo to regulate Arabidopsis seed development. **The Plant Cell**, v. 21, n. 1, p. 106-117, 2009.

3 ARTIGO A: IDENTIFICAÇÃO DE QTLs PARA CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DE SEMENTE DE TOMATE SOB INFLUÊNCIA DO AMBIENTE MATERNO E DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE NA GERMINAÇÃO

3.1 RESUMO

O sucesso da germinação, crescimento e rendimento de cada cultura depende da qualidade das sementes utilizadas para o cultivo, com influência das condições ambientais. Portanto, esse estudo teve como objetivo identificar QTLs para características de qualidade de semente de tomate, em Linhagens Endogâmicas Recombinantes (RILs) sob influência do ambiente materno e diferentes condições de estresse na germinação. As RILs foram obtidas do cruzamento entre *S. lycopersicum* (cv. MoneyMaker, 'Money') × *S. pimpinellifolium* (G1.1554, 'Pimp') em diferentes condições materna. A fenotipagem das características de qualidade de semente da população de RILs foi obtida a partir do teste de germinação de sementes sob quatro condições ambientais: Água (controle), -0.5 MPa de NaCl (estresse salino), -0.5 MPa de Manitol (estresse osmótico) e 35°C – Alta Temperatura (estresse térmico). As variáveis analisadas foram: Germinação máxima (G_{max}), Taxa de germinação (t_{50}^{-1}), Área sob a curva de germinação (AUC) e Uniformidade (U_{8416}^{-1}). Com base na população de RILs, a genotipagem foi obtida por mapa de ligação gênica, a partir de marcadores SNPs, os quais abrangem todo o genoma do tomate. Com o auxílio do software MapQTL®6.0 foram identificados QTLs para as variáveis analisadas. Considerou-se significativo QTLs com escore LOD igual ou superior a 2,00. Além disso, foi feito o *heatmap* de acordo com os escores LOD para visualizar o intervalo de confiança de cada QTL nos 12 cromossomos do tomate. No total 124 QTLs foram identificados, sendo 25 para G_{max} , 49 para t_{50}^{-1} , 42 para AUC e oito para U_{8416}^{-1} ; com escores LOD variando de 2,01 a 4,71. Observou-se influência das condições materna e de germinação na identificação de QTLs. As RILs cultivadas em ambiente materno com menor teor de nitrato (NO^{-3}) favoreceram a identificação de mais QTLs. Quanto ao efeito do ambiente de germinação, foram identificados 39 QTLs em Água, 23 em NaCl, 27 em Manitol e 35 em Alta Temperatura. Além disso, o efeito aditivo dos alelos Money e Pimp também apresentou influência das condições ambientais de germinação, já que sob Manitol e Alta Temperatura, 40,7% e 65,7% dos QTLs apresentaram efeito

aditivo do alelo Pimp, respectivamente. Porém, ao considerar conjuntamente todas as condições ambientais avaliadas, houve um equilíbrio do efeito aditivo entre o alelo de Money e de Pimp. A maioria dos QTLs foram identificados nos cromossomos 6 e 11, sendo 36 e 27 QTLs, respectivamente. Nos intervalos de confiança entre 0-104.3 cM no cromossomo 6 e entre 0-36.1 cM no cromossomo 11 foram encontradas sobreposições de QTLs. Este estudo ilustra a complexidade subjacente à base genética para a germinação das sementes, mas de extrema importância, já que a identificação de QTLs associados aos diferentes parâmetros de germinação em diferentes condições ambientais facilita a elucidação dos mecanismos moleculares que controlam esse processo em sementes. Além disso, os marcadores moleculares ligados aos QTLs podem ser utilizados na seleção assistida por marcadores, proporcionando um método rápido para selecionar genótipos específicos sem a necessidade de avaliar extensivamente fenótipos em todas as fases do programa de melhoramento. Assim, a variação fenotípica nos dois progenitores e na população de RIL e a resolução e o tamanho dessa população foi suficiente para encontrar QTLs para o qualidade de semente, sendo a população de RIL uma ferramenta para o estudo das características quantitativas.

PALAVRAS-CHAVE: Cromossomo. Linhagens Endogâmicas Recombinantes. Loci de Características Quantitativas. RIL. *Solanum lycopersicum*. *S. pimpinellifolium*.

3.2 ABSTRACT

The success of germination, growth and yield of each crop depends on the quality of the seeds used for growing, influenced by environmental conditions. Therefore, the aim of this study was to identify QTLs for tomato seed quality traits in Recombinant Inbred Lineages (RILs) under the influence of maternal environment and different stress conditions on germination. RILs were obtained from the cross between *S. lycopersicum* (cv. Moneymaker, 'Money') × *S. pimpinellifolium* (G1.1554, 'Pimp') under different maternal conditions. Phenotyping of the seed quality traits of the RILs population was obtained from the germination assay under four environmental conditions: Water (control), -0.5 MPa NaCl (salt stress), -0.5 MPa Mannitol (osmotic stress) And 35°C – High Temperature (thermal stress). The variables analyzed were: Maximum germination (G_{max}), Germination rate (t_{50}^{-1}), Area under the germination

curve (AUC) and Uniformity (U_{8416}^{-1}). Based on the RIL population, genotyping was obtained by binding map of gene, from SNPs markers, which cover the entire tomato genome. With the aid of MapQTL®6.0 software, QTLs were identified for the analyzed variables. With the aid of MapQTL®6.0 software, QTLs were identified for the analyzed variables. QTLs with a LOD score equal to or greater than 2.00 were considered significant. In addition, the heatmap was made according to the LOD scores to visualize the confidence interval of each QTL on the 12 tomato chromosomes. A total of 124 QTLs were identified, 25 for G_{max} , 49 for t_{50}^{-1} , 42 for AUC, and eight for U_{8416}^{-1} ; with LOD scores ranging from 2.01 to 4.71. We observed influence of maternal and germination conditions on the QTLs identification. RILs grown in maternal environment with lower nitrate content (NO^{-3}) favored the identification of more QTLs. Regarding the effect of the germination environment, we identified 39 QTLs in Water, 23 in NaCl, 27 in Mannitol and 35 in High Temperature. Furthermore, the additive effect of the Money and Pimp alleles also showed influence by germination environmental conditions, since under Mannitol and High Temperature, 40.7% and 65.7% of the QTLs showed additive effect of allele Pimp respectively. However, when considering all environmental conditions evaluated together, there was an balanced of the additive effect between the Money and Pimp alleles. Most QTLs were identified on chromosomes 6 and 11, being 36 and 27 QTLs, respectively. In the confidence intervals between 0-104.3 cM on chromosome 6 and between 0-36.1 cM on chromosome 11 were found overlaps of QTLs. This study illustrates the complexity underlying the genetic basis for seed germination, but it is extremely important, since the identification of QTLs associated with different germination parameters under different environmental conditions facilitates the elucidation of the molecular mechanisms that control this process in seeds. In addition, molecular markers linked to QTLs can be used in marker assisted selection, providing a fast method for selecting specific genotypes without the need to extensively evaluate phenotypes at all stages of the breeding program. So, the phenotypic variation in both parents and in the RIL population and the size and resolution of this population was sufficient to find QTLs for seed quality, being the RIL population a tool for the study of quantitative traits.

KEYWORDS: Chromosome. Recombinant Inbred Lines. Quantitative Trait Loci. RIL. *Solanum lycopersicum*. *S. pimpinellifolium*.

3.3 INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é considerado uma das hortícolas mais cultivadas e consumidas no mundo, sendo uma importante *commodity* global (KIMURA; SINHA, 2008). A produção de tomate tem uma demanda crescente do mercado, sendo que na safra 2013-2014 a produção mundial alcançou 163,4 milhões de toneladas e rendimento de 348,6 mil Kg ha⁻¹ (FAOSTAT, 2016).

No tomateiro cultivado e nas suas espécies selvagens há variação natural substancial para a tolerância ao estresse abiótico. O germoplasma de tomate do tipo selvagem é uma fonte rica de variabilidade genética desejável, já que muitas dessas espécies foram identificadas com alta tolerância a estresses bióticos e abióticos (KIMURA; SINHA, 2008; BOLGER et al., 2014).

Em comparação com outras espécies de tomateiro silvestre, *S. pimpinellifolium* é a mais relacionada ao *S. lycopersicum* e, portanto, prontamente hibridizada (EBERT, 2013). Além disso, possui menos características hortícolas indesejáveis e oferece vários benefícios para o estudo da variação genética natural e caracteres morfológicos. Logo, tem sido utilizada como um recurso genético em programas de melhoramento (KAZMI et al., 2012).

Sabe-se que a semente é portadora de informações genéticas como produtividade, tipo de fruto, resistência a patógenos, entre outras, devido à sua variabilidade (MACHADO NETO, 2014) e que o desempenho é determinado por três componentes interligados e interativos que constituem um triângulo entre genética, qualidade fisiológica e ambiente. A qualidade de semente é um atributo agrônomico, quantitativamente herdado, além de ser um dos fatores que afeta o sucesso de uma cultura (HILHORST; KOORNNEEF, 2007; HILHORST et al., 2010; BEWLEY et al., 2013).

A qualidade de semente é definida como "o atributo de viabilidade e vigor que permite o surgimento e o estabelecimento de plântulas normais em uma ampla gama de ambientes" (KHAN et al., 2012). Este termo tem um significado amplo que inclui essencialmente todos os atributos genéticos, fisiológicos e físicos das sementes, como: pureza física, viabilidade, características de germinação (porcentagem, taxa e uniformidade), dormência, vigor (germinação/crescimento em condições de estresse), uniformidade no tamanho, massa seca de plântula,

morfologia do embrião e da plântula, armazenabilidade, ausência de danos mecânicos e capacidade de se desenvolver em uma planta vigorosa normal (FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006; BRADFORD; NONOGAKI, 2007).

O melhoramento de plantas centra-se principalmente no rendimento de colheita e na resistência à doença. No entanto, é igualmente essencial produzir sementes que germinem rápida e uniformemente, além de estabelecer plântulas vigorosas sob vários ambientes (KHAN, 2013). Estresses abióticos, tais como temperaturas extremas, baixa disponibilidade de água, altos níveis de sal e deficiência e toxicidade mineral são frequentemente encontrados por plantas em sistemas naturais e agrícolas. Esses estresses estão se tornando cada vez mais importantes devido à diminuição da disponibilidade de água de qualidade, degradação do solo e pressão das comunidades para a redução da intervenção química na agricultura (LANGRIDGE; PALTRIDGE; FINCHER, 2006).

Em estudo de avaliação de germoplasma, vários materiais genéticos de tomateiro selvagem foram identificados como possuindo a habilidade de germinar rapidamente sob estresse abiótico e a maioria das cultivares comerciais são sensíveis ao estresse ambiental durante a germinação de sementes e crescimento inicial de plântulas (FOOLAD; ZHANG; SUBBIAH, 2003). De acordo com Foolad et al. (2003), a semente da espécie selvagem germinou significativamente mais rápido do que a das linhagens melhoradas em condições de não-estresse, bem como em condições de frio, salinidade e seca.

Com o reconhecimento de que a expressão da maioria das características é influenciada por múltiplos genes e fatores ambientais, a genética quantitativa tornou-se o paradigma para a análise da variação fenotípica e da evolução. Assim, a análise de caracteres quantitativos é uma abordagem para a quantificação de características complexas em um mapeamento de população derivada de um cruzamento entre genótipos distintos. A associação do fenótipo com o genótipo analisado por marcadores moleculares é efetiva para a análise de Loci de Características Quantitativas (QTLs) (LIU, 1997; LYNCH; WALSH, 1998). QTL é uma região do genoma contendo uma diferença alélica que causa uma alteração no fenótipo (LORENZ; COHEN, 2012), ou seja, representam as regiões genômicas contendo um locus ou vários loci intimamente ligados, que contribuem para a variância total da característica (KHAN, 2013).

As características de vigor de sementes e de plântulas têm uma base genética complexa, controladas por muitos genes e portanto, são adequadas para análise de QTL; os estudos de QTL sobre a qualidade de semente revelaram, geralmente, a influência de QTLs de pequeno a grande efeito fenotípico. Estudos de QTL realizados em populações de cruzamentos interespecíficos entre tomateiro cultivado e silvestre permitiram a identificação de loci controlando a qualidade de semente (KAZMI et al., 2012; KHAN et al., 2012). Segundo estudo conduzido por Capel et al. (2015), as análises genéticas enfatizam a importância do desenvolvimento e caracterização de populações de Linhagens Endogâmicas Recombinantes (RILs) geradas a partir de espécies silvestres como uma fonte genética e de variabilidade fenotípica.

O uso das denominadas "populações de mapeamento imortal" consistindo de RILs homocigóticas é uma ferramenta para uso na análise de QTL e com papel fundamental na obtenção de valores de características sob diferentes condições ambientais. Este tipo de populações é obtido pelo método SSD (Descendente de uma Única Semente) de plantas F_2 até F_6 ou mais gerações até as RILs se tornarem predominantemente homocigóticas. Estas são importantes, porque permitem a realização de repetições e múltiplas análises da mesma população e, portanto, um grande número de características podem ser mapeadas em uma população (KOORNNEEF; ALONSO-BLANCO; VREUGDENHIL, 2004). Além disso, uma população de RIL é mais eficiente do que a população F_2 , por exemplo, dos mesmos parentais, já que menos indivíduos são necessários para detectar ligação de mesma magnitude entre marcadores e QTL (BURR; BURR, 1991).

A abordagem de QTL já foi usada para localizar regiões genômicas controlando características de tomate na qualidade de fruto (CAUSSE et al., 2002; CAPEL et al., 2015), resistência a praga (SALINAS et al., 2013), características morfológicas (PARAN; GOLDMAN; ZAMIR, 1997) e características de semente (DOGANLAR; FRARY; TANKSLEY, 2000; FOOLAD; ZHANG; SUBBIAH, 2003; KAZMI et al., 2012; KHAN et al., 2012). No entanto, ainda não há informação suficiente disponível sobre os componentes genéticos das características de qualidade de semente e de plântula e suas interações entre espécies de tomateiro cultivada e selvagem (KHAN, 2013; MOREJON, 2013).

Essa abordagem sistemática, estudando populações genéticas que diferem nos parâmetros de qualidade de semente e de plântula fornecerá

informações sobre o envolvimento de genes e dos processos que eles controlam (LIGTERINK; JOOSEN; HILHORST, 2012). Um fator pouco explorado, mas que também atua na qualidade de semente é o ambiente materno (HE et al., 2014). Estudos têm avaliado o seu efeito em diferentes aspectos da qualidade de semente, incluindo dormência, tamanho, massa e germinação, constatando que a qualidade de semente é dependente do ambiente durante a sua formação, (VALENCIA-DÍAZ; MONTAÑA, 2005; CONTRERAS et al., 2008; ZAS; CENDÁN; SAMPEDRO, 2013).

Isso ocorre em razão das condições ambientais e a disponibilidade de recursos poderem determinar a quantidade que as plantas mãe alocam às sementes em desenvolvimento, e, por sua vez, afetar características que determinam a qualidade de semente e conseqüentemente, o estabelecimento de plântulas, especialmente sob condições competitivas e de estresse (CASTRO et al., 2006; METZ et al., 2010).

Desta forma, dado a interação entre o genótipo de semente e o ambiente materno (POSTMA; ÅGREN, 2015), estudos ainda se fazem necessários, a exemplo dos que objetivam avaliar o efeito dos ambientes maternos na identificação de QTLs, já que é sabido que há efeito do ambiente materno sob importantes características das sementes (HALPERN, 2005; VIOLLE et al., 2009).

Além disso, como a investigação da base genética da variabilidade da germinação de sementes permanece aberta, devido à carência de estudos integrativos em uma escala de população, há a necessidade de determinar a base genética de características de germinação de tomate sob diferentes condições de estresse, os quais podem atrasar não apenas a germinação, mas também o início, a taxa e a uniformidade de germinação. Assim, é importante incluir os vários aspectos da germinação cumulativa para quantificar as diferentes características de qualidade de semente sob várias condições de ambiente (SAEEDIPOUR, 2013).

Portanto, para elucidar os mecanismos moleculares subjacentes às características quantitativas, esse estudo teve como objetivo identificar QTLs para características de qualidade de semente de tomate, em Linhagens Endogâmicas Recombinantes sob influência do ambiente materno e diferentes condições de estresse na germinação.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Material Vegetal e Condições de Crescimento

A população foi obtida por cruzamento entre *Solanum lycopersicum* (cv. Moneymaker, 'Money'), uma linhagem avançada de tomateiro horticulturalmente superior e *S. pimpinellifolium* (G1.1554, 'Pimp'), um acesso endogâmico auto-compatível de uma espécie selvagem para produzir Linhagens Endogâmicas Recombinantes (RILs) (VOORRIPS et al., 2000). As RILs foram cultivadas em cinco ambientes maternos, denominados RIL 1, RIL 2, RIL 3, RIL 4 e RIL 5, sob condições controladas em casas-de-vegetação da Universidade de Wageningen [Wageningen University (WUR) - Unifarm WUR, Holanda] e de três empresas holandesas de melhoramento vegetal (Tabela 3.1). Foram cultivadas no mínimo duas plantas por ambiente materno.

Tabela 3.1 – População de RILs de *S. lycopersicum* (cv. Moneymaker, 'Money') × *S. pimpinellifolium* (G1.1554, 'Pimp') cultivadas em cinco ambientes maternos em casa-de-vegetação.

Ambiente Materno (RILs)	NO ⁻³ (mM)	P ⁺ (mM)	Substrato	Fotoperíodo Luz/Escuro (hrs)	Temperatura Diurna/Noturna (°C)	Local de produção
RIL 1	14,0	10,0	Lã de Rocha	16/8	≈25/15	WUR
RIL 2	1,4	1,0	Lã de Rocha	16/8	≈25/15	WUR
RIL 3	≈8,0	≈1,0	Solo	16/8	≈25/15	Empresa 1
RIL 4	14,0	2,0	Fibra de Coco	16/8	≈25/15	Empresa 2
RIL 5	14,0	1,0	Lã de Rocha	16/8	≈25/15	Empresa 3

Fonte: o próprio autor

3.4.2 Coleção de Sementes

As flores foram polinizadas manualmente duas vezes por semana. A colheita dos frutos foi realizada em duas ou três ocasiões por planta para obter a quantidade suficiente de sementes, sendo que os frutos da primeira colheita foram descartados. As sementes foram coletadas de frutos maduros e extraídas com ajuda de ácido clorídrico a 1% (HCl) por 1,5 h para remover a mucilagem aderente às sementes. As sementes foram enxaguadas em água com auxílio de uma peneira de malha fina para remover os resíduos e o ácido clorídrico, e imersas numa solução de fosfato trissódico (Na₃PO₄.12H₂O) para desinfecção.

Finalmente, as sementes foram secas em papel de filtro durante três dias a 20°C, limpas com a ajuda de um escovador de sementes (Seed Processing Holland BV, Enkhuizen, Holanda, <http://www.seedprocessing.nl>) para remover as impurezas e armazenadas em sacos de papel em condição ambiente.

3.4.3 Fenotipagem de Características de Qualidade de Semente de População de RILs

3.4.3.1 Teste de germinação

As sementes foram submetidas ao teste de germinação em quatro condições ambientais: Água (condição não-estressante = controle) e três condições de estresse - NaCl (estresse salino), Manitol (estresse osmótico) e Alta Temperatura (estresse térmico). Para isso, utilizou-se duas repetições de 50 sementes cada; com sementes dos progenitores Money e Pimp e da população de Linhagens Endogâmicas Recombinantes (RILs) (Tabela 3.1).

As sementes foram semeadas em condições assépticas em bandejas de germinação (21 × 15 cm DBP Plastics, <http://www.dbp.be>), contendo uma folha de papel de filtro branco (20.2 × 14.3 cm; Allpaper, <http://www.allpaper.nl>). Para umedecer o substrato, utilizou-se 15 mL de água Milli-Q para os tratamentos sob Água e Alta Temperatura e 15 mL de soluções de NaCl e Manitol para os tratamentos sob estresse salino e osmótico, respectivamente.

As condições de estresse salino e osmótico foram obtidos por soluções aquosas com concentração de -0,5 MPa de NaCl e -0,5 MPa de manitol, respectivamente. As concentrações específicas de NaCl e Manitol foram determinadas de acordo com Michel e Radcliffe (1995).

As bandejas de germinação foram arranjadas em delineamento inteiramente casualizado. Um máximo de 17 bandejas foram empilhadas, sendo duas bandejas vazias colocadas na extremidade superior e inferior da pilha, contendo duas camadas de papel de filtro branco e 15 mL de água cada, para evitar a evaporação desigual. Cada pilha de bandejas foi coberta com tampa ajustada e envolta com saco de plástico transparente, fechada e incubada a 4°C durante três dias para estratificação. Posteriormente, acondicionou-as aleatoriamente em germinador (tipo 5042; Seed Processing Holland, <http://www.seedprocessing.nl>), a

25°C para as condições de Água, NaCl e Manitol e a 35°C para a condição de Alta Temperatura.

O experimento foi conduzido no escuro, exceto nos intervalos de contagem da germinação, a qual foi conduzida sob lâmpada fluorescente. A germinação foi avaliada visualmente, considerando germinada a semente com protrusão da radícula. As avaliações sucederam em intervalos de 12 horas até atingir a estabilização da germinação, ou seja, até não se observar germinação adicional durante 24 h.

3.4.3.2 Cálculo de G_{max} , t_{50}^{-1} , AUC e U_{8416}^{-1}

Neste estudo, para analisar diferentes parâmetros das curvas de germinação cumulativas, utilizou-se o módulo de ajuste do software Germinator (JOOSEN et al., 2010). As linhagens dos progenitores e da população de RILs foram submetidas às diferentes condições de germinação e avaliou-se as seguintes variáveis: Germinação Máxima (G_{max} , %), Taxa de Germinação [t_{50}^{-1} - Tempo recíproco para alcançar 50% de germinação de sementes viáveis (h^{-1})], Área sob a Curva de Germinação [AUC - Integração da curva ajustada entre $t = 0$ e um ponto final definido pelo usuário (x)] e a Uniformidade [U_{8416}^{-1} - Intervalo de tempo recíproco para germinar entre 84 e 16% de sementes viáveis (h^{-1})]. Foram calculados t_{50}^{-1} e U_{8416}^{-1} apenas para os tratamentos em que as sementes da maioria das linhagens dos progenitores e da população de RILs completaram uma fração correspondente a pelo menos 50 e 84% de germinação, respectivamente. Para os parâmetros de germinação, calculou-se a média das duas repetições e estas foram utilizadas para a análise de QTL.

3.4.4 Genotipagem

Os dados genotípicos foram obtidos com base no mapa de ligação gênica do tomate, o qual consiste em 12 grupos de ligação. Marcadores SNPs foram utilizados para estudar a segregação dos alelos parentais nas RILs provenientes do cruzamento entre *S. lycopersicum* (cv. Moneymaker, 'Money') × *S. pimpinellifolium* (G1.1554, 'Pimp') conforme metodologia proposta por Viquez-Zamora et al. (2013; 2014).

3.4.5 Identificação de QTLs

Baseado na genotipagem, para a identificação de QTLs para qualidade de semente (G_{max} , t_{50}^{-1} , AUC e U_{8416}^{-1}), utilizou-se o software de mapeamento MapQTL[®]6.0 (VAN OOIJEN; MALIEPAARD, 2003). As análises de QTL foram realizadas com base no mapa de ligação em marcadores estabelecidos das linhagens parentais e população de RILs, que contém 865 marcadores SNP (KAZMI et al., 2012). Um modelo de mapeamento de QTL múltiplo (MQM) foi utilizado para identificar QTLs potenciais (JANSEN et al., 1995) como implementado em MapQTL[®]6.0. Neste método, os marcadores dos progenitores foram selecionados para assumir o papel do QTL putativo como co-fatores para reduzir a variância residual.

Realizou-se uma análise de MQM em duas etapas. Na primeira, o mapeamento de intervalo convencional foi realizado a cada 2 cM; os perfis LOD do mapeamento de intervalos foram inspecionados e o marcador mais próximo de cada pico de LOD selecionado como cofator para realizar a análise de mapeamento de MQM. Vários ciclos foram realizados para se obter o número máximo de cofatores para a análise de MQM. Estes marcadores de cofatores foram então sujeitos a eliminação por retrogradação, tal como implementado em MapQTL[®]6.0, de modo a selecionar o melhor modelo para a segunda etapa da análise de MQM. O procedimento de eliminação por retrogradação retira um cofator de cada vez, de modo a criar um subconjunto de cofatores. A verossimilhança destes modelos de subconjuntos é comparada com a do modelo completo com todos os cofatores e o modelo de subconjunto que causa a menor alteração na verossimilhança é escolhido como o conjunto inicial para uma subsequente rodada de eliminação. Este processo continua até que a alteração na verossimilhança seja significativa de acordo com o p -valor = 0,05 para o teste. O conjunto de cofatores retidos foi utilizado na segunda fase da análise de MQM.

No perfil LOD final, os QTLs foram confirmados de acordo com o limiar de LOD variando de 2,0 a 7,0 (taxa de falso-positivo de todo o genoma, a 5%), dependendo do comprimento do mapa cromossômico e do número de pares cromossômicos (VAN OOIJEN, 1999). Para determinar se QTLs entre diferentes características foram significativamente co-localizados, primeiramente, foi determinado o número de QTLs de diferentes características com intervalos de

confiança sobrepostos. Em seguida, os intervalos de confiança de QTL foram randomizados 1000 vezes através do genoma, e a distribuição do número de QTLs sobrepostos de diferentes traços determinada. Se este número de QTLs aleatorizados fosse menor do que a sobreposição do QTL original em 95% das vezes, a co-localização foi considerada significativa.

Por fim, o *Heatmap* foi obtido com o auxílio do software R (R Core Team 2016).

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Variação Fenotípica em Características Relacionados à Qualidade de Semente - Mapeamento de QTLs para Diferentes Características

A análise de mapeamento de QTL múltiplo (MQM) revelou um total de 124 QTLs significativos, sendo: 39 sob condições de Água, 23 sob NaCl, 27 sob Manitol e 35 sob Alta Temperatura (Tabelas 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5).

Na Tabela 3.2 é possível observar que a maioria dos QTLs significativos relacionados as características de qualidade de semente sob não-estresse está presente nos cromossomos 6 e 11, em que foi identificado 11 QTLs em cada um destes cromossomos. No cromossomo 6 muitos QTLs foram identificados em torno da região 104,3 cM e no cromossomo 11 em torno de 36,1 cM.

Assim, torna-se possível identificar a região do(s) cromossomo(s) capaz de expressar as variáveis analisadas, a fim de estreitar as regiões genéticas, conduzindo ao mapeamento refinado dos cromossomos, com o intuito de fazer a identificação de genes responsáveis pelas características ligadas a qualidade de semente, e posterior clonagem. Esses resultados são de extrema importância para a tecnologia genômica, servindo de ferramenta para diversas áreas da biotecnologia e da genética.

Tabela 3.2 – QTLs significativos associados as características de qualidade de semente de tomate (G_{max} , t_{50}^{-1} , AUC e U_{8416}^{-1}) em população de RILs (*S. lycopersicum* × *S. pimpinellifolium*) cultivada em cinco ambientes maternos (RIL 1, RIL 2, RIL 3, RIL 4 e RIL 5) sob condição de germinação em Água.

Cromossomo ¹	Intervalo de confiança (cM)	Marcador ²	Escore LOD	Efeito aditivo ³	Variância (%)	Variância total
RIL 1 – Água – t_{50}^{-1}						
6	0,0-62,6	33676754	2,28	0,004551	10,0	22,2
11	8,8-36,1	48283991	2,8	-0,00417	12,2	
RIL 1 – Água – AUC						
6	0-61,6	33676754	2,43	11,0744	10,7	43,9
6	74,0-104,3	43761285	2,03	8,8081	9,0	
7	15,8-45,5	28076245	2,41	-9,1943	10,6	
11	13,4-36,1	48586795	3,15	-10,4661	13,6	
RIL 2 – Água – t_{50}^{-1}						
4	23,7-57,4	2773272	3,13	0,004064	13,4	70,7
6	90,7-104,3	43580814	3,69	0,004299	15,6	
8	59,6-91,5	58825288	3,34	-0,00438	14,3	
11	19,2-35,1	48283991	3,97	-0,00458	16,7	
12	0,0-17,5	542585	2,46	0,003515	10,7	
RIL 2 – Água – AUC						
4	24,2-47,2	2773272	2,91	11,5146	12,5	84,3
6	90,1-104,3	43580814	3,88	12,8939	16,4	
7	7,8-43,4	28076245	2,43	-11,0131	10,6	
8	62,6-92,1	58825288	3,91	-13,6274	16,5	
11	17,6-31,8	48283991	4,2	-13,8881	17,6	
12	0,0-22,4	542585	2,46	10,2908	10,7	
RIL 2 – Água – U_{8416}^{-1}						
7	7,8-46,1	28076245	2,13	-0,02496	9,3	32,9
8	53,6-95,8	58825288	2,94	-0,03124	12,7	
11	15,5-36,1	48586795	2,5	-0,027	10,9	
RIL 3 – Água – G_{max}						
2	0,0-24,9	32325113	2,3	-0,08635	10,1	10,1
RIL 3 – Água – t_{50}^{-1}						
1	26,4-119,9	72402911	2,04	-0,00383	9,0	49,5
1	119,9-152,4	86636577	2,28	-0,00322	10,0	
4	4,2-48,5	3143736	2,14	0,00314	9,5	
6	0,0-104,3	43580814	2,06	0,003073	9,1	
11	6,4-36,1	48283991	2,73	-0,00361	11,9	
RIL 3 – Água – AUC						
4	23,7-46,7	3143736	2,35	8,0157	10,3	29,3
6	0,0-58,7	33676754	2,34	9,4769	10,2	
11	0,0-43,5	5279605	2,01	-7,4862	8,8	
RIL 3 – Água – U_{8416}^{-1}						
7	0,0-74,7	55492731	2,03	-0,02105	9,0	9,0

Continua

Tabela 3.2 – Continuação...

Cromossomo ¹	Intervalo de confiança (cM)	Marcador ²	Escore LOD	Efeito aditivo ³	Variância (%)	Variância total
RIL 4 – Água – t_{50}^{-1}						
5	27,2-48,6	3036208	3,08	0,003842	13,9	26,6
11	7,4-32,8	7159216	2,81	-0,00371	12,7	
RIL 4 – Água – AUC						
6	0,0-68,4	33676754	2,23	10,2835	10,2	22,3
11	4,7-35,1	7159216	2,66	-9,518	12,1	
RIL 4 – Água – U_{8416}^{-1}						
6	0,0-48,0	31371391	2,53	0,028772	11,6	11,6
RIL 5 – Água – t_{50}^{-1}						
6	87,3-104,3	43580814	3,16	0,004651	13,5	31,1
11	12,3-35,1	48283991	4,19	-0,00528	17,6	
RIL 5 – Água – AUC						
6	87,0-104,3	43580814	2,7	9,2726	11,7	29,6
11	12,3-35,1	48586795	4,29	-11,4196	17,9	

¹Cromossomo em que os QTLs foram detectados.

²Marcador mais próximo da posição dos QTLs identificados.

³O sinal positivo e negativo significa que o alelo de *S. lycopersicum* e *S. pimpinellifolium* contribuiu para o aumento da característica no locus, respectivamente.

Fonte: o próprio autor

Em relação ao efeito aditivo, observou-se que a contribuição do alelo de *S. lycopersicum* e *S. pimpinellifolium* é semelhante para as características avaliadas quando as sementes germinaram sob condições de Água. O alelo de *S. lycopersicum* (sinal positivo) em QTLs no cromossomo 6 e o alelo de *S. pimpinellifolium* (sinal negativo) em QTLs no cromossomo 11 contribuíram para melhora das características (Tabela 3.2).

Quando as sementes foram submetidas à condição de NaCl, quatro QTLs foram identificados tanto no cromossomo 6 quanto no cromossomo 8. Todos os QTLs identificados no cromossomo 6 apresentam intervalo de confiança terminando em 104,3 cM, região que tem atraído a atenção devido aos muitos QTLs identificados para características da qualidade de semente. Além disso, foram identificados QTLs comuns tanto para condições de Água como de NaCl (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 – QTLs significativos associados as características de qualidade de semente de tomate (G_{max} , t_{50}^{-1} , AUC e U_{8416}^{-1}) em população de RILs (*S. lycopersicum* × *S. pimpinellifolium*) cultivada em cinco ambientes maternos (RIL 1, RIL 2, RIL 3, RIL 4 e RIL 5) sob condição de germinação em NaCl.

Cromossomo ¹	Intervalo de confiança (cM)	Marcador ²	Escore LOD	Efeito aditivo ³	Variância (%)	Variância total
RIL 1 – NaCl – t_{50}^{-1}						
6	81,0-104,3	43580814	2,76	0,001664	12,3	23,8
9	59,9-88,3	61256180	2,56	-0,00161	11,5	
RIL 1 – NaCl – AUC						
6	77,2-104,3	44673006	2,1	4,07356	9,5	19,6
11	1,0-41,1	48283991	2,25	-4,00443	10,1	
RIL 2 – NaCl – G_{max}						
4	57,9-88,7	55015520	2,9	0,193516	12,6	12,6
RIL 2 – NaCl – t_{50}^{-1}						
2	0,0-28,7	32325113	2,72	0,002361	12,2	62,8
4	0,0-91,8	55204967	2,09	0,001928	9,5	
6	86,5-104,3	44673006	2,89	0,002305	12,9	
7	6,8-40,6	28076245	2,54	-0,00238	11,5	
8	64,6-106,7	57382614	3,82	-0,00253	16,7	
RIL 2 – NaCl – AUC						
2	0,0-42,3	32325113	2,25	6,93581	10,2	36,1
4	2,7-84,6	54809312	2,27	6,19559	10,3	
8	62,6-91,5	57382614	3,54	-7,60832	15,6	
RIL 3 – NaCl – G_{max}						
1	62,8-105,2	72402911	2,58	-0,24656	11,5	34,1
2	81,1-94,8	49269256	2,84	-0,21013	12,6	
8	36,0-60,6	15684236	2,23	0,187325	10,0	
RIL 3 – NaCl – U_{8416}^{-1}						
3	12,1-116,3	58231771	2,08	-0,00407	9,5	9,5
RIL 4 – NaCl – G_{max}						
8	42,9-62,6	15684236	2,36	0,171901	10,8	10,8
RIL 4 – NaCl – t_{50}^{-1}						
9	15,2-35,0	3440493	3,15	-0,00191	14,4	14,4
RIL 4 – NaCl – AUC						
9	6,5-35,9	3440493	2,23	-4,90186	10,5	10,5
RIL 5 – NaCl – t_{50}^{-1}						
6	79,2-104,3	44673006	2,64	0,001817	11,7	22,6
11	12,3-36,1	48283991	2,46	-0,00167	10,9	
RIL 5 – NaCl – AUC						
11	12,3-37,3	48283991	2,35	-5,7102	10,3	10,3

¹Cromossomo em que os QTLs foram detectados.

²Marcador mais próximo da posição dos QTLs identificados.

³O sinal positivo e negativo significa que o alelo de *S. lycopersicum* e *S. pimpinellifolium* contribuiu para o aumento da característica no locus, respectivamente.

Fonte: o próprio autor

Os alelos de *S. lycopersicum* e *S. pimpinellifolium* contribuem de forma semelhante para a identificação de QTLs sob condições de Água e NaCl, uma vez que o efeito aditivo de Pimp é de 53,8% e 52,2%, respectivamente (Tabelas 3.2 e 3.3).

Com relação aos QTLs de qualidade de semente sob condição de Manitol, observou-se que a maioria dos QTLs significativos foram identificados novamente no cromossomo 6, sendo nove dos 27 QTLs identificados nessa condição (Tabela 3.4). Comparando os QTLs identificados nas condições de Água, NaCl e Manitol, observa-se que estas condições foram favoráveis na identificação de QTLs relacionados a t_{50}^{-1} e AUC (Tabelas 3.2, 3.3 e 3.4).

Tabela 3.4 – QTLs significativos associados as características de qualidade de semente de tomate (G_{max} , t_{50}^{-1} , AUC e U_{8416}^{-1}) em população de RILs (*S. lycopersicum* × *S. pimpinellifolium*) cultivada em cinco ambientes maternos (RIL 1, RIL 2, RIL 3, RIL 4 e RIL 5) sob condição de germinação em Manitol.

Cromossomo ¹	Intervalo de confiança (cM)	Marcador ²	Escore LOD	Efeito aditivo ³	Variância (%)	Variância total
RIL 1 – Manitol – G_{max}						
4	58,4-93,0	54809312	2,29	0,145644	10,2	19,8
6	0,0-104,3	33676754	2,15	0,169311	9,6	
RIL 1 – Manitol – t_{50}^{-1}						
6	79,2-104,3	43761285	2,81	0,001773	12,5	25,0
11	12,9-37,3	48283991	2,81	-0,00171	12,5	
RIL 1 – Manitol – AUC						
6	78,2-104,3	43761285	2,26	4,89176	10,2	20,2
11	7,4-41,1	48283991	2,23	-4,67597	10,0	
RIL 2 – Manitol – t_{50}^{-1}						
2	12,3-24,9	33753248	3,68	0,002885	15,6	54,7
4	27,2-61,2	4936160	3,28	0,00238	14,0	
6	78,2-104,3	43761285	3,1	0,002389	13,3	
11	12,3-37,3	48283991	2,71	-0,00225	11,8	
RIL 2 – Manitol – AUC						
2	1,6-48,7	33753248	2,57	41,815	11,2	45,4
4	21,0-109,3	55015520	2,28	34,972	10,0	
6	80,2-104,3	44673006	3,02	41,453	13,0	
11	12,3-33,8	47411518	2,57	-36,732	11,2	
RIL 2 – Manitol – U_{8416}^{-1}						
6	77,2-104,1	41853344	3,15	0,009511	13,5	13,5
RIL 3 – Manitol – G_{max}						
1	42,5-119,9	72402911	2,07	-0,2227	9,1	21,9
2	87,7-94,8	49269256	2,98	-0,2149	12,8	

Continua

Tabela 3.4 – Continuação...

Cromossomo ¹	Intervalo de confiança (cM)	Marcador ²	Escore LOD	Efeito aditivo ³	Variância (%)	Variância total
RIL 3 – Manitol – t_{50}^{-1}						
11	0,0-37,9	46409027	2,37	-0,00158	10,6	10,6
RIL 4 – Manitol – G_{max}						
6	0,0-60,0	2043158	2,68	0,203046	13,0	13,0
RIL 4 – Manitol – t_{50}^{-1}						
9	8,0-44,6	3440493	2,67	-0,00209	13,3	24,4
10	0,0-78,7	20239670	2,2	-0,00225	11,1	
RIL 5 – Manitol – t_{50}^{-1}						
2	0,0-28,0	33753248	2,57	0,002147	11,4	30,5
6	77,2-104,3	44673006	2,15	0,001761	9,6	
9	21,8-117,9	61256180	2,12	-0,00168	9,5	
RIL 5 – Manitol – AUC						
2	0,0-28,0	33753248	2,52	7,19656	11,2	31,7
6	77,2-104,3	44903420	2,27	5,82372	10,1	
9	48,3-72,6	58088185	2,34	-5,92005	10,4	

¹Cromossomo em que os QTLs foram detectados.

²Marcador mais próximo da posição dos QTLs identificados.

³O sinal positivo e negativo significa que o alelo de *S. lycopersicum* e *S. pimpinellifolium* contribuiu para o aumento da característica no locus, respectivamente.

Fonte: o próprio autor

Nos dados da qualidade de semente estudada sob condições de germinação em Alta Temperatura observa-se que a maior parte dos QTLs identificados está no cromossomo 6 e 11, já que dos 35 QTLs identificados nesta condição, 12 e oito QTLs de características de qualidade de semente foram identificados nestes cromossomos, respectivamente (Tabela 3.5).

Na análise dos dados da Tabela 3.5 é possível verificar que o alelo de *S. pimpinellifolium* tem grande contribuição em G_{max} sob condicionamento em Alta Temperatura na maioria das RILs avaliadas. Além disso, a identificação de QTLs para G_{max} foi favorável sob Alta Temperatura, com 56% dos QTLs para esta característica. Isso mostra a importância da identificação de QTLs em diferentes condições ambientais, uma vez que há diferenciação na identificação de QTL de acordo com as condições em que as sementes são submetidas à germinação.

Tabela 3.5 – QTLs significativos associados as características de qualidade de semente de tomate (G_{max} , t_{50}^{-1} , AUC e U_{8416}^{-1}) em população de RILs (*S. lycopersicum* × *S. pimpinellifolium*) cultivada em cinco ambientes maternos (RIL 1, RIL 2, RIL 3, RIL 4 e RIL 5) sob condição de germinação em Alta Temperatura.

Cromossomo ¹	Intervalo de confiança (cM)	Marcador ²	Escore LOD	Efeito aditivo ³	Variância (%)	Variância total
RIL 1 – Alta Temperatura – G_{max}						
6	0,0-68,4	33676754	2,18	0,091607	9,7	20,0
11	0,0-30,8	5174517	2,32	-0,08771	10,3	
RIL 1 – Alta Temperatura – t_{50}^{-1}						
6	85,3-104,3	44673006	2,91	0,004616	13,1	13,1
RIL 1 – Alta Temperatura – AUC						
6	76,7-104,3	44673006	2,52	13,387	11,5	11,5
RIL 1 – Alta Temperatura – U_{8416}^{-1}						
6	0,0-48,0	29163698	2,42	0,011426	11,1	11,1
RIL 2 – Alta Temperatura – G_{max}						
11	17,6-30,1	47009022	4,05	-0,11921	17,0	17,0
RIL 2 – Alta Temperatura – t_{50}^{-1}						
3	0,0-123,9	seq-rs6541	2,03	-0,00553	9,1	34,8
6	90,7-104,3	43761285	3,22	0,005404	14,0	
11	7,4-35,1	48283991	2,66	-0,00499	11,7	
RIL 2 – Alta Temperatura – AUC						
11	17,6-29,1	47009022	4,08	-60,448	17,5	17,5
RIL 3 – Alta Temperatura – G_{max}						
1	119,9-128,6	83852566	3,09	-0,11203	13,5	57,9
2	68,0-94,8	49087421	2,65	-0,10623	11,7	
6	0,0-85,3	35229841	2,06	0,094336	9,2	
9	0,0-33,3	3440493	2,56	-0,11297	11,3	
11	0,0-27,8	46409027	2,76	-0,10793	12,2	
RIL 3 – Alta Temperatura – t_{50}^{-1}						
6	76,7-104,3	44673006	2,1	0,003741	9,5	23,5
9	5,5-33,3	3440493	3,17	-0,00488	14,0	
RIL 3 – Alta Temperatura – AUC						
1	119,9-152,4	83444565	2,36	-13,1303	10,6	37,1
9	12,7-31,3	3440493	3,58	-17,8161	15,6	
11	0,0-34,1	46409027	2,42	-13,4063	10,9	
RIL 4 – Alta Temperatura – G_{max}						
1	119,9-152,4	83852566	2,15	-0,07877	10,1	25,1
11	0,0-13,4	5148492	3,27	-0,09746	15,0	
RIL 4 – Alta Temperatura – t_{50}^{-1}						
6	90,7-104,3	44903420	3,21	0,004587	14,8	35,2
9	14,2-32,3	3440493	4,56	-0,00609	20,4	
RIL 4 – Alta Temperatura – AUC						
6	90,7-104,3	44903420	2,95	14,4103	13,7	34,7
9	14,2-31,3	3440493	4,71	-19,9565	21,0	

Continua

Tabela 3.5 – Continuação...

Cromossomo ¹	Intervalo de confiança (cM)	Marcador ²	Escore LOD	Efeito aditivo ³	Variância (%)	Variância total
RIL 5 – Alta Temperatura – G _{max}						
1	119,9-152,4	83852566	2,13	-0,09007	9,5	42,0
2	41,3-94,8	47296020	2,09	-0,08988	9,4	
6	0,0-104,3	34172904	2,03	0,089517	9,1	
11	0,0-30,1	46409027	3,21	-0,11075	14,0	
RIL 5 – Alta Temperatura – t ₅₀ ⁻¹						
3	17,6-123,9	seq-rs6541	2,07	-0,00376	9,5	34,0
6	90,7-104,3	44673006	3,4	0,004974	15,0	
10	0,0-20,7	274856	2,09	-0,00383	9,5	
RIL 5 – Alta Temperatura – AUC						
3	22,3-123,9	seq-rs6541	2,13	-12,4127	9,7	22,4
6	89,1-104,3	44673006	2,83	14,8653	12,7	

¹Cromossomo em que os QTLs foram detectados.

²Marcador mais próximo da posição dos QTLs identificados.

³O sinal positivo e negativo significa que o alelo de *S. lycopersicum* e *S. pimpinellifolium* contribuiu para o aumento da característica no locus, respectivamente.

Fonte: o próprio autor

3.5.2 Influência do Ambiente Materno na Identificação de QTLs

Assim como o ambiente de germinação influenciou na identificação de QTLs, também ocorreu o efeito do ambiente materno, pois quanto menor o teor de nitrato no cultivo das RILs, maior a contribuição para a identificação de QTLs. As RILs 2 e 3, as quais foram conduzidas em 1,4 mM e ≈8,0 mM de NO⁻³, foram as que permitiram maior identificação de QTLs, num total de 36 e 27 QTLs significativos, respectivamente (Tabelas 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5). Nas demais RILs, que foram conduzidos em ambiente materno com maior teor de nitrato (14,0 mM), foi possível identificar menos QTLs: 22 na RIL 5, 21 na RIL 1 e 17 na RIL 4.

3.5.3 Efeito Aditivo dos Progenitores

Em relação ao efeito aditivo dos progenitores, o alelo de Pimp sob Alta Temperatura contribuiu em 65,7% dos QTLs identificados (Tabela 3.5), o que difere da tendência observada nas demais condições de germinação. Vale ressaltar que a condição ambiental de germinação influencia o efeito aditivo, considerando que sob condições de Água e NaCl o efeito aditivo foi equilibrado (53,8% e 52,2%,

respectivamente) e sob condição de Manitol, apenas 40,7% dos QTLs apresentaram efeito aditivo de Pimp.

Mas, em geral, ocorreu uma contribuição equivalente quanto ao efeito aditivo dos alelos de *S. lycopersicum* e *S. pimpinellifolium* ao considerar conjuntamente todas as condições de germinação, uma vez que dos 124 QTLs identificados, 57 apresentaram efeito aditivo do alelo de Money, sendo que o de Pimp aumentou as características em 67 QTLs, ou seja, cerca de 54,0% dos alelos favoráveis foram derivados do parental *S. pimpinellifolium* (efeitos aditivo negativos nas Tabelas 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5). Embora *S. pimpinellifolium* seja uma espécie selvagem, esta apresenta características favoráveis para utilização em programas de melhoramento, confirmando que é de extrema importância em estudos e na produção de tomate.

Além disso, observou-se que os alelos dos progenitores favoreceram a otimização das características em cromossomos específicos. Pois, apenas o alelo de Money favoreceu o efeito aditivo nos cromossomos 4, 5, 6 e 12, já o alelo Pimp contribuiu nos cromossomos 1, 3, 7, 9, 10 e 11, de acordo com os QTLs significativos obtidos. No entanto, o efeito aditivo de ambos os parentais ocorreu apenas nos cromossomos 2 e 8. Assim, cada parental tem maior influência na expressão do fenótipo em determinado cromossomo.

3.5.4 Localização e Sobreposição de QTLs

Na Figura 3.1 encontra-se um *heatmap* com perfis LOD, onde é possível visualizar os QTLs, as *hotspots* e as regiões vazias ao longo dos 12 cromossomos do tomate. A co-localização de QTLs foi encontrada para diferentes características de qualidade de semente.

Detectou-se um resultado interessante após a análise das Tabelas 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5 e do *heatmap*, uma vez que existem 3 QTLs presentes no mesmo cromossomo, dentro do mesmo intervalo de confiança para as mesmas características e na mesma RIL independente da condição de germinação em que as sementes foram submetidas: (1) QTL no cromossomo 6 no intervalo de confiança entre 74,0-104,3 cM para AUC na RIL 1, (2) QTL no cromossomo 6 no intervalo de confiança entre 78,2-104,3 cM para t_{50}^{-1} na RIL 2 e (3) QTL no cromossomo 6 no intervalo de confiança entre 77,2-104,3 cM para t_{50}^{-1} na RIL 5.

3.5.5 Explorando a Análise de QTLs

No total 124 QTLs significativos foram identificados para todas as características avaliadas, sendo 25 para G_{max} , 49 para t_{50}^{-1} , 42 para AUC e apenas oito para U_{8416}^{-1} com escores LOD na faixa de 2,01 a 4,71. As variâncias para QTL único variaram de 8,8% para o QTL no cromossomo 11 para AUC (RIL 3 - Condição da Água) a 21,0% para o QTL no cromossomo 9 para AUC (RIL 4 - Condição de Alta Temperatura). A variância total para diferentes características causadas por estes QTLs foi de 9,0% para U_{8416}^{-1} (RIL 3 - Condição de Água) a 84,3% para AUC (RIL 2 - Condição de Água).

O maior número de QTLs identificados foi nos cromossomos 6 e 11, com 36 e 27 QTLs, respectivamente. O intervalo de confiança entre 0,0-104,3 cM no cromossomo 6 entre 0,0-36,1 cM no cromossomo 11 se destacaram, uma vez que muitos QTLs foram identificados em todas as condições avaliadas. Portanto, tanto o cromossomo 6 como o cromossomo 11 se sobressairam para as características de qualidade de semente e merecem atenção para estudos futuros.

3.6 DISCUSSÃO

3.6.1 Controle Genético - Efeito Aditivo dos Parentais

A complexidade do controle genético das características de qualidade de semente e a influência dos ambientes maternos e de germinação na detecção de QTLs foram observadas durante o estudo. As contribuições para a qualidade de semente de ambos os genótipos dos parentais produziram segregação transgressiva para algumas características. Os progenitores contribuíram de maneira balanceada, considerando todas as condições ambientais de germinação em conjunto, uma vez que 46,0% e 54,0% dos alelos favoráveis foram derivados de parentais *S. lycopersicum* e *S. pimpinellifolium*, respectivamente.

No entanto, Khan et al. (2012), estudando características de semente e plântula na mesma população de RIL (*S. lycopersicum* × *S. pimpinellifolium*), identificaram que 62,5% dos QTLs significativos foram aumentados pelo alelo de *S. lycopersicum*. Assim, cada parental contribui mais para uma determinada característica do que para outra. No presente estudo, em condições de

Alta Temperatura o efeito aditivo de *S. lycopersicum* foi ainda menor, uma vez que apenas 34,3% dos QTLs significativos apresentam efeito aditivo deste, confirmando que o ambiente influencia a expressão de QTLs. Estes resultados são importantes em programas de melhoramento para obtenção do genótipo desejado, confirmando as interações genótipo x ambiente.

Além disso, observou-se que o efeito aditivo está mais interconectado ao cromossomo no qual a característica está ligada do que propriamente a característica de qualidade de semente, tendo em vista que nos cromossomos 4, 5, 6 e 12, todos os QTLs identificados tiveram um efeito aditivo do alelo de Money e para os cromossomas 1, 3, 7, 9, 10 e 11 apenas o alelo Pimp contribuiu.

Neste estudo, foram detectados 124 QTLs com efeitos fenotípicos que influenciam quatro atributos de qualidade de semente de tomate de forma consistente sob diferentes condições de estresse. Assim, observou-se que esta população forneceu uma fonte valiosa para explorar os genes que influenciam complexos fenótipos para a qualidade de semente, tendo em vista ter permitido o isolamento do efeito de um QTL específico daqueles do genoma inteiro e, conseqüentemente, aumentado o poder estatístico para desvendar fenótipos quantitativos de qualidade de semente, controlando mecanismos complexos subjacentes.

Vale ressaltar que foi encontrado a maioria dos QTLs significativos para as características de qualidade de semente nos cromossomos 6 e 11. Estes resultados estão de acordo com os relatados por Khan et al. (2012), que avaliaram QTLs para características de semente e plântula e também encontraram QTLs significativos localizados nos cromossomos 1, 6, 9 e 11.

3.6.2 Influência do Ambiente Materno na Identificação de QTL

De acordo com He et al. (2014), o ambiente materno, como a intensidade de luz, o fotoperíodo, a temperatura e o teor de nitrato e de fosfato, especialmente durante o desenvolvimento da semente, influencia a sua qualidade, como a massa, o rendimento, a capacidade de germinar e a longevidade. Da mesma forma, Postma e Ågren (2015) observaram interações entre o genótipo de semente de *Arabidopsis thaliana* e o ambiente materno.

No presente estudo observou-se que o ambiente materno tem influência na identificação de QTLs significativos. As RILs cultivadas em ambiente materno com menor teor de nitrato (NO^{-3}) favoreceram a identificação de mais QTLs, já que na RIL 2 e na RIL 3 foram identificados 36 e 27 QTLs, respectivamente (Tabelas 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5). Nas demais RILs, que foram conduzidos em ambientes maternos com maior teor de nitrato (14 mM), foi possível identificar menos QTLs, como 22 na RIL 5, 21 na RIL 1 e 17 na RIL 4. Estas constatações corroboram com Postma e Ågren (2015), os quais observaram interação ambiente materno \times QTL significativo, demonstrando a importância de se estudar a base genética de características supostamente adaptativas sob condições relevantes.

As fontes de variação dos ambientes maternos, basicamente, foram os níveis de nitrato e fosfato e, quando analisado os QTLs identificados, o teor de nitrato no cultivo das plantas influenciou mais do que o teor de fosfato, visto que foi identificado mais QTLs em RILs cultivadas em ambiente com menor teor de nitrato. He et al. (2014), relataram que o nitrato afetou mais características de planta e de semente comparado ao fosfato, que teve menor influência nesses caracteres. Assim, esses autores identificaram interação entre genótipo e ambiente materno e mostraram o fato de que genótipos individuais responderam diferencialmente às condições ambientais.

Neste sentido, há QTLs que foram identificados em todos os ambientes maternos (RIL 1, RIL 2, RIL 3, RIL 4 e RIL5) como é o caso do QTL para t_{50}^{-1} no cromossomo 6 e para t_{50}^{-1} no cromossomo 11. No entanto, outros QTLs são fortemente afetados pelo ambiente materno, como é o caso dos QTLs a seguir, os quais foram identificados especificamente em apenas um ambiente materno: (1) no ambiente materno 2 (RIL 2) para t_{50}^{-1} e AUC nos cromossomos 8 e 12 e para U_{8416}^{-1} nos cromossomos 8 e 11; (2) no ambiente materno 3 (RIL 3) para t_{50}^{-1} no cromossomo 1 e para U_{8416}^{-1} no cromossomo 3; (3) no ambiente materno 4 (RIL 4) para t_{50}^{-1} no cromossomo 5 e (4) no ambiente materno 5 (RIL 5) para AUC no cromossomo 3. O único ambiente materno que não foi possível identificar QTL específico foi o ambiente materno 1 (RIL 1).

3.6.3 Interpretação das Características de Germinação de Semente

Uma das discussões em sementes diz respeito à medição de características de germinação, pois o tempo, a taxa, a homogeneidade e a sincronia de germinação fornecem informações sobre a dinâmica do processo. Estas características são importantes para os fisiologistas e tecnólogos de sementes, uma vez que está no cerne da compreensão do potencial de germinação dos lotes de sementes (KAZMI et al., 2012).

Estudos descrevendo a caracterização genética da qualidade de semente e a exploração da variação natural utilizando diferentes populações de mapeamento para fenótipos de germinação têm sido publicados, como em Arabidopsis, tomate, trigo e cevada (QUESADA et al. 2002; FOOLAD et al. 2003; FOOLAD; ZHANG; SUBBIAH, 2003; CLERKX et al. 2004; LANGRIDGE; PALTRIDGE; FINCHER, 2006; FOOLAD; SUBBIAH; ZHANG, 2007; LANDJEVA; LOHWASSER; BORNER, 2010). Porém, devido à importância deste assunto, estudos nessa área considerando o efeito do ambiente materno e de germinação conjuntamente, é inovador e de extrema importância, devido saber da influência de ambos fatores na identificação de QTLs como relatado ao longo deste trabalho.

Portanto, esse trabalho é um esforço de indexação de diferentes aspectos da germinação cumulativa para identificar em quais cromossomos de tomate e em quais regiões destes os genes podem ter ação que influenciam a expressão de características de qualidade de semente, em lotes desenvolvidos sob diferentes ambientes maternos e submetidos à germinação em condições de não-estresse e estresse.

A germinação máxima (G_{max}) de sementes é um dos atributos qualitativos do processo de germinação. Embora a G_{max} seja um fator importante para estimar o rendimento esperado de plântulas, a análise de germinação pode ser enriquecida se os valores de t_{10}^{-1} (Tempo recíproco para alcançar 10% de germinação de sementes viáveis), t_{50}^{-1} , TMG (Taxa média de germinação), U_{7525}^{-1} (Intervalo de tempo recíproco para germinar entre 75 e 25% de sementes viáveis) e AUC forem acrescentados, por medirem diferentes aspectos do processo de germinação (KAZMI et al., 2012). Segundo El-Kassaby (1991) os parâmetros de germinação estão, muitas vezes, sob forte controle genético e, portanto, analisar diferentes aspectos das curvas de germinação cumulativas é de extrema importância

com relação às consequências da diversidade genética presente em população de RIL de *S. lycopersicum* × *S. pimpinellifolium*.

QTLs para características de qualidade de semente (G_{\max} , t_{50}^{-1} , AUC e U_{8416}^{-1}) foram identificados nas mesmas regiões genômicas ou localização aproximada, como no cromossomo 6 no intervalo de confiança entre 0-104,3 cM e no cromossomo 11 entre 0-36,1 cM, e que estas regiões genômicas mostram forte influência sobre QTLs para a qualidade de semente. Kazmi et al. (2012) realizaram análise de QTL com os parâmetros de germinação G_{\max} , t_{10}^{-1} , t_{50}^{-1} , MGR, U_{7525}^{-1} e AUC, e encontraram comportamento semelhante ao observado no presente estudo; onde QTLs para diferentes características foram mapeados aproximadamente no mesmo local, indicando que fatores comuns estão associados à características de qualidade de semente mesmo em diferentes condições de germinação.

3.6.4 Influência do Ambiente de Germinação - Sobreposição de QTL entre os Fenótipos de Qualidade de Semente

O reconhecimento e a avaliação das fontes de variação da qualidade de semente é essencial para o desenvolvimento da compreensão de como os fenótipos de sementes de tomate interagem em diferentes condições (KHAN, 2013).

As interações genótipo × ambiente são importantes para a expressão de QTLs (KHAN et al., 2012). A detecção de QTLs para características de germinação sob condições controle e de estresse sugerem a presença de relações genéticas entre a capacidade de germinar rapidamente sob diferentes meios e a previsão de que a seleção e otimização da germinação de sementes sob um ambiente conduziria à progênie com maior germinação sob outros (KAZMI et al., 2012).

No estudo, a identificação de diferentes QTLs em todos os ambientes indica que as condições que as sementes foram submetidas à germinação foram eficientes para detectar QTLs significativos. Além disso, QTLs são sensíveis as condições de germinação, uma vez que a quantidade variou de acordo com o ambiente. A maior quantidade foi obtida em condição de não-estresse (Água), 39 QTLs, quando comparado à condições de estresse salino (23 em NaCl), osmótico (27 em Manitol) e térmico (35 em Alta Temperatura) (Tabelas 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5). Assim, o estudo corrobora com Kazmi et al. (2012) e Khan et al. (2012), que também

identificaram QTLs para qualidade de semente em condições de não-estresse e estresse, sendo que uma proporção substancial foi encontrada em mais de uma condição. Portanto, com conclusão semelhante a Tanksley (1993), que uma proporção substancial de QTLs que afetam uma característica pode ser identificada em diferentes ambientes (Figura 3.1).

Como a qualidade de semente é atribuída a vários estresses, tais como seca, salinidade e altas temperaturas, confirma-se a hipótese de co-localização de QTLs para condições de não-estresse e estresse, tendo em vista as sobreposições de QTLs (Figura 3.1). Resultados semelhantes foram obtidos por Kazmi et al. (2012), que observaram nos cromossomos 4, 6 e 11 que o intervalo de confiança de QTLs para G_{max} e AUC sobrepuseram aos detectados para t_{10}^{-1} , t_{50}^{-1} e TMG em diferentes condições de estresse.

As co-localizações de QTLs identificadas no presente estudo indicaram um número variável de agrupamentos de sobreposição de QTL. QTLs sobrepostos foram encontrados no cromossomo 6 em todas as condições de germinação em intervalo de confiança entre 74,0-104,3 cM para AUC na RIL 1, entre 78,2-104,3 cM para t_{50}^{-1} na RIL 2 e entre 77,2-104,3 cM para t_{50}^{-1} na RIL 5 (Tabelas 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5). Os presentes resultados corroboram com Foolad, Subbiah e Zhang (2007) os quais observaram, em estudos de mapeamento de QTL de germinação sob salinidade, seca e estresse de frio em tomate, que 71% dos QTLs detectados afetaram a germinação sob mais de uma condição de estresse.

De acordo com Bray (2002), a magnitude dos diferentes estresses ambientais é variável no solo e a tolerância a este depende do seu estágio, duração e severidade. Estes resultados indicam que as sementes respondem a um ou mais estresses através de mecanismos fisiológicos dependendo da natureza e magnitude (CAPIATI; PAÍS; TÉLLEZ-IÑÓN, 2006).

Além disso, a inspeção dos QTLs afetando parâmetros individuais em diferentes cromossomos também revelou *hotspots* significativos para um parâmetro, mas não para outros. Exemplo disto ocorreu no cromossomo 5 apenas um QTL para AUC sob condição de água, enquanto que no cromossomo 3 identificou um QTL para AUC sob Alta Temperatura e dois para t_{50}^{-1} sob Alta Temperatura. Quanto ao cromossomo 10, foi identificado apenas um QTL para t_{50}^{-1} sob Manitol e um para t_{50}^{-1} sob Alta Temperatura.

A identificação de QTLs para condições não-estressantes indica as relações genéticas entre os fenótipos de germinação sob condições de estresse e não-estresse, e uma vez que a germinação de tomate é geneticamente controlada, esta pode ser aumentada por seleção (FOOLAD; LIN; CHEN, 1999). Para Vallejo, Yanovsky e Botto (2010), a regulação da germinação sob estresse salino e osmótico envolve a ação de loci comuns e independentes, revelando a existência de loci especificamente associados ao componente tóxico do sal e não apenas seu efeito osmótico.

A sobreposição de QTLs entre respostas de germinação sob diferentes condições de estresse indica que genes semelhantes ou idênticos contribuíram para isto. Assim, a seleção para germinação rápida em um nível de estresse resultaria em progênie com maior germinação em diversos ambientes. No entanto, a co-localização de QTLs para diferentes características de germinação suporta a dissecação genética da qualidade de semente, a fim de facilitar uma abordagem mais estratégica para a produção de semente em tomate com melhor qualidade. Essas regiões identificadas em diferentes ambientes de germinação poderão ser utilizadas na seleção assistida por marcadores (SAM) ou na clonagem gênica (DUDLEY, 1993; TANKSLEY, 1993). No entanto, o isolamento, a caracterização e a comparação de genes funcionais que facilitam a rápida germinação de sementes sob as várias condições, são necessários para determinar as relações genéticas (KAZMI et al., 2012).

3.6.5 Considerações

O estudo ilustra a complexidade implícita à base genética para a germinação de sementes, porém de importância devido a identificação de QTLs associados aos diferentes parâmetros de germinação em condições ambientais ajudar a elucidar os mecanismos moleculares que controlam este processo. Como sugerido por distribuições de características transgressivas dentro de RILs cultivadas em diferentes ambientes maternos, ambos os genótipos dos parentais *S. lycopersicum* cv. Moneymaker e *S. pimpinellifolium* contribuíram para o aumento das médias de características para diferentes parâmetros de germinação sob diferentes condições.

No estudo observou-se influência do ambiente de germinação no efeito aditivo do alelo Money e Pimp. Por esta razão, é necessário avaliar as características de sementes em diferentes ambientes, uma vez que todos esses fatores influenciam as características de qualidade das sementes e a identificação de QTLs.

A variação fenotípica nos dois parentais, assim como na população de RILs e a resolução e o tamanho desta população foi suficiente para encontrar QTLs para qualidade de semente, mostrando que esta população de RIL é uma ferramenta para o estudo de caracteres quantitativos. Foram utilizadas condições de crescimento de plantas homogêneas, indicando que as características mensuradas possuem uma forte regulação genética. De acordo com Hayashi, Aoyama e Still (2008), dado o resultado que os alelos presentes em ambas as espécies servem para aumentar a capacidade de completar a germinação sob estresse ambiental, a melhoria das características de germinação deve ser conduzida a um nível individual de QTL.

O mapeamento de QTLs associados à características-chave de semente e vigor de plântula em tomateiro abrirá oportunidades para melhorar a eficiência de melhoramento e seleção de plantas para linhagens com maior vigor de semente e, conseqüentemente, estabelecimento de plântula e da cultura como um todo. Os marcadores moleculares ligados aos QTLs para qualidade de semente podem ser utilizados na SAM, proporcionando um método rápido para selecionar genótipos específicos sem a necessidade de avaliar extensivamente fenótipos em todas as fases do programa de melhoramento. Além disso, estudos futuros devem acompanhar os QTLs definidos por mapeamento refinado, otimizar a seleção de genes candidatos pelo uso de um conjunto de ferramentas genômicas e, assim, elucidar os mecanismos moleculares que controlam o vigor de semente e de plântula (JOOSEN et al., 2009; LIGTERINK; JOOSEN; HILHORST, 2012).

3.7 REFERÊNCIAS

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K.; HILHORST, H.; NONOGAKI, H. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3. ed. New York: Springer-Verlag, 2013. 392 p.

BOLGER, A.; SCOSSA, F.; BOLGER, M. E.; LANZ, C.; MAUMUS, F.; TOHGE, T.; QUESNEVILLE, H.; ALSEEKH, S.; SØRENSEN, I.; LICHTENSTEIN, G.; FICH, E. A.; CONTE, M.; KELLER, H.; SCHNEEBERGER, K.; SCHWACKE, R.; OFNER, I.; VREBALOV, J.; XU, Y.; OSORIO, S.; AFLITOS, S. A.; SCHIJLEN, E.; JIMÉNEZ-GOMÉZ, J. M.; RYNGAJLLO, M.; KIMURA, S.; KUMAR, R.; KOENIG, D.; HEADLAND, L. R.; MALOOF, J. N.; SINHA, N.; VAN HAM, R. C. H. J.; LANKHORST, R. K.; MAO, L.; VOGEL, A.; ARSOVA, B.; PANSTRUGA, R.; FEI, Z.; ROSE, J. K. C.; ZAMIR, D.; CARRARI, F.; GIOVANNONI, J. J.; WEIGEL, D.; USADEL, B.; FERNIE, A. R. The genome of the stress-tolerant wild tomato species *Solanum pennellii*. **Nature Genetics**, v. 46, n. 9, p. 1034-1038, 2014.

BRADFORD, K. J.; NONOGAKI, H. **Seed development, dormancy and germination**. Sheffield: Blackwell Publishing. 2007. 392 p.

BRAY, E. A. Abscisic acid regulation of gene expression during water - deficit stress in the era of the Arabidopsis genome. **Plant Cell and Environment**, v. 25, n. 2, p. 153-161, 2002.

BURR, B.; BURR, F. A. Recombinant inbreeds for molecular mapping in maize: theoretical and practical considerations. **Trends in Genetics**, v. 7, p. 55-60, 1991.

CAPIATI, D. A.; PAÍS, S. M.; TÉLLEZ-IÑÓN, M. T. Wounding increases salt tolerance in tomato plants: evidence on the participation of calmodulin-like activities in cross-tolerance signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 10, p. 2391-2400, 2006.

CAPEL, C.; DEL CARMEN, A. F.; ALBA, J. M.; LIMA-SILVA, V.; HERNANDEZ-GRAS, F.; SALINAS, M.; BORONAT, A.; ANGOSTO, T.; BOTELLA, M. A.; FERNANDEZ-MUNOZ, R.; GRANELL, A.; CAPEL, J.; LOZANO, R. Wide-genome QTL mapping of fruit quality traits in a tomato RIL population derived from the wild-relative species *Solanum pimpinellifolium* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 128, p. 2019-2035, 2015.

CASTRO, J.; HÓDAR, J. A.; GÓMEZ, J. M. Seed size. In: Basra, A. S. (Eds.). **Handbook of Seed Science and Technology**. New York: CRC Press, 2006, p. 397-428.

CAUSSE, M.; SALIBA-COLOMBANI, V.; LECOMTE, L.; DUFFEÂ, P.; ROUSSELLE, P.; BURET, M. QTL analysis of fruit quality in fresh market tomato: a few chromosome regions control the variation of sensory and instrumental traits. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 377, p. 2089-2098, 2002.

CLERKX, E. J. M.; EL-LITHY, M. E.; VIERLING, E.; RUYS, G. J.; BLANKESTIJN-DE VRIES, H.; GROOT, S. P. C.; VREUGDENHIL, D.; KOORNNEEF, M. Analysis of natural allelic variation of Arabidopsis seed germination and seed longevity traits between the accessions Landsberg *erecta* and Shakdara, using a new recombinant inbred line population. **Plant Physiology**, v. 135, n. 1, p. 432-443, 2004.

CONTRERAS, S.; BENNETT, M. A.; METZGER, J. D.; TAY, D. Maternal light environment during seed development affects lettuce seed weight, germinability, and storability. **HortScience**, v. 43, n. 3, p. 845-852, 2008.

DOGANLAR, S.; FRARY, A.; TANKSLEY, S. D. The genetic basis of seed-weight variation: tomato as a model system. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, n. 8, p. 1267-1273, 2000.

DUDLEY, J. W. Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. **Crop Science**, v. 33, n. 4, p. 660-668, 1993.

EBERT, A. W. Ex situ conservation of plant genetic resources of major vegetables. In: NORMAH, M. N.; CHIN, H. F.; REED, B. M. (Eds.). **Conservation of tropical plant species**. New York: Springer, 2013, p. 373-418.

EL-KASSABY, Y. A. Genetic variation within and among conifer populations: review and evaluation of methods. In: FINESCHI, S.; MALVOLTI, M. E.; CANNATA, F.; HATTEMER, H. H. (Eds.). **Biochemical markers in the population genetics of forest trees**. The Hague: SPB Academic Publishing bv, 1991. p. 61-76.

FAOSTAT. **Food and agriculture organization of the united nations statistics division: Browse data - Production/Crops**. 2016. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 24 fev. 2016.

FINCH-SAVAGE, W. E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytologist**, v. 171, n. 3, p. 501-523, 2006.

FOOLAD, M. R.; LIN, G. Y.; CHEN, F. Q. Comparison of QTLs for seed germination under non - stress, cold stress and salt stress in tomato. **Plant Breeding**, v. 118, n. 2, p. 167-173, 1999.

FOOLAD, M. R.; SUBBIAH, P.; KRAMER, C.; HARGRAVE, G.; LIN, G. Y. Genetic relationships among cold, salt and drought tolerance during seed germination in an interspecific cross of tomato. **Euphytica**, v. 130, n. 2, p. 199-206, 2003.

FOOLAD, M. R.; SUBBIAH, P.; ZHANG, L. Common QTL affect the rate of tomato seed germination under different stress and nonstress conditions. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2007, 10 p., 2007.

FOOLAD, M. R.; ZHANG, L. P.; SUBBIAH, P. Genetics of drought tolerance during seed germination in tomato: inheritance and QTL mapping. **Genome**, v. 46, n. 4, p. 536-545, 2003.

HALPERN, S. L. Sources and consequences of seed size variation in *Lupinus perennis* (Fabaceae): adaptive and non-adaptive hypotheses. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 2, p. 205-213, 2005.

HAYASHI, E.; AOYAMA, N.; STILL, D. W. Quantitative trait loci associated with lettuce seed germination under different temperature and light environments. **Genome**, v. 51, n. 11, p. 928-947, 2008.

HE, H.; VIDIGAL, D. S.; SNOEK, L. B.; SCHNABEL, S.; NIJVEEN, H.; HILHORST, H.; BENTSINK, L. Interaction between parental environment and genotype affects plant and seed performance in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 22, p. 6603-6615, 2014.

HILHORST, H. W. M.; FINCH-SAVAGE, W. E.; BUITINK, J.; BOLINGUE, W.; LEUBNER-METZGER, G. Dormancy in plant seeds. In: Lubzens, E.; Cerda, J.; Clark, M. (Eds.). **Dormancy and resistance in harsh environments**. Berlin: Springer, 2010. p 43-67.

HILHORST, H. W. M.; KOORNNEEF, M. Dormancy in Plants. In: JOHN WILEY & SONS, Ltd. **Encyclopedia of life sciences**. Cichester: Wiley, 2007. p. 1-4.

JANSEN, R.; OOIJEN, J. W.; STAM, P.; LISTER, C.; DEAN, C. Genotype-by-environment interaction in genetic mapping of multiple quantitative trait loci. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, n. 1, p. 33-37, 1995.

JOOSEN, R. V.; KODDE, J.; WILLEMS, L. A.; LIGTERINK, W.; VAN DER PLAS, L. H.; HILHORST, H. W. GERMINATOR: a software package for high-throughput scoring and curve fitting of *Arabidopsis* seed germination. **Plant Journal**, v. 62, n. 1, p. 148-159, 2010.

JOOSEN, R. V.; LIGTERINK, W.; HILHORST, H. W.; KEURENTJES, J. J. Advances in genetical genomics of plants. **Curr Genomics**, v. 10, n. 8, p. 540-549, 2009.

KAZMI, R. H.; KHAN, N.; WILLEMS, L. A.; van HEUSDEN, A. W.; LIGTERINK, W.; HILHORST, H. W. Complex genetics controls natural variation among seed quality phenotypes in a recombinant inbred population of an interspecific cross between *Solanum lycopersicum* x *Solanum pimpinellifolium*. **Plant Cell & Environment**, v. 35, n. 5, p. 929-951, 2012.

KHAN, N. **Genetic and physiological quality of tomato seed and seedlings**. 2013. 249 f. Thesis (Doctor of Plant Sciences) - Wageningen University, Wageningen, 2013.

KHAN, N.; KAZMI, R. H.; WILLEMS, L. A. J.; van HEUSDEN, A. W.; LIGTERINK, W.; HILHORST, H. W. M. Exploring the Natural Variation for Seedling Traits and Their Link with Seed Dimensions in Tomato. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e43991, 2012.

KIMURA, S.; SINHA, N. Tomato (*Solanum lycopersicum*): A Model Fruit-Bearing Crop. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 3, n. 11, p. 1-18, 2008.

KOORNNEEF, M.; ALONSO-BLANCO, C.; VREUGDENHIL, D. Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 141-172, 2004.

LANDJEVA, S.; LOHWASSER, U.; BÖRNER, A. Genetic mapping within the wheat D genome reveals QTL for germination, seed vigour and longevity, and early seedling growth. **Euphytica**, v. 171, p. 129-143, 2010.

- LANGRIDGE, P.; PALTRIDGE, N.; FINCHER, G. Functional genomics of abiotic stress tolerance in cereals. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v. 4, n. 4, p. 343-354, 2006.
- LIGTERINK, W.; JOOSEN, R. V.; HILHORST, H. W. Unravelling the complex trait of seed quality: using natural variation through a combination of physiology, genetics and -omics technologies. **Seed Science Research**, v. 22, n. S1, p. S45-S52, 2012.
- LIU, B. H. **Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis**. CRC Press, 1997. 648 p.
- LORENZ, K.; COHEN, B. A. Small- and large-effect quantitative trait locus interactions underlie variation in yeast sporulation efficiency. **Genetics**, v. 192, n. 3, p. 1123-1132, 2012.
- LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 980 p.
- MACHADO NETO, A. S. **Viabilidade agroeconômica da produção de tomate de 'mesa' sob diferentes sistemas de cultivo e manejo de adubação**. 2014. 87 f. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologias Agropecuárias) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2014.
- METZ, J.; LIANCOURT, P.; KIGEL, J.; HAREL, D.; STERNBERG, M.; TIELBÖRGER, K. Plant survival in relation to seed size along environmental gradients: a long-term study from semi-arid and Mediterranean annual plant communities. **Journal of Ecology**, v. 98, n. 3, p. 697-704, 2010.
- MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, v. 87, n. 1, p. 126-130, 1995.
- MOREJON, N. H. **Genetic and Environmental Factors Affecting Improvement of Rootstocks for Tomato**. 2013. 134 f. Thesis (Master of Science) - The Ohio State University, Columbus, 2013.
- PARAN, I.; GOLDMAN, I.; ZAMIR, D. QTL analysis of morphological traits in a tomato recombinant inbred line population. **Genome**, v. 40, n. 2, p. 242-248, 1997.
- POSTMA, F. M.; ÅGREN, J. Maternal environment affects the genetic basis of seed dormancy in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 4, p. 785-797, 2015.
- QUESADA, V.; GARCÍA-MARTÍNEZ, S.; PIQUERAS, P.; PONCE, M. R.; MICOL, J. L. Genetic architecture of NaCl tolerance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 130, n. 2, p. 951-963, 2002.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. 2016. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<http://www.rproject.org>>.

SAEEDIPOUR, S. Effects of phytohormone seed priming on germination and seedling growth of cowpea (*Vigna sinensis* L.) under different duration of treatment. **International Journal of Biosciences**, v. 3, n. 12, p. 187-192, 2013.

SALINAS, M.; CAPEL, C. ALBA, J. M.; MORA, B.; CUARTERO, J.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; LOZANO, R.; CAPEL, J. Genetic mapping of two QTL from the wild tomato *Solanum pimpinellifolium* L. controlling resistance against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, n. 1, p. 83-92, 2013.

TANKSLEY, S. D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, v. 27, p. 205-233, 1993.

VALENCIA-DÍAZ, S.; MONTAÑA, C. Temporal variability in the maternal environment and its effect on seed size and seed quality in *Flourensia cernua* DC. (Asteraceae). **Journal of Arid Environments**, v. 63, n. 4, p. 686-695, 2005.

VALLEJO, A. J.; YANOVSKY, M. J.; BOTTO, J. F. Germination variation in *Arabidopsis thaliana* accessions under moderate osmotic and salt stresses. **Annals of Botany**, v.106, n. 5, p. 833-842, 2010.

VAN OOIJEN, J. W. LOD significance thresholds for QTL analysis in experimental populations of diploid species. **Heredity**, v. 83, p. 613-624, 1999.

VAN OOIJEN, J. W.; MALIEPAARD, C. MapQTL®, Version 5.0: Software for the Calculation of QTL Positions on Genetic Maps. In: **Institute of Plant Genetics**. Warsaw: Polish Academy of Sciences, 2003. p. 305.

VIOLLE, C.; CASTRO, H.; RICHARTE, J.; NAVAS, M. L. Intraespecific seed trait variations and competition: passive or adaptive response? **Functional Ecology**, v. 23, n. 3, p. 612-620, 2009.

VÍQUEZ-ZAMORA, M.; CARO, M.; FINKERS, R.; TIKUNOV, Y.; BOVY, A.; VISSER, R. G. F.; BAI, Y.; VAN HEUSDEN, S. Mapping in the era of sequencing: high density genotyping and its application for mapping TYLCV resistance in *Solanum pimpinellifolium*. **BMC Genomics**, v. 15, p. 1152, 2014.

VÍQUEZ-ZAMORA, M.; VOSMAN, B.; VAN DE GEEST, H.; BOVY, A.; VISSER, R. G. F.; FINKERS, R.; VAN HEUSDEN, A. W. Tomato breeding in the genomics era: insights from a SNP array. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 354 2013.

VOORRIPS, R.; VERKERKE, W.; FINKERS, R.; JONGERIUS, R.; KANNE, J. Inheritance of taste components in tomato. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 22, n. 3, p. 259-261, 2000.

ZAS, R.; CENDÁN, C.; SAMPEDRO, L. Mediation of seed provisioning in the transmission of environmental maternal effects in Maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton). **Heredity**, v. 111, n. 3, p. 248-255, 2013.

4 ARTIGO B: CONFIRMAÇÃO E MAPEAMENTO REFINADO DE QTLS PARA TAMANHO E MASSA DE SEMENTE DE TOMATE NO CROMOSSOMO 11 A PARTIR DE FAMÍLIAS ENDOGÂMICAS HETEROGÊNEAS (HIFS)

4.1 RESUMO

Dado a complexidade das características de tamanho e massa de semente, a sua base genética ainda não é totalmente compreendida. Por esta razão, o trabalho teve como objetivo confirmar e realizar o mapeamento refinado de QTLs para o tamanho e a massa de semente de tomate no cromossomo 11 a partir de Famílias Endogâmicas Heterogêneas (HIFs). A população de plantas foi obtida a partir do cruzamento entre *Solanum lycopersicum* (cv. MoneyMaker, 'Money') × *S. pimpinellifolium* (G1.1554, 'Pimp') e nomeadas de RIL 1, RIL 2, RIL 3, RIL 4 e RIL 5, de acordo com as condições do ambiente materno em que foram conduzidas. A fenotipagem da massa de semente foi obtida por pesagem das amostras em balança analítica, e a do tamanho de semente a partir da análise de imagem pelo software ImageJ, utilizando-se de duas repetições de 100 sementes por unidade experimental. Com base na população de RILs, a genotipagem foi obtida a partir de marcadores SNPs, os quais abrangem todo o genoma do tomate. Com o auxílio do software MapQTL®6.0 foram identificados QTLs para as variáveis analisadas. Considerou-se significativo QTLs com score LOD igual ou superior a 2,00. Assim, 23 QTLs para tamanho e massa de semente foram identificados em cinco cromossomos de tomateiro (1, 3, 4, 9 e 11). Com a observação que no cromossomo 11 apenas em algumas populações foram identificados QTLs significativos (interação genótipo × ambiente), foi decidido confirmar QTLs neste cromossomo. Para isso foram obtidas cinco Famílias Endogâmicas Heterogêneas (HIF 211, HIF 286, HIF 277, HIF 268 e HIF 298) com distintas regiões heterozigotas. Posteriormente, o tamanho e a massa de semente de cada HIF foi mensurado. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software Genstat. Inicialmente realizou-se a análise de variância, a fim de verificar diferença entre as HIFs. Como a interação entre linhagem e parental foi significativa ($P < 0,001$), o teste de Fisher (p -valor = 0,05) foi realizado e a diferença significativa foi obtida pela HIF 211 tanto para o tamanho como para a massa de sementes (p -valor = 0.000) e HIF com parental Money contribuiu para sementes maiores e mais pesadas que Pimp. A partir

deste estudo concluiu-se que há QTL(s) para tamanho e massa de semente no cromossomo 11 de tomate e que o gene causal para ambas características está localizado entre o intervalo de confiança de 0,0 e 13,4 cM. Com a abordagem de HIF constatou-se que a região contendo o QTL para tamanho e massa de semente de tomate é menor do que a região obtida inicialmente apenas com a análise de QTL (0,0-72,2 cM), confirmando que a análise de HIFs é importante para estreitar as regiões genéticas nas quais o fenótipo de um QTL é expresso. Isto pode facilitar o mapeamento refinado e a clonagem destes QTLs e, assim, conduzir à identificação de genes potencialmente envolvidos no controle de processos interligados.

PALAVRAS-CHAVE: Genética Molecular. Linhagens Endogâmicas Recombinantes. Qualidade de Sementes. RIL. *Solanum lycopersicum*. *S. pimpinellifolium*.

4.2 ABSTRACT

Due the complexity of seed size and seed weight traits, its genetic basis is still not fully understood. For this reason, the aim of this study was confirm and fine-mapping of the QTLs for tomato seed size and seed weight on chromosome 11 from Heterogeneous Inbred Families (HIFs). Plant population was obtained from the cross between *Solanum lycopersicum* (cv. MoneyMaker, 'Money') × *S. pimpinellifolium* (G1.1554, 'Pimp') and named as RIL 1, RIL 2, RIL 3, RIL 4 And RIL 5, according to the maternal environment conditions under which they were conducted. Phenotyping of the seed mass was obtained by weighing the samples in analytical balance and of the seed size from the image analysis by ImageJ software, using two replicates of 100 seeds per experimental unit. Based on the RILs population, genotyping was obtained from SNPs markers, which cover the entire tomato genome. With the aid of MapQTL®6.0 software, QTLs were identified for the analyzed variables. QTLs with a LOD score equal to or greater than 2.00 were considered significant. Thus, 23 QTLs for seed size and seed weight were identified on five tomato chromosomes (1, 3, 4, 9 and 11). With the observation that on chromosome 11 only in some populations were identified significant QTLs (genotype × environment interaction), we decided to confirm QTLs on this chromosome. So, five Heterogeneous Inbred Families (HIF 211, HIF 286, HIF 277, HIF 268 and HIF 298) were obtained with different heterozygous regions. Subsequently, the size and weight of each HIF was measured.

Statistical analysis was performed with the aid of Genstat software. Initially the analysis of variance was performed in order to verify difference between HIFs. As the interaction between line and background was significant (p -value < 0.001), Fisher's test (p -value = 0.05) was performed and the significant difference was obtained by HIF 211 for both seed size and seed weight (p -value = 0.000) and HIF with Parental Money contributes to larger and heavier seeds than Pimp. From this study we concluded that there is QTL(s) for seed size and seed weight on chromosome 11 of tomato and that the causal gene for both traits are located between the confidence interval of 0.0 and 13.4 cM. With the HIF approach we verified that the region containing the QTL for tomato seed size and seed weight is smaller than the region initially obtained only with QTL analysis (0.0-72.2 cM), confirming that the HIF approach is important to narrow the genetic regions in which the phenotype of a QTL is expressed. This may facilitate the fine-mapping and cloning of these QTLs and thus lead to the identification of genes potentially involved in the control of linked processes.

KEYWORDS: Molecular Genetics. Recombinant Inbred Lines. Seed Quality. RIL. *Solanum lycopersicum*. *S. pimpinellifolium*.

4.3 INTRODUÇÃO

Em razão do crescimento populacional mundial, a escassez de alimentos pode se tornar um dos maiores problemas do planeta (SONG et al., 2007). Assim, um dos desafios, do século XXI, é aumentar a produtividade das culturas agrícolas. Para superar esse desafio, uma solução é obter cultivares com maior produção de sementes, tendo em vista que a maioria dos recursos alimentares do mundo para os seres humanos provêm destas (HERRIDGE et al., 2011); sendo o tamanho e a massa de sementes uma das características do seu rendimento. O tamanho de semente é um determinante da aptidão evolutiva em plantas e é também uma característica agrônômica na domesticação de culturas no tocante a ecologia e agricultura; sendo um componente fundamental da qualidade de semente (GEGAS et al., 2010; LI; LI, 2015).

De acordo com He et al. (2014), o ambiente materno, como a intensidade de luz, o fotoperíodo, a temperatura e o teor de nitrato e de fosfato,

especialmente durante o desenvolvimento da semente, influencia a sua qualidade, como a massa, o rendimento, a capacidade de germinar e a longevidade, e Postma e Ågren (2015) constataram interações entre o genótipo de semente e o ambiente materno.

Segundo Violle et al. (2009), a massa de semente pode ser determinado passivamente pelos recursos disponíveis no ambiente materno, onde as condições de escassez levam a redução da variável e, portanto, interfere no desempenho das plântulas. No entanto, as plantas mãe também podem responder ativamente ao estresse ambiental, mantendo ou mesmo aumentando a massa de semente, a fim de aumentar a taxa de sucesso do número de descendentes inevitavelmente reduzido.

Em conformidade com Halpern (2005), a variação do tamanho de semente pode ser adaptativa em ambientes heterogêneos, podendo também surgir de restrições que limitam o controle desta variável. Produzir sementes de diferentes tamanhos pode ser vantajoso, especialmente em ambientes heterogêneos (HALPERN, 2005; CHARPENTIER et al., 2012), justificando a importância do efeito do ambiente materno como métodos de sobrevivência, adaptabilidade e domínio de novos territórios.

O controle do tamanho de semente envolve interações complexas entre o embrião zigótico, o endosperma, o revestimento de sementes de origem materna e a planta mãe (SCHRUFF et al., 2006; FANG et al., 2012; XIA et al., 2013). Entre as Angiospermas há uma elevada variação no tamanho do embrião/endosperma em sementes maduras. Contudo, pouco se sabe sobre o mecanismo molecular subjacente ao controle do tamanho entre estes tecidos vizinhos.

Conforme Westoby, Jurado e Leishman (1992); Orsi e Tanksley (2009), o tamanho de semente é frequentemente herdado quantitativamente e a variação desta característica pode ser observada não apenas entre táxons, mas também dentro dos táxons. De acordo com Gnan, Priest e Kover (2014), essa variação é explicada por *trade-offs* entre fecundidade e qualidade, com dependência ambiental.

O gênero *Solanum* contém um conjunto de nove espécies compatíveis, estreitamente relacionadas com o tomateiro. Apesar de suas afinidades taxonômicas, estas espécies mostram uma faixa de 10 vezes no tamanho das

sementes, sugerindo uma rápida taxa de mudança evolutiva, apresentando, pelo menos, uma variação de 105 vezes da massa de sementes entre as espécies dentro de uma única área. Além da variação no tamanho entre as diferentes espécies, estudos enfatizaram que esta característica varia significativamente entre as mesmas espécies, entre diferentes populações e diferentes plantas mãe e mesmo entre diferentes sementes da mesma planta (WESTOBY; JURADO; LEISHMAN, 1992, WESTOBY et al., 1996, DOGANLAR; FRARY; TANKSLEY, 2000, ORSI; TANKSLEY, 2009). Como relatado por Orsi e Tanksley (2009), no tomateiro, o tamanho ou a massa de semente pode ser afetado pelo genótipo de três tecidos das sementes: a testa proveniente de tecido materno, o endosperma triploide e o embrião diplóide.

Apesar da importância evolutiva e agrônômica do tamanho e da massa de semente, sabe-se relativamente pouco sobre os processos genéticos e moleculares subjacentes à variação natural nestas características e não se sabe se o tamanho alterado das sementes reflete a atividade do gene local ou as alterações fisiológicas globais (ADAMSKI et al., 2009). Desta forma, elucidar os elementos genéticos responsáveis pelo controle do tamanho e da massa beneficiará a pesquisa básica e aplicada (MOORE et al., 2013).

Com o advento de marcadores moleculares e o desenvolvimento de procedimentos de mapeamento de loci de características quantitativas (QTL), as análises genéticas e correlativas de características quantitativas tornaram-se viáveis, uma vez que um QTL é uma região do genoma contendo uma diferença alélica que causa uma alteração no fenótipo (LORENZ; COHEN, 2012; KHAN, 2013).

A análise de QTL baseada em dados fenotípicos de plantas que apresentam combinações diferentes e conhecidas de dois tipos de DNA parental é uma abordagem promissora sobre o controle de tamanho de semente (ALONSO-BLANCO et al., 2009). Assim, a compreensão da base genética e molecular de *trade-off* do tamanho de semente ajudará os melhoristas a utilizar alelos benéficos para melhorar o rendimento da cultura (LI; LI, 2015).

Para a análise de QTL, uma ferramenta é o uso de Linhagens Endogâmicas Recombinantes (RIL), também denominadas de "populações de mapeamento imortal", porque permitem a realização de repetições e múltiplas análises da mesma população. Cada RIL deve ser autopolinizada e genotipada de

modo que cada genótipo homozigoto no local de interesse pode ser identificado e estudado (KOORNNEEF; ALONSO-BLANCO; VREUGDENHIL, 2004; KAZMI, 2013).

Além disso, um subconjunto de RILs com heterozigosidade residual pode ser usado para desenvolver Famílias Endogâmicas Heterogêneas (HIFs) que são geneticamente semelhantes, mas ainda não atingiram homozigose completa e têm heterozigosidade residual abrangendo o locus de interesse. Portanto, há a segregação para os loci que são heterozigotos, na região do QTL de interesse (TUINSTRA; EJETA; GOLDSBROUGH, 1997), permitindo delinear os intervalos de QTL, a validação e o mapeamento refinado (*fine-mapping*) (KHAN, 2013). Alguns estudos já se utilizaram da metodologia de desenvolver HIFs/NILs (Linhagens Quase Isogênicas) para confirmar/validar QTLs, como em *Arapdopsis* para dormência (LASERNA; SÁNCHEZ; BOTTO, 2008) e para flavonóides (ROUTABOUL et al., 2012), em arroz para tamanho (WANG et al., 2012) e para forma de grão (BAI et al., 2010) e em trigo para resistência a *Fusarium graminearum* (PUMPHREY; BERNARDO; ANDERSON, 2006).

A genética quantitativa tem se fortalecido a partir de técnicas e estratégias, para compreender o nível molecular da função da planta e do tamanho de semente (HAMILTON; BUELL, 2012). Por conseguinte, se obteve aceitação para descrever a variação genética de caracteres fenotípicos em populações naturais. A identificação de vários QTLs de qualidade de semente, assim como de tamanho e massa de semente em tomateiro tem contribuído para a dissecação genética molecular destes caracteres (KHAN et al., 2012).

Progressos tem ocorrido no domínio do controle do tamanho de semente, sendo que várias vias genéticas foram identificadas. No entanto, apresentam lacunas e pouco se sabe sobre as relações entre elas. Ainda não está claro como os tecidos maternos e zigóticos controlam de forma coordenada o tamanho/massa de sementes nas plantas. Assim, a pesquisa está enfrentando desafios para entender os mecanismos reguladores destas características. Um dos desafios é construir estruturas genéticas para o controle destas e definir os mecanismos moleculares (LI; LI, 2015). Dessa forma, o objetivo deste estudo foi confirmar e realizar o mapeamento refinado de QTLs para o tamanho e a massa de semente de tomate no cromossomo 11 a partir de Famílias Endogâmicas Heterogêneas (HIFs) obtidas do cruzamento entre *S. lycopersicum* × *S. pimpinellifolium*.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Material Vegetal: Condições de Crescimento e Coleta de Sementes

A população de Linhagens Endogâmicas Recombinantes (RILs) de *S. lycopersicum* (cv. MoneyMaker, 'Money') × *S. pimpinellifolium* (G1.1554, 'Pimp') foi cultivada em cinco ambientes maternos, denominados RIL 1, RIL 2, RIL 3, RIL 4 e RIL 5, sob condições controladas em casas-de-vegetação da Universidade de Wageningen [Wageningen University (WUR) - Unifarm WUR, Holanda] e de três empresas holandesas de melhoramento vegetal (Tabela 4.1). Foram cultivadas no mínimo duas plantas por ambiente materno.

Tabela 4.1 – População de RILs de *S. lycopersicum* (cv. MoneyMaker, 'Money') × *S. pimpinellifolium* (G1.1554, 'Pimp') cultivadas em cinco ambientes maternos em casa-de-vegetação.

Ambiente Materno (RILs)	NO ⁻³ (mM)	P ⁺ (mM)	Substrato	Fotoperíodo Luz/Escuro (hrs)	Temperatura Diurna/Noturna (°C)	Local de produção
RIL 1	14,0	10,0	Lã de Rocha	16/8	≈25/15	WUR
RIL 2	1,4	1,0	Lã de Rocha	16/8	≈25/15	WUR
RIL 3	≈8,0	≈1,0	Solo	16/8	≈25/15	Empresa 1
RIL 4	14,0	2,0	Fibra de Coco	16/8	≈25/15	Empresa 2
RIL 5	14,0	1,0	Lã de Rocha	16/8	≈25/15	Empresa 3

Fonte: o próprio autor

As flores foram polinizadas manualmente duas vezes por semana. A colheita dos frutos realizada em duas ou três ocasiões por planta para obter a quantidade suficiente de sementes, sendo que os frutos da primeira colheita foram descartados. As sementes foram coletadas de frutos maduros e extraídas com ajuda de ácido clorídrico a 1% (HCl) por 1,5 h para remover a mucilagem aderente às sementes; subsequentemente, foram enxaguadas em água com auxílio de uma peneira de malha fina para remover os resíduos e o ácido clorídrico e imersas numa solução de fosfato trissódico (Na₃PO₄.12H₂O) para desinfecção.

Finalmente, as sementes foram secas em papel de filtro durante três dias a 20°C, limpas com a ajuda de um escovador de sementes (Seed Processing Holland BV, Enkhuizen, Holanda, <http://www.seedprocessing.nl>) para remover as impurezas e armazenadas em sacos de papel em condição ambiente.

4.4.2 Fenotipagem: Análise de Massa e Tamanho de Semente

Para mensurar a massa de semente, duas repetições de 100 sementes foram retiradas aleatoriamente do lote de cada linhagem e avaliado em balança analítica (Mettler® AE 163), calculando-se a massa média de uma semente (mg/Semente).

Em seguida, as amostras foram transferidas para bandejas de germinação forradas com um papel de filtro branco e fotografadas utilizando uma câmara Nikon® D80, fixada num suporte a 60 cm e conectada ao computador utilizando o software de controle de câmara Nikon versão 2.0 (JOOSEN et al., 2010). Após a captura das imagens foi determinado o número e o tamanho de semente, usando a fonte de análise ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) pelo limiar de cor combinados com a análise de partículas. Para cada momento de colheita, as variáveis foram mensuradas separadamente.

4.4.3 Genotipagem

Os dados genotípicos foram obtidos com base no mapa de ligação gênica do tomate, o qual consiste em 12 grupos de ligação. Marcadores SNPs foram utilizados para estudar a segregação dos alelos parentais nas RILs provenientes do cruzamento entre *S. lycopersicum* (cv. Moneymaker, 'Money') × *S. pimpinellifolium* (G1.1554, 'Pimp') conforme metodologia proposta por Víquez-Zamora et al. (2013; 2014).

4.4.4 Identificação de QTLs

Na identificação de QTLs para tamanho e massa de semente, utilizou-se o software de mapeamento MapQTL®6.0 (VAN OOIJEN; MALIEPAARD, 2003) para identificar posições no genoma. Um modelo de mapeamento de QTL múltiplo (MQM) foi utilizado para identificar os QTLs potenciais (JANSEN et al., 1995).

4.4.5 Desenvolvimento de Famílias Heterogêneas Endogâmicas (HIFs)

Um grupo de HIFs foi derivado da heterozigossidade residual específica remanescente da população de RIL em F₈ nos loci de interesse, pelo método SSD (Descendente de uma Única Semente), a fim de validar o QTL previamente identificado para o tamanho e a massa de semente pelo mapeamento refinado no cromossomo 11. Assim, cinco HIFs com regiões sobrepostas foram identificadas: HIF 211, HIF 268, HIF 277, HIF 286 e HIF 298. Cada linhagem foi cultivada durante projetos anteriores (KAZMI et al., 2012; KHAN et al., 2012) e 30-40 sementes de cada planta foram semeadas em blocos de lã de rocha (Grodan B.V., <http://www.grodan.com>). Cada plântula sobrevivente foi genotipada com marcadores dCAPS (*Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences* ou Derivado de Clivagem de Sequências Polimórficas Amplificadas), fazendo-se uso de um (HIF 277) ou dois marcadores (HIF 211, 268, 286 e 298) para detectar as plantas homozigóticas para cada um dos alelos parentais (Tabelas 4.2 e 4.3) (NEFF et al., 2002).

Tabela 4.2 – Marcadores dCAPS utilizados na genotipagem de cada HIF.

HIF	Marcador 1	Marcador 2
211	SI11m3576	SI11m3584
286	SI11m3576	SI11m3618
277	SI11m3590	-
268	SI11m3598	SI11m3604
298	SI11m3576	SI11m3584

Fonte: o próprio autor

Tabela 4.3 – Sequência inicial e final dos marcadores dCAPS e suas enzimas.

Nome	Posição SL2.50		Sequência	Enzima
SI11m3576	4782555..4783048	Inicial	AATGGCAAGCTCTGTTTC	Ddel
		Final	CATAAAAGCAACACACCCAA	
SI11m3584	5941256..5941567	Inicial	GTGGAGTGCAGATAATTTGT	BsmI
		Final	ATCCTCCATGCCATTCTA	
SI11m3590	53200312..53200650	Inicial	ATCTGAAAACCTCACCAAC	XbaI
		Final	AATGGGGCAACTGTAGTA	
SI11m3598	53981704..53981906	Inicial	GTTTGAGCAATTAGACTACACAG	RsaI
		Final	CAGCAGTAAACAACAAGGATC	
SI11m3604	54256480..54256925	Inicial	TGGGAAATGTAGCAAGGG	BsmI
		Final	AAAGTAAATGACTGGGAGG	
SI11m3618	52137637..52137864	Inicial	TAGTCCAGATGAGAGCATTGTGG	Cac8I
		Final	AGGTACACAACAGGCAACAATCCGCAGG	

Fonte: o próprio autor

Além disso, a análise de HIF foi utilizada para gerar as Linhagens Quase Isogênicas (NILs) a partir dos progenitores recombinantes. Pois, como a progênie resultante segrega para a região heterozigótica, a caracterização molecular de QTLs individuais necessitou do isolamento dos loci segregantes. Foram obtidas duas NILs, uma para cada parental, as quais diferem em uma região no QTL de interesse ou em vários loci estreitamente ligados que afetam as características (GLAZIER; NADEAU; AITMAN, 2002). Assim, as NILs puderam ser comparadas dentro de cada família para determinar se a região inclui um QTL associado ao tamanho e/ou a massa de semente, além de possibilitar a identificação do progenitor no qual o fenótipo do QTL é expresso (TUINSTRA; EJETA; GOLDSBROUGH, 1997; BERGELSON; ROUX, 2010; WEIGEL, 2012).

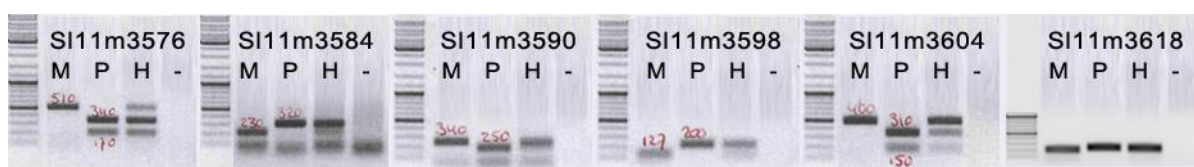
As plântulas foram transferidas para blocos de lã de rocha de 10 x 10 cm e desenvolvidas em casa-de-vegetação da WUR sob condições de dia longo (16 horas de luz e 8 horas de escuro) com temperaturas de 25°C durante o dia e 15°C a noite.

4.4.5.1 Genotipagem de HIFs - teste para marcador dCAPS

O DNA foi extraído de acordo com o método CTAB (CHEUNG; HUBERT; LANDRY, 1993). A PCR foi realizada em termociclador (Bio-Rad® S1000TM) com o uso de 2 µl do DNA extraído. As reações de PCR foram conduzidas durante 4 minutos a 95°C, seguidos por 35 ciclos de desnaturação por

20 segundos a 95°C, anelamento do *primer* durante 30 seg a 55°C e extensão por 1 minuto a 72°C, com subsequente fase de extensão por 10 min a 72°C. Os produtos de PCR foram utilizados para análise de restrição com a enzima desejada. Foram utilizados 15 µl do volume da PCR, 1 unidade de enzima, 3 µl de tampão CutSmart® e suplementado com água desmineralizada até 30 µl. As digestões foram realizadas durante a noite à temperatura ótima para cada enzima (entre 30 e 37°C). Os produtos de restrição foram aplicados em gel de agarose a 1,5%, colorido com GelRed™ e o genótipo das plantas foi avaliado (Figure 4.1).

Figura 4.1 – Geles de agarose com os resultados da análise específica para os marcadores dCAPS: SI11m3576, SI11m3584, SI11m3590, SI11m3598, SI11m3604 e SI11m3618 e a bandagem dos parentais por marcador para os alelos Money (M), Pimp (P) e Heterozigoto (H).



Fonte: o próprio autor

4.4.5.2 Análise do tamanho e massa de semente das HIFs

A caracterização fenotípica das HIFs foi realizada pelo tamanho e massa de semente, conforme descrito na seção “Análise de Tamanho e Massa de Semente”.

4.4.6 Análise Estatística

Para análise estatística, utilizou-se o software Genstat (versão 18.1.0.17005). Realizou-se a análise de variância (ANOVA desbalanceada, devido à diferença de número de plantas por genitor) com os termos de bloqueio “Colheita × Momento de Colheita” e os tratamentos “Progenitor × Linhagem”. As diferenças entre Progenitor × Linhagem foram determinadas usando o LSD protegido de Fisher a 5% de probabilidade.

Além disso, para verificar diferenças entre as NILs para os progenitores Money e Pimp para cada HIF, a média, o desvio padrão e o *p*-valor a

partir do teste de Fisher (LSD) foram analisados para o tamanho e a massa de semente das cinco HIFs.

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Identificação de QTLs para Tamanho e Massa de Semente

Foram identificados 23 QTLs usando o intervalo de mapeamento. O escore LOD de 2,0 foi calculada como um nível limiar com um teste de permutação para detectar QTLs estatisticamente significativos (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 – QTLs significativos associados as características de tamanho e massa de semente de tomate em população de RILs (*S. lycopersicum* × *S. pimpinellifolium*) cultivada em cinco ambientes maternos (RIL 1, RIL 2, RIL 3, RIL 4 e RIL 5).

Cr ¹	Intervalo de confiança (cM)	Marcador ²	Escore LOD	Efeito aditivo ³	Variância (%)	Variância total
Tamanho de Semente – RIL 1						
1	71,3-119,2	74314733	3,3	0,19348	14,4	24,1
11	0,0-66,3	47009022	2,2	0,14266	9,7	
Tamanho de Semente – RIL 2						
9	54,9-86,2	60676124	2,6	0,189375	11,4	20,2
11	0,0-72,2	4775241	2,0	0,16767	8,8	
Tamanho de Semente – RIL 3						
9	58,9-82,3	62098389	4,3	0,31327	17,8	26,7
11	0,0-72,2	4775241	2,0	0,22336	8,9	
Tamanho de Semente – RIL 4						
4	56,9-96,0	62161978	3,0	0,250445	13,9	27,5
9	55,9-96,3	64960323	3,0	0,256005	13,6	
Tamanho de Semente – RIL 5						
1	68,3-119,9	74314733	2,8	0,21919	12,2	44,3
9	56,9-94,2	62098389	3,8	0,22905	15,9	
11	0,0-28,8	4775241	3,8	0,23286	16,2	
Massa de Semente – RIL 1						
1	68,1-118,2	74314733	3,5	0,00012167	15,2	38,4
3	20,6-73,5	seq-rs6541	2,3	0,000094135	10,2	
9	58,9-83,4	62098389	2,9	0,00010099	13,0	
Massa de Semente – RIL 2						
4	47,7-66,3	50180826	2,9	0,00012848	12,3	25,9
9	57,9-86,2	60487661	3,2	0,000135975	13,6	
Massa de Semente – RIL 3						
9	66,6-77,9	62098389	6,0	0,00018901	24,1	24,1

Continua

Tabela 4.4 – Continuação...

Cr ¹	Intervalo de confiança (cM)	Marcador ²	Escore LOD	Efeito aditivo ³	Variância (%)	Variância total
Massa de Semente – RIL 4						
3	14,1-116,3	seq-rs6541	2,0	0,00014049	9,5	39,8
4	8,2-73,7	50180826	2,2	0,000105085	10,5	
9	60,9-84,6	62098389	4,5	0,000145955	19,8	
Massa de Semente – RIL 5						
1	63,8-119,9	74314733	2,9	0,00014944	12,0	46,3
9	65,0-82,3	62098389	5,1	0,000176165	21,0	
11	0,0-28,8	4775241	3,1	0,000141455	13,3	

¹Cromossomo em que os QTLs foram detectados.

²Marcador mais próximo da posição dos QTLs identificados.

³O sinal positivo e negativo significa que o alelo de *S. lycopersicum* e *S. pimpinellifolium* contribuiu para o aumento da característica no locus, respectivamente.

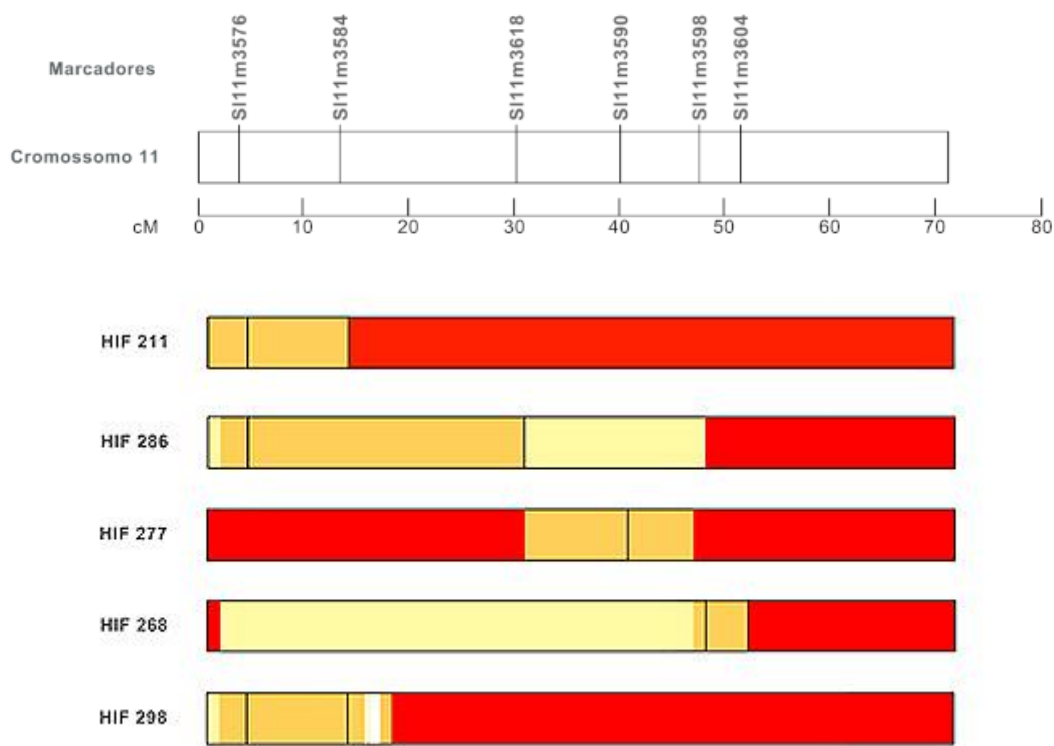
Fonte: o próprio autor

4.5.2 Desenvolvimento de Famílias Heterogêneas Endogâmicas (HIFs)

Diferenças nos QTLs foram encontrados para os ambientes maternos (respostas genética x ambiente) (Tabela 4.4). Uma vez observado que tanto para tamanho como para massa de sementes, em apenas um ambiente materno não foi identificado QTL no cromossomo 11 para ambas características avaliadas, o estudo teve como objetivo realizar a confirmação e o mapeamento refinado de QTLs apenas nesse cromossomo. Para confirmar este(s) QTL(s), utilizou-se a abordagem de HIF. Cinco HIFs com regiões sobrepostas foram selecionados para permitir o estreitamento do(s) QTL(s) para uma região particular do cromossomo 11.

Após a triagem, encontrou-se cinco RILs candidatas (RILs em F₈) para o desenvolvimento das HIFs para os QTLs no cromossomo 11: HIF 211, HIF 286, HIF 277, HIF 268 e HIF 298. Estas HIFs foram rastreadas com os marcadores dCAPS: SI11m3576, SI11m3584, SI11m3618, SI11m3590, SI11m3598 e SI11m3604, os quais segregam para os alelos parentais (Figura 4.2).

Figura 4.2 – Genótipos de HIFs segregando para os marcadores SI11m3576, SI11m3584, SI11m3618, SI11m3590, SI11m3598 e SI11m3604. Os genótipos dos marcadores flanqueando cada QTL são indicados para cada HIF. Os alelos derivados de *S. lycopersicum* (cv. Moneymaker, 'Money') estão indicados em regiões vermelhas no grupo de ligação, os alelos derivados de *S. pimpinellifolium* (G1.1554, 'Pimp') em regiões amarelas e as regiões heterozigóticas em laranja. As regiões brancas correspondem aos dados não identificados.



Fonte: o próprio autor

A partir das cinco HIFs, com diferentes regiões heterozigotas que segregam, confirma-se que o QTL está localizado na região de 0,0 a 53,3 cM, possibilitando iniciar o mapeamento refinado de QTL.

4.5.3 Confirmação do(s) QTL(s) para Tamanho e Massa de Semente em HIFs para o Cromossomo 11

Foi realizada uma ANOVA com *design* desbalanceado para o tamanho (Tabela 4.5) e a massa de semente (Tabela 4.6) para confirmar o(s) QTL(s) e verificar se em alguma linhagem estas características diferem devido à presença do alelo Money ou Pimp para a região heterozigótica.

Com as diferentes colheitas, foram analisados os fatores colheita e momento de colheita para o teste F para correção dos efeitos, seja de desenvolvimento ou ambientais. A partir do teste F, a interação desses fatores não foi significativa para o tamanho de semente. No entanto, foi significativa para a massa de semente.

Tabela 4.5 – ANOVA para tamanho de semente: Causa de variação (CV), graus de liberdade (gl), soma de quadrados (SQ), soma média de quadrados (SMQ), valor-F e p -valor.

ANOVA – Tamanho de Semente					
CV	gl	SQ	SMQ	F _{CAL}	p -valor
Colheita (C)	2	0,3616	0,1808	2,66	0,074
Momento de Colheita (MC)	3	3,0171	1,0057	14,82	< 0,001*
C × MC	2	0,2085	0,1042	1,54	0,22
Genitor (G)	1	0,0230	0,0230	0,34	0,561
Linhagem (L)	4	15,4099	3,8525	56,77	< 0,001*
G × L	4	1,4116	0,3529	5,2	< 0,001*
Erro	117	7,9401	0,0679		
Total	133	28,3718	0,2133		

*Significativo (p -valor<0,01)

Fonte: o próprio autor

Tabela 4.6 – ANOVA para massa de semente: Causa de variação (CV), graus de liberdade (gl), soma de quadrados (SQ), soma média de quadrados (SMQ), valor-F e p -valor.

ANOVA – Massa de Semente					
CV	gl	SQ	SMQ	F _{CAL}	p -valor
Colheita (C)	2	0,3474	0,1737	7,27	0,001*
Momento de Colheita (MC)	3	3,8201	1,2734	53,27	< 0,001*
C × MC	2	0,8699	0,4350	18,19	< 0,001*
Genitor (G)	1	0,0685	0,0685	2,86	0,093
Linhagem (L)	4	10,9914	2,7479	114,94	< 0,001*
G × L	4	0,5770	0,1443	6,03	< 0,001*
Resíduo	117	2,7970	0,0239		
Total	133	19,4713	0,1464		

*Significativo (p -valor<0,01)

Fonte: o próprio autor

Para confirmar QTLs no cromossomo 11, foi analisado a interação genitor × linhagem, a qual é significativa para ambas as características. Assim, há influência conjunta dos dois fatores no tamanho e na massa de semente (Tabelas 4.5 e 4.6).

Para verificar diferenças entre as NILs para os genitores Money e Pimp para cada HIF, uma vez que a interação dos fatores foi significativa (genitor ×

linhagem), a média e o desvio padrão para o tamanho e a massa de semente foram analisados. A partir do teste de Fisher (LSD) foi confirmada a diferença presente apenas no HIF 211 (p -valor = 0,000) (Tabela 4.7).

Tabela 4.7 – Número de plantas por genitor (NPG), média (x) e desvio padrão (s) para Money e Pimp e p -valor para as cinco HIFs para tamanho e massa de semente.

<i>Tamanho de Semente</i>							
HIF	NPG		Money		Pimp		p -valor #
	Money	Pimp	x	s	x	s	
211	6	8	4,171	0,274	3,766	0,179	0,000*
286	2	5	3,883	0,322	4,172	0,386	0,136
277	10	10	3,562	0,212	3,457	0,159	0,218
268	11	9	3,059	0,117	2,940	0,109	0,201
298	5	5	3,521	0,048	3,740	0,576	0,066

<i>Massa de Semente</i>							
HIF	NPG		Money		Pimp		p -valor #
	Money	Pimp	x	s	x	s	
211	6	8	1,998	0,162	1,697	0,078	0,000*
286	2	5	1,793	0,320	2,010	0,203	0,060
277	10	10	1,238	0,110	1,187	0,067	0,279
268	11	9	1,195	0,052	1,140	0,107	0,213
298	5	5	1,903	0,067	1,973	0,330	0,327

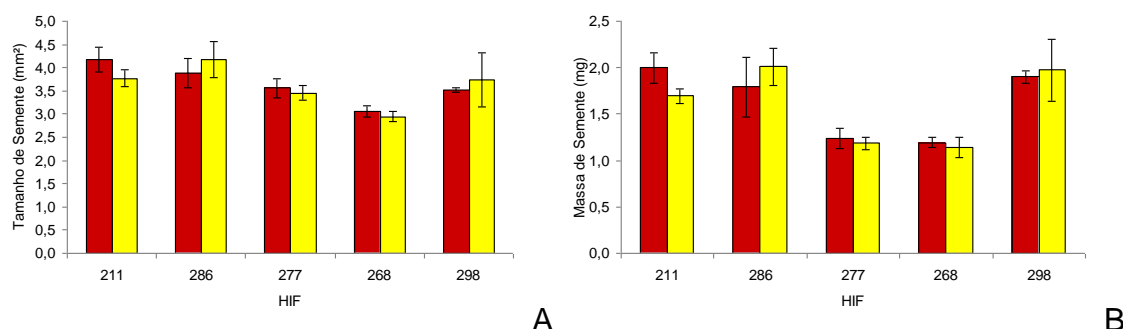
#Teste de Fisher (LSD)

*Significativo (p -valor < 0,01)

Fonte: o próprio autor

Como a HIF 211 foi significativa, há diferença entre os genitores Money e Pimp para o tamanho e a massa de semente (Tabela 4.6). O tamanho médio de semente da HIF 211 com o genitor Money (4,171 mm²) foi significativamente superior ao de Pimp (3,766 mm²); o alelo Money aumenta o tamanho de semente neste locus. Observou-se comportamento semelhante para a massa de semente, uma vez que a média desta característica foi de 1,998 mg para a HIF 211 com o genitor Money e 1,697 mg com o Pimp (Figura 4.3). Com isso, confirma-se o efeito aditivo apresentado na Tabela 4.3, com sinal positivo para todos os QTLs identificados, e que o alelo de *S. lycopersicum* contribuiu para o aumento do tamanho e da massa de semente nesse locus.

Figura 4.3 – (A) Tamanho de semente e (B) Massa de semente para NILs com genitor Money (vermelho) e genitor Pimp (amarelo) para cada HIF (211, 286, 277, 268 e 298).



Fonte: o próprio autor

4.5.4 Resumo dos Resultados

A partir da análise de QTL (Tabela 4.4), objetivou-se identificar QTLs para tamanho e massa de semente nos 12 cromossomos do tomate, a partir de população de RILs entre *S. lycopersicum* (cv. Money, 'Money') × *S. pimpinellifolium* (G1.155, 'Pimp'), cultivada em cinco ambientes maternos. A partir disso, identificou-se QTLs significativos para essas características em cinco cromossomos (1, 3, 4, 9 e 11). Para confirmar QTL(s) para essas características no cromossomo 11, tornou-se necessário desenvolver HIFs.

Com cinco HIFs com regiões heterozigóticas distintas (Figura 4.2), a partir da ANOVA detectou-se a interação entre genitor × linhagem (Tabelas 4.5 e 4.6). Assim, pelo teste de Fisher confirmou-se diferença significativa apenas na HIF 211 (Tabela 4.7). Esta diferença foi plotada em um gráfico, onde observou-se que as sementes com genitor Money têm tamanho e massa de semente superior às de Pimp (Figure 4.3).

Na Figura 4.2, onde a HIF 211 foi agrupada em regiões Money, Pimp e heterozigota de acordo com os marcadores de segregação (SI11m3576, SI11m3584, SI11m3618, SI11m3590, SI11m3598 e SI11m3604) no locus de interesse, observou-se que o QTL está na região entre 0,0 e 13,4 cM, uma vez que a HIF 211 mostrou uma diferença entre os alelos Money e Pimp na região que circunda os marcadores SI11m3576 e SI11m3584.

Assim, foi possível reduzir a região do QTL para tamanho e massa de semente no cromossomo 11, considerando que somente com a análise de QTL,

QTLs para as características avaliadas haviam sido identificamos em intervalo de confiança de 0 a 28,8 até 72,2 cM. Além disso, mesmo não tendo encontrado diferença significativa entre os progenitores nas outras HIFs, também pode haver uma hipótese de que o QTL para tamanho e massa de semente esteja localizado em regiões a montante do marcador SI11m3576, tendo em vista que se testar mais linhagens para HIF 286 (e HIF 298) pode-se revelar também diferenças significativas para estas HIFs entre os diferentes genitores. Portanto, esses resultados ainda precisam ser confirmados em estudos futuros, utilizando-se um maior número de plantas por genitor.

Em conclusão, QTLs para tamanho e massa de semente foram confirmados no cromossomo 11, uma vez que a HIF 211 apresenta diferença significativa em ambas características, comparando os dois genitores (Money e Pimp). Assim, concluí-se que um gene causal para ambas as características está localizado entre 0,0 e 13,4 cM, já que identificou-se que o QTL está neste intervalo, uma vez que é o tamanho da região heterozigótica na HIF 211 (Figura 4.2). Com a abordagem de HIF, a região contendo o gene para tamanho/massa de semente é menor do que ao observado na análise de QTL. Assim, através das HIFs iniciou-se o mapeamento refinado de QTL e para pesquisas futuras o foco será direcionado à uma região menor do cromossomo 11.

4.6 DISCUSSÃO

A análise de Loci de Características Quantitativas (QTLs) pode ser uma ferramenta para elucidar as diferenças genéticas para características complexas que estão presentes em uma espécie, mas isso depende da disponibilidade de populações de mapeamento bem-genotipadas, tais como populações de RIL (KOORNNEEF; ALONSO-BLANCO; VREUGDENHIL, 2004). As populações de RIL fornecem um recurso genético 'imortal' e identificar as bases moleculares dos QTLs obtidos nesse caminho, continuam a ser uma tarefa formidável. Tendo em vista produzir grandes intervalos genéticos, se faz necessário realizar a caracterização molecular da variação alélica para a clonagem dos genes causais. A fim de delinear os intervalos de QTL e compreender a variação genética natural para a identificação de genes causais, precisa-se incorporar informações adicionais do genoma completo, que está se tornando mais acessível.

No presente estudo, 23 QTLs em cinco cromossomos diferentes (1, 3, 4, 9 e 11) foram identificados para o tamanho e o massa de semente em população de RIL de tomateiro cultivada em cinco ambientes maternos (Tabela 4.3).

De acordo com Postma e Ågren (2015), a interação entre o genótipo da semente e o ambiente materno foi observada. No atual estudo, não se constatou a influência do ambiente materno na quantidade de QTL significativo para o tamanho de semente, que variou de 2 a 3 de acordo com o ambiente em que as RILs foram cultivadas. No entanto, para a massa, RILs cultivadas sob maior teor de nitrato (14 mM) favoreceu a identificação de maior número de QTLs significativos, sendo três em RIL 1, RIL 4 e RIL 5; para RIL 2 e RIL 3 identificou-se dois e um, respectivamente. Isto corrobora com He et al. (2014), que relataram que o nitrato afetou mais características de sementes em comparação ao fosfato, mostrando que há interação entre genótipo e ambiente materno.

Observou-se que o ambiente materno é capaz de influenciar na identificação de QTL, haja vista que há QTL que foi identificado na maioria dos ambientes maternos avaliados, como para o tamanho de semente, onde identificou QTL no cromossomo 11 em RIL 1, RIL 2, RIL 3 e RIL 5. Porém, observa-se que há QTL que é fortemente afetado pelo ambiente materno, a exemplo do QTL para a massa de semente no cromossomo 11, o qual foi detectado apenas em RIL 5; constatando a importância de identificar QTL em diferentes ambientes.

De acordo com Khan et al. (2012), QTLs tem sido identificados para a massa de semente, no entanto, os mesmo autores citam que estudos prévios não tem dado atenção à identificação de QTLs para características de dimensão como tamanho e comprimento de semente. Outros estudos em tomateiro também foram realizados para identificar QTLs para a massa de semente com diferentes populações envolvendo cruzamentos interespecíficos entre espécie cultivada e silvestre (TANKSLEY; MEDINA-FILHO; RICK, 1982; GOLDMAN; PARAN; ZAMIR, 1995; GRANDILLO; TANKSLEY, 1996; DOGANLAR; FRARY; TANKSLEY, 2000; KHAN et al., 2012), porém vale ressaltar que estes estudos não têm considerado o efeito do ambiente materno.

Embora tamanho, comprimento e massa de semente sejam características intimamente relacionadas e interdependentes entre si, Khan et al. (2012) identificaram diferentes números de QTLs para massa (seis), tamanho (quatro) e comprimento de semente (três). No presente estudo, identificou-se

também um número diferente de QTLs para essas características: 11 para tamanho e 12 para massa de sementes.

Como o objetivo do estudo foi o cromossomo 11, devido a fatores já citados anteriormente, após o desenvolvimento das HIFs, os QTLs que afetam o tamanho e a massa de semente neste cromossomo foram confirmados apenas na HIF 211. As NILs com alelos Money aumentaram significativamente as características em comparação com as NILs com os alelos Pimp (Tabela 4.6). Isto está de acordo com o efeito aditivo da Tabela 4.3, onde o alelo Money contribuiu para o tamanho e a massa de semente em todos os QTLs no cromossomo 11 identificados em diferentes RILs. Khan (2013) também confirmou QTLs para o massa de semente, porém, no cromossomo 9.

Khan (2013), estudando a característica tamanho de semente em população de RIL de *S. lycopersicum* e *S. pimpinellifolium*, encontrou duas HIFs carregando o alelo Money que revelou maior tamanho de semente em comparação com as sementes contendo o alelo Pimp. Assim, estreitaram o intervalo de QTL para o tamanho de semente no cromossomo 9 para uma região de 18 cM entre 94,0 e 112,0 cM.

No presente estudo, tendo em vista que apenas uma HIF confirmou o QTL, foi obtido o mapeamento refinado do QTL no cromossomo 11 para uma pequena região de 0,0 a 13,4 cM (Figura 4.2). Além disso, a HIF 211 pode ser usada para aprimorar o mapeamento do QTL e identificar o gene causal para o tamanho e a massa de semente. Além da identificação do(s) gene(s) causal, os resultados apresentados podem ser utilizados na seleção assistida por marcadores (SAM) para otimizar ambas características.

A combinação de resultados fornece suporte para a premissa conceitual ao favorecimento do mapeamento refinado e a clonagem do(s) gene(s) responsável pela variação de características complexas, que normalmente requer a construção de NILs para determinar as relações genéticas. Assim, o isolamento, a caracterização e a comparação de análises de genes funcionais destes loci podem ser combinados com uma abordagem de gene candidato observando todos os genes no intervalo de confiança. A investigação de QTLs para tamanho e massa de semente em tomateiro revelou que a análise de HIFs identificou NILs que permitem a confirmação de ligação entre marcadores e QTLs, o mapeamento refinado de QTLs e a elucidação do fenótipo associado a um QTL específico.

A análise de HIFs expôs uma abordagem eficiente para desenvolver NILs para dissecar a base genética implícita ao tamanho e à massa de semente, fornecendo evidências adicionais para a presença de regiões genéticas previamente identificadas que controlam a qualidade de sementes. As HIFs ajudam na geração de NILs numa gama de progenitores genéticos recombinantes, além de serem úteis para estreitar as regiões genéticas nas quais o fenótipo de um QTL é expresso. Isto facilita o mapeamento refinado e a clonagem dos genes causais para estes QTLs e a identificação de genes potencialmente envolvidos no controle de processos relacionados. Assim, estudar diferentes características de sementes é importante para melhorar o desenvolvimento e o rendimento das culturas.

4.7 REFERÊNCIAS

- ADAMSKI, N. M.; ANASTASIOU, E.; ERIKSSON, S.; O'NEILL, C. M.; LENHARD, M. Local maternal control of seed size by *KLUH/CYP78A5*-dependent growth signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 47, p. 20115-20120, 2009.
- ALONSO-BLANCO, C.; AARTS, M. G. M.; BENTSINK L.; KEURENTJES J. J. B, REYMOND, M.; VREUGDENHIL, D.; KOORNNEEF, M. What has natural variation taught us about plant development, physiology, and adaptation? **The Plant Cell**, v. 21, n. 7, p. 1877-1896, 2009.
- BAI, X.; LUO, L.; YAN, W.; KOVI, M. R.; ZHAN, W.; XING, Y. Genetic dissection of rice grain shape using a recombinant inbred line population derived from two contrasting parents and fine mapping a pleiotropic quantitative trait locus *qGL7*. **BMC Genetics**, v. 11, n. 16, p. 1-11, 2010.
- BERGELSON, J.; ROUX, F. Towards identifying genes underlying ecologically relevant traits in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 12, p. 867-879, 2010.
- CHARPENTIER, A.; ANAND, M.; BAUCH, C. T. Variable offspring size as an adaptation to environmental heterogeneity in a clonal plant species: integrating experimental and modelling approaches. **Journal of Ecology**, v. 100, n. 1, p.184-195, 2012.
- CHEUNG, W. Y.; HUBERT, N.; LANDRY, B. S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal, and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. **PCR Methods and Applications**, v. 3, n. 1, p. 69-70, 1993.
- DOGANLAR, S.; FRARY, A.; TANKSLEY, S. D. The genetic basis of seed-weight variation: tomato as a model system. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, n. 8, p. 1267-1273, 2000.

FANG, W.; WANG, Z.; CUI, R.; LI, J.; LI, Y. Maternal control of seed size by EOD3/CYP78A6 in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 70, n. 6, p. 929-939, 2012.

GEGAS, V. C.; NAZARI, A.; GRIFFITHS, S.; SIMMONDS, J.; FISH, L.; ORFORD, S.; SAYERS, L.; DOONAN, J. H.; SNAPE, J. W. A genetic framework for grain size and shape variation in wheat. **The Plant Cell**, v. 22, n. 4, p. 1046-1056, 2010.

GLAZIER, A. M.; NADEAU, J. H.; AITMAN, T. J. Finding genes that underlie complex traits. **Science**, v. 298, n. 5602, p. 2345-2349, 2002.

GNAN, S.; PRIEST, A.; KOVER, P. X. The genetic basis of natural variation in seed size and seed number and their trade-off using *Arabidopsis thaliana* MAGIC Lines. **Genetics**, v. 198, n. 4, p. 1751-1758, 2014.

GOLDMAN, I. L.; PARAN, I.; ZAMIR, D. Quantitative trait locus analysis of a recombinant inbred line population derived from a *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon cheesmanii* cross. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 90, n. 7, p. 925-932, 1995.

GRANDILLO, S.; TANKSLEY, S. D. QTL analysis of horticultural traits differentiating the cultivated tomato from the closely related species *Lycopersicon pimpinellifolium*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, n. 8, p. 935-951, 1996.

HALPERN, S. L. Sources and consequences of seed size variation in *Lupinus perennis* (Fabaceae): adaptive and non-adaptive hypotheses. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 2, p. 205-213, 2005.

HAMILTON, J. P.; BUELL, C. R. Advances in plant genome sequencing. **The Plant Journal**, v. 70, n. 1, p. 177-190, 2012.

HE, H.; VIDIGAL, D. S.; SNOEK, L. B.; SCHNABEL, S.; NIJVEEN, H.; HILHORST, H.; BENTSINK, L. Interaction between parental environment and genotype affects plant and seed performance in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 22, p. 6603-6615, 2014.

HERRIDGE, R. P.; DAY, R. C.; BALDWIN, S.; MACKNIGHT, R. C. Rapid analysis of seed size in *Arabidopsis* for mutant and QTL discovery. **Plant Methods**, v. 7, n. 3, 2011.

JANSEN, R.; OOIJEN, J. W.; STAM, P.; LISTER, C.; DEAN, C. Genotype-by-environment interaction in genetic mapping of multiple quantitative trait loci. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, n. 1, p. 33-37, 1995.

JOOSEN, R. V.; KODDE, J.; WILLEMS, L. A.; LIGTERINK, W.; VAN DER PLAS, L. H.; HILHORST, H. W. GERMINATOR: a software package for high-throughput scoring and curve fitting of *Arabidopsis* seed germination. **Plant Journal**, v. 62, n. 1, p. 148-159, 2010.

KAZMI, R. H. Genes for seed quality: Integrating physiology and genetical genomics to mine for seed quality genes in tomato. 2013. 243 f. Thesis (Doctor of Plant Sciences) - Wageningen University, Wageningen, 2013.

KAZMI, R. H.; KHAN, N.; WILLEMS, L. A.; van HEUSDEN, A. W.; LIGTERINK, W.; HILHORST, H. W. Complex genetics controls natural variation among seed quality phenotypes in a recombinant inbred population of an interspecific cross between *Solanum lycopersicum* x *Solanum pimpinellifolium*. **Plant Cell & Environment**, v. 35, n. 5, p. 929-951, 2012.

KHAN, N. **Genetic and physiological quality of tomato seed and seedlings**. 2013. 249 f. Thesis (Doctor of Plant Sciences) - Wageningen University, Wageningen, 2013.

KHAN, N.; KAZMI, R. H.; WILLEMS, L. A. J.; van HEUSDEN, A. W.; LIGTERINK, W.; HILHORST, H. W. M. Exploring the Natural Variation for Seedling Traits and Their Link with Seed Dimensions in Tomato. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e43991, 2012.

KOORNNEEF, M.; ALONSO-BLANCO, C.; VREUGDENHIL, D. Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 141-172, 2004.

LASERNA, M. P.; SÁNCHEZ, R. A.; BOTTO, J. F. Light-related Loci Controlling Seed Germination in *Ler* x *Cvi* and *Bay-0* x *Sha* Recombinant Inbred-line Populations of *Arabidopsis thaliana*. **Annals of Botany**, v. 102, n. 4, p. 631-642, 2008.

LI, N.; LI, Y. Maternal control of seed size in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 4, p. 1087-1097, 2015.

LORENZ, K.; COHEN, B. A. Small- and large-effect quantitative trait locus interactions underlie variation in yeast sporulation efficiency. **Genetics**, v. 192, n. 3, p. 1123-1132, 2012.

MOORE, C. R.; GRONWALL, D. S.; MILLER, N. D.; SPALDING, E. P. Mapping quantitative trait loci affecting *Arabidopsis thaliana* seed morphology features extracted computationally from images. **G3**, v. 3, n. 1, p. 109-118, 2013.

NEFF, M. M.; TURK, E.; KALISHMAN, M. Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis. **Trends in Genetics**, v. 18, n. 12, p. 613-615, 2002.

ORSI, C. H.; TANKSLEY, S. D. Natural variation in an ABC transporter gene associated with seed size evolution in tomato species. **PLOS Genetics**, v. 5, n. 1, p. e1000347, 2009.

POSTMA, F. M.; ÅGREN, J. Maternal environment affects the genetic basis of seed dormancy in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 4, p. 785-797, 2015.

PUMPHREY, M. O.; BERNARDO, R.; ANDERSON, J. A. Validating the *Fhb1* QTL for Fusarium Head Blight Resistance in Near-Isogenic Wheat Lines Developed from Breeding Populations. **Crop Science**, v. 47, n. 1, p. 200-206, 2006.

ROUTABOUL, J. M.; DUBOS, C.; BECK, G.; MARQUIS, C.; BIDZINSKI, P.; LOUDET, O.; LEPINIEC, L. Metabolite profiling and quantitative genetics of natural variation for flavonoids in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 10, p. 3749-3764, 2012.

SCHRUFF, M. C.; SPIELMAN, M.; TIWARI, S.; ADAMS, S.; FENBY, N.; SCOTT, R. J. The *AUXIN RESPONSE FACTOR 2* gene of *Arabidopsis* links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. **Development**, v. 133, n. 2, 251-261, 2006.

SONG, X. J.; HUANG, W.; SHI, M.; ZHU, M. Z.; LIN, H. X. A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase. **Nature Genetics**, v. 39, n. 5, p. 623-630, 2007.

TANKSLEY, S.; MEDINA-FILHO, H.; RICK, C. Use of naturally-occurring enzyme variation to detect and map genes controlling quantitative traits in an interspecific backcross of tomato. **Heredity**, v. 49, p. 11-25, 1982.

TUINSTRA, M.; EJETA, G.; GOLDSBROUGH, P. Heterogeneous inbred family (HIF) analysis: a method for developing near-isogenic lines that differ at quantitative trait loci. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, n. 5, p. 1005-1011, 1997.

VAN OOIJEN, J. W.; MALIEPAARD, C. MapQTL[®], Version 5.0: Software for the Calculation of QTL Positions on Genetic Maps. In: **Institute of Plant Genetics**. Warsaw: Polish Academy of Sciences, 2003. p. 305.

VIOLLE, C.; CASTRO, H.; RICHARTE, J.; NAVAS, M. L. Intraespecific seed trait variations and competition: passive or adaptive response? **Functional Ecology**, v. 23, n. 3, p. 612-620, 2009.

VÍQUEZ-ZAMORA, M.; CARO, M.; FINKERS, R.; TIKUNOV, Y.; BOVY, A.; VISSER, R. G. F.; BAI, Y.; VAN HEUSDEN, S. Mapping in the era of sequencing: high density genotyping and its application for mapping TYLCV resistance in *Solanum pimpinellifolium*. **BMC Genomics**, v. 15, p. 1152, 2014.

VÍQUEZ-ZAMORA, M.; VOSMAN, B.; VAN DE GEEST, H.; BOVY, A.; VISSER, R. G. F.; FINKERS, R.; VAN HEUSDEN, A. W. Tomato breeding in the genomics era: insights from a SNP array. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 354 2013.

WANG, P.; XING, Y.; LI, Z.; YU, S. Improving rice yield and quality by QTL pyramiding. **Molecular Breeding**, v. 29, n. 4, p. 903-913, 2012.

WEIGEL, D. Natural variation in *Arabidopsis*: from molecular genetics to ecological genomics. **Plant Physiology**, v. 158, n. 1, p. 2-22, 2012.

WESTOBY, M.; JURADO, E.; LEISHMAN, M. Comparative evolutionary ecology of seed size. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 7, n. 11, p. 368-372, 1992.

WESTOBY, M.; LEISHMAN, M.; LORD, J.; POORTER, H.; SCHOEN, D. J. Comparative ecology of seed size and dispersal [and discussion]. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 351, n. 1345, p. 1309-1318, 1996.

XIA, T.; LI, N.; DUMENIL, J.; LI, J.; KAMENSKI, A.; BEVAN, M. W.; GAO, F.; LI, Y. The ubiquitin receptor DA1 interacts with the E3 ubiquitin ligase DA2 to regulate seed and organ size in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 25, n. 9, p. 3347-3359, 2013.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No estudo observou-se que a variação fenotípica nos parentais, assim como na população de Linhagens Endogâmicas Recombinantes (RILs) e a resolução e o tamanho desta população foi suficiente para encontrar QTLs para qualidade de semente. Assim, esta população de RILs mostrou-se uma ferramenta no estudo de caracteres quantitativos, tendo em vista permitir a identificação de 124 QTLs para características relacionadas a germinação (G_{max} , t_{50}^{-1} , AUC e U_{8416}^{-1}) e 23 QTLs para tamanho e massa de semente.

Foi observado a complexidade do controle genético das características de qualidade de semente e interações genótipo x ambiente na detecção de QTLs. A identificação de diferentes QTLs em todos os ambientes maternos e de germinação indica que as condições foram eficientes para detectá-los. Devido a influência do ambiente na identificação de QTLs, mostra-se a necessidade de utilizar materiais genéticos sob diferentes ambientes nesse tipo de análise.

Identificou-se QTLs para características de germinação nos 12 cromossomos do tomateiro, no entanto observou-se que os intervalos de confiança entre 0,0-104,3 cM no cromossomo 6 e entre 0,0-36,1 cM no cromossomo 11 são regiões genômicas que mostram influência sobre QTLs para a qualidade de semente (características de germinação). Assim, confirma-se a hipótese de co-localização de QTLs para condições não-estressante e de estresse e que os parâmetros de germinação estão sob controle genético.

A sobreposição de QTLs entre respostas de germinação sob diferentes condições de estresse indica contribuição de genes semelhantes ou idênticos. Assim, a seleção para germinação rápida sob uma condição resultaria em progênie com maior germinação sob outras condições de germinação. A co-localização de QTLs para características de germinação suporta a dissecação genética da qualidade de semente, a fim de elucidar os mecanismos moleculares controladores. Essas regiões identificadas em diferentes ambientes de germinação poderão ser utilizadas na seleção assistida por marcadores (SAM) ou na clonagem gênica.

A investigação de QTLs para tamanho e massa de semente em tomateiro revelou que as RILs mostraram-se suficientes para o desenvolvimento de

Famílias Heterogêneas Endogâmicas (HIFs). A análise de HIFs confirmou ser uma abordagem eficiente, onde Linhagens Quase Isogênicas (NILs) foram obtidas a partir da heterozigosidade residual deixada na geração F₈ da população de RILs, tendo em vista a obtenção de linhagens segregantes apenas na região do QTL de interesse.

A partir das HIFs obtidas, com diferentes regiões heterozigotas que segregam para o QTL, foi possível confirmar e estreitar o QTL para tamanho e massa de semente no cromossomo 11 (intervalo de confiança entre 0,0 e 13,4 cM), onde o fenótipo do QTL é expresso para ambas características. Com o início do mapeamento refinado do QTL no cromossomo 11, a HIF 211 poderá ser utilizada como ponto de partida no aprimoramento do mapeamento do QTL e, finalmente, na identificação e clonagem do gene(s) causal dos processos interligados ao tamanho e à massa de semente. Além disso, os resultados poderão ser utilizados na SAM para otimizar ambas características.

Por fim, o mapeamento de QTLs associados à características de qualidade de semente em tomateiro abrirá oportunidades para melhorar a eficiência de melhoramento e seleção de plantas para linhagens com maior vigor de semente. Os marcadores moleculares ligados aos QTLs podem ser utilizados na SAM, proporcionando um método rápido para selecionar genótipos específicos sem a necessidade de avaliar extensivamente fenótipos em todas as fases do programa de melhoramento.