**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Controle hormonal do crescimento de raízes de tomateiro
(*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) em condições de déficit
hídrico.**

Angélica Maria de Campos Machado Pitelli

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Fitotecnia**

**Piracicaba
2006**

**Angélica Maria de Campos Machado Pitelli
Engenheiro Agrônomo**

**Controle hormonal do crescimento de raízes de tomateiro (*Lycopersicon
esculentum* cv. Micro-Tom) em condições de déficit hídrico.**

**Orientador:
Prof. Dr. PAULO ROBERTO DE CAMARGO E
CASTRO**

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Fitotecnia**

**Piracicaba
2006**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DI VI SÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/ USP

Pitelli, Angélica Maria de Campos Machado

Controle hormonal do crescimento de raízes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) em condições de déficit hídrico / Angélica Maria de Campos Machado. - - Piracicaba, 2006.
54 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

1. Crescimento vegetal 2. Hormônio vegetal 3. Mutação genética 4. Raiz 5. Tomate
I. Título

CDD 635.642

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - O autor"

Aos meus pais Robinson Antonio e Maria Angélica
Por todo apoio, confiança e incentivo
E por serem meu exemplo de vida
Com todo amor

OFEREÇO

Ao meu irmão Robinson Luiz
Pela amizade e ajuda

DEDICO

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de viver e realizar meus sonhos.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto de Camargo e Castro pela orientação, pela ética profissional e pela amizade, durante todo este tempo.

Ao Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres pelo apoio, pela paciência, pela amizade e pelo exemplo de profissionalismo.

À secretária de Programa de Pós-graduação da Fitotecnia Luciane Aparecida Lopes Toledo pela amizade, apoio e excelência profissional.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudo.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Biológicas Alexandre e Romeu pela ajuda e apoio inestimáveis.

Aos professores Pedro Jacob Christoffoleti, Marcos Silveira Bernardes e Francisco Mourão Filho pela coordenação das atividades realizadas no Programa de Fitotecnia.

Aos amigos e companheiros de sala André, Ana Claudia, Stella, Chryz e Silvio pela amizade, companheirismo e paciência.

Aos companheiros do Laboratório de Controle Hormonal e Desenvolvimento Vegetal, Joni, Lílian, Augustin, Simone e Fernando por todo o apoio e ajuda na realização dos experimentos.

Ao amigo e companheiro do Laboratório de Controle Hormonal e Desenvolvimento Vegetal, Rogério Falleiros Carvalho por toda a ajuda, amizade, incentivo e apoio incondicional na realização deste trabalho.

A amiga Dolorice pelo apoio inestimável e amizade durante estes anos.

Aos amigos da Esalq, Alexandra, Fernanda De Simoni, Virtual, Russo, Fernanda Salvador, Fernando, Hector, José Geraldo, Vanessa Toledo, Bardy, Vanessa Benez, Patrícia Favoretto, Kumprido, Roberta, Reinaldo, Thomas, Henriquinho, André (Sapateiro), Evandro, Guy, Paulo, Juliano, Cláudio, Cristiano, pela amizade e companheirismo.

A todos os alunos e funcionários dos Programas de Pós - graduação da Fitotecnia e da Fisiologia e Bioquímica de Plantas pelo companheirismo.

A minha prima Stella Maris Pitelli pela amizade, pelos conselhos, e paciência.

A amiga Silvia Scarassatti pela amizade e ajuda nos momentos mais difíceis.

A todos os professores e funcionários da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba pelo profissionalismo e exemplo.

“Pouco conhecimento faz com que as criaturas
se sintam orgulhosas.
Muito conhecimento, que se sintam humildes.
É assim que as espigas sem grãos erguem
desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que
as cheias a baixam para a terra, sua mãe.”

Leonardo Da Vinci

SUMÁRIO

RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Hormônios e crescimento radicular.....	15
2.2 Estresse hídrico e crescimento radicular.....	19
2.3 Controle hormonal do crescimento radicular sob estresse hídrico.....	20
2.4 Abordagem para o estudo da ação de hormônios.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Material vegetal.....	26
3.2 Desinfestação e germinação de sementes.....	27
3.3 Avaliação da regulação hormonal múltipla do crescimento radicular sob estresse osmótico.....	28
3.4 Efeito da adição de etileno no crescimento de raízes com diferentes balanços ABA/IAA ou respostas a ele.....	28
3.5 Efeito da inibição da ação do etileno no crescimento radicular em condições de estresse osmótico.....	29
3.6 Efeito da inibição do ABA no crescimento radicular em condições de estresse osmótico.....	30
3.7 Análise dos resultados.....	31
4 RESULTADOS DISCUSSÃO.....	32
4.1 Avaliação da regulação hormonal múltipla do crescimento radicular sob estresse osmótico.....	32
4.2 Efeito da adição de etileno no crescimento de raízes com diferentes balanços ABA/IAA ou respostas a ele.....	36

4.3 Efeito da inibição da ação do etileno no crescimento radicular em condições de estresse osmótico.....	39
4.4 Efeito da inibição do ABA no crescimento radicular em condições de estresse osmótico.....	41
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	45
REFERÊNCIAS	47

RESUMO

CONTROLE HORMONAL DO CRESCIMENTO DE RAÍZES DE TOMATEIRO (*Lycopersicon esculentum* cv. MICRO-TOM) EM CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO

A deficiência hídrica é o principal fator de estresse para o crescimento vegetal.. Dentre os mecanismos de resistência à seca tem-se a resposta de crescimento radicular sob condições de déficit hídrico. Esta resposta assume-se ser regulada por hormônios vegetais. Uma abordagem interessante para o estudo de processos regulados por hormônios é a utilização de mutantes hormonais em um modelo genético. O tomateiro cv. Micro-Tom por seu porte reduzido e ciclo de vida curto constitui em bom modelo genético. Mutantes hormonais em tomateiro com baixo nível endógeno de ABA (*sit*, *flacca*), insensível a etileno (*Nr*), com superprodução de etileno (*epi*) e insensível à auxina (*dgt*) constituem-se valiosas ferramentas para o estudo da ação hormonal na regulação de processos fisiológicos. O presente trabalho teve como objetivo estudar a interação hormonal na regulação do processo de crescimento radicular em condições de déficit hídrico no cultivar Micro-Tom de tomateiro. Sementes germinadas de MT e dos mutantes *sit*, *dgt*, *epi*, e *Nr* foram colocadas em caixas Gerbox pretas contendo água e soluções de PEG apresentando potenciais de $-0,3$; $-0,6$; $-0,9$; $-1,2$ MPa. Após cinco dias foi avaliado o comprimento da raiz e do hipocótilo. Também foram realizados experimentos com sementes de MT e dos mutantes em Gerbox contendo inibidores da biossíntese de ABA (fluridone), da ação do etileno, o tiosulfato de prata (STS) e um liberador desse mesmo hormônio, o ácido 2-cloro-etil-fosfonico (CEPA) em água e em solução de PEG com potencial osmótico de $-0,6$ MPa. O comprimento das raízes foi avaliado após cinco dias. O potencial osmótico de $-0,6$ MPa favoreceu o crescimento radicular nos genótipos MT, *dgt* e *epi* e em menor grau em *Nr*. Esse crescimento não ocorreu nos genótipos *sit*. No mutante *sit* há um inchaço semelhante ao provocado por excesso de etileno. Quando foi adicionado o CEPA (etileno), houve inibição severa do crescimento radicular em água em MT e em *sit*. A inibição foi menor em *dgt*. Em potencial de $-0,6$ MPa a inibição foi mais severa do que em água no MT. A inibição do etileno provocada pelo STS, causou uma maior diferença entre o crescimento em água e no potencial de $-0,6$ MPa no MT à medida em que se aumentava a concentração de STS. Em *dgt* tais diferenças não foram observadas. Quando se adicionou fluridone, à medida que se aumentou a dose, houve uma maior inibição do crescimento radicular, sendo que esta inibição foi menos acentuada em *Nr* e *dgt*. Em potencial de $-0,6$ MPa a inibição foi mais acentuada mas seguiu a mesma tendência observada em água. Em altas concentrações de fluridone houve ramificação das raízes, interferindo no comprimento radicular. Pode-se concluir que em condições de déficit hídrico moderado há um aumento do crescimento radicular quando comparado a condições normais de

suprimento hídrico. Esse crescimento provavelmente é controlado por um balanço ABA/IAA, o qual modula a resposta ao etileno.

Palavras chave: *Lycopersicon*, mutantes hormonais, crescimento radicular, hormônio vegetal.

ABSTRACT

HORMONAL CONTROL OF ROOT GROWTH OF MICRO - TOMATO (*Lycopersicon esculentum* cv. MICRO-TOM) UNDER WATER DEFICIT CONDITION

Drought is the major abiotic plant stress factor. Among the mechanisms of water deficit resistance the root growth response has expressive importance. This response seems to be regulated by hormones. An interesting method to study hormone regulated processes is the use of hormonal mutants. The tomato cultivar Micro-Tom (MT) have reduced size and short life cycle and therefore constitutes an excellent genetic model for physiology studies. Hormonal mutants in MT with low endogenous ABA (*sit* and *flc*), ethylene insensitivity (*Nr*), ethylene overproduction (*epi*) and auxin insensitivity (*dgt*) constitute valuable tools to study hormone action in plant development. The present work aimed to study the hormonal interaction in the control of root growth of tomato MT subjected to water deficit. Germinated seeds of MT and mutants *epi*, *sit*, *Nr*, e *dgt* were placed in a black Ger-Box containing water and PEG 6000 solutions with potentials of -0,3; -0,6; -0,9 e 1,2 MPa. After 5 days the length of root and hypocotyls were measured. Others experiments were conducted in Ger-Box containing ethylene action inhibitor, silver thiosulphate (STS), ABA biosynthesis inhibitor (Fluridone) and an ethylene releaser, 2-chloroethyl-phosphonic acid (CEPA) in different concentrations in water and in a -0,6 MPa osmotic potential PEG solution. After 5 days the length of the roots were measured. The PEG solution of -0,6 MPa promoted root growth in MT, *dgt*, *epi* and in with less intensity in *Nr*. The promotion of root growth did not occur in *sit*. In the mutant *sit*, low potential caused a swelling in the roots similar to excess ethylene symptoms. When CEPA was used, a severe inhibition of root growth occurred. The inhibition was less intense in *dgt*. In the -0,6 MPa solution the inhibition was more severe than occurred in water in MT. When ethylene action was inhibited by the application of STS, a greater difference of root growth between water and -0,6 MPa PEG solution occurred as the STS concentration increased. In the mutant *dgt* these differences were not observed. In the experiment with fluridone as the dose increased the inhibition in the root growth increased concomitantly. The inhibition was less severe in *Nr* and *dgt*. In higher doses of fluridone root ramification occurred, interfering in the primary root length. By these results it can be concluded that a moderate water deficit promotes root growth better than in a normal water supply condition. Probably this growth is regulated by an ABA/IAA balance which modulates ethylene response.

Key words: *Lycopersicon*; hormonal mutants; water stress; root elongation; plant hormones

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efeito do estresse osmótico no comprimento de raízes e caules (hipocótilos) de tomateiro cultivar Micro-Tom (MT) e dos mutantes sitiens (<i>sit</i>), diagetropica (<i>dgt</i>), Never ripe (<i>Nr</i>) e epinastic (<i>epi</i>).....	34
Figura 2 - Efeito da aplicação de CEPA (liberador de etileno) sobre o comprimento de raízes em água (A) e sob estresse osmótico moderado (B) em MT e nos mutantes <i>sit</i> e <i>dgt</i>	37
Figura 3 - Aspecto das plântulas de MT, <i>sit</i> e <i>dgt</i> em água e em potencial de – 0,6 MPa nas concentrações de 0 e 500 µM de CEPA.....	38
Figura 4 - Efeito de um inibidor da ação de etileno (STS) no comprimento de raízes com e sem estresse osmótico em MT (A) e no mutante <i>dgt</i> (B).....	40
Figura 5 - Aspecto de plântulas de MT e <i>dgt</i> em água e em potencial de – 0,6 MPa em diferentes concentrações de STS.....	41
Figura 6 - Efeito de um inibidor de ABA (fluridone) no comprimento de raízes sem estresse osmótico (A) e com estresse osmótico (B) em MT e nos mutantes <i>dgt</i> , <i>epi</i> e <i>Nr</i>	42
Figura 7 - Aspectos de plântulas de MT <i>dgt</i> , <i>epi</i> e <i>Nr</i> em água e em potencial de – 0,6 MPa em diferentes concentrações de fluridone.....	44
Figura 8 - Uma hipótese para a modulação do crescimento do sistema radicular pelo balanço entre auxina e ácido abscísico.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA = ácido abscísico

CEPA = ácido cloro-etil-fosfônico

dgt = mutante diagetropica

epi = mutante epinastic

IAA = ácido indolilacético

MT = Micro-Tom

Nr = mutante Never ripe

PEG = polietileno glicol

sit = mutante sitiens

STS = tiosulfato de prata

1 INTRODUÇÃO

Plantas freqüentemente encontram estresses ambientais, condições externas que afetam o desenvolvimento ou crescimento de órgãos isolados, que podem ter impacto na produtividade de culturas. Esses estresses ativam variadas respostas nas plantas desde alteração na expressão gênica e no metabolismo até mudanças na taxa de crescimento e produtividade.

A seca é o principal fator de estresse abiótico que limita a produtividade em todo o mundo e o entendimento dos mecanismos que controlam a resistência à seca é importante recurso para a biologia vegetal. A medida que a água para irrigação se torna escassa, o desenvolvimento de linhagens resistentes a seca converte-se em prioridade. Um aspecto importante em relação à tolerância à seca é a resposta de crescimento radicular sob condições de estresse hídrico.

Em plantas crescendo em solos secos, o desenvolvimento do sistema radicular é normalmente menos inibido que a parte aérea, e pode até ser promovido (SHARP; DAVIES, 1989). Essa resposta do sistema radicular ao déficit hídrico assume-se ser devido à atuação e o balanço de hormônios vegetais como o ácido abscísico (SHARP, 2002), a auxina (RIBAUT; PILET, 1994) e o etileno (SPOLLEN et al., 2000).

A manutenção do crescimento do sistema radicular durante déficits hídricos é um benefício obvio para manter um adequado suprimento hídrico e os mecanismos que levam a essa resposta devem ser estudados. Uma abordagem para estudar esse crescimento radicular em condições de estresse hídrico é o uso de um modelo genético no qual mutantes hormonais estão disponíveis. É o caso do tomateiro cultivar Micro-Tom, que apresenta características de modelo genético e apresenta mutantes hormonais (PERES et al., 2004),

O uso destes modelos genéticos e mutantes em diferentes classes hormonais tem sido pouco explorado no estudo de estresse hídrico, entretanto podem tornar-se importante ferramenta na elucidação dos mecanismos fisiológicos deste processo.

O presente trabalho teve como proposta estudar a interação hormonal no controle do crescimento radicular em condições de estresse hídrico através do uso de um modelo genético, o cultivar de tomateiro Micro-Tom, e seus mutantes hormonais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hormônios e crescimento radicular

O entendimento do desenvolvimento e do crescimento das raízes se faz relevante nas espécies de interesse agrônômico, uma vez que a produtividade de qualquer cultura é dependente da absorção de água e nutrientes por esse órgão (GABELMAN et al., 1986).

Dentre outros fatores, o crescimento radicular é controlado por hormônios endógenos, cuja interação parece essencial (PERES; KERBAUY, 2000).

A auxina (IAA) é o hormônio responsável pela indução de raízes adventícias. Entretanto, sabe-se que também provoca inibição do crescimento radicular em tratamentos exógenos. Pilet; Elliott e Moloney (1979) confirmaram que, quando aplicado em alta concentração, o IAA inibiu o crescimento radicular de milho.

Entretanto, também foi verificado que este hormônio em baixa concentração promove crescimento de raízes intactas. Pilet; Elliott e Moloney (1979), trabalhando com raízes de milho, mostraram que o conteúdo endógeno de auxina nas raízes intactas costuma se elevar durante seu crescimento, de tal forma que após alcançar uma concentração supra-ótima a aplicação de auxina causa uma inibição do crescimento, corroborando os resultados anteriores.

O ácido abscísico (ABA) também é um conhecido inibidor do crescimento radicular (PILET; SAUGY, 1987). Além dos trabalhos de Pilet em raízes de milho, pode se citar, entre vários outros, que em *Lactuca sativa*, a aplicação de 38-41 μM de ABA induziu a uma inibição de cerca de 30 % do crescimento radicular (ASPINALL; PALEG; ADDICOTT, 1967). Para tomateiro cultivado *in vitro*, a aplicação de 0,1 μM de ABA provocou uma inibição no crescimento de cerca de 50% (STREET, 1969). Entretanto, existem alguns trabalhos que indicam um efeito estimulante no alongamento celular promovido pelo ABA (PILET, 1998). A exemplo disso, o crescimento radicular de *Pisum sativum* foi aumentado em 29% quando houve aplicação de 1 μM de ABA (GAITHER; LUTZ; FORRENCE, 1975).

Pilet e Saugy (1987), notando a similaridade das respostas do crescimento radicular em relação a IAA e ao ABA, em experimento com raízes de milho, compararam o efeito de IAA e ABA endógeno e aplicado no crescimento radicular. Foi observado que as raízes com crescimento lento foram inibidas pelos hormônios aplicados em qualquer concentração, enquanto que raízes com crescimento rápido tiveram seu crescimento aumentado por ambos os hormônios em baixa concentração, sendo que o efeito do IAA no alongamento radicular é mais intenso que o do ABA. Esses mesmo autores quantificaram o nível destes hormônios em raízes em crescimento. As raízes foram divididas em grupos com diferentes taxas de crescimento a fim de relacionar taxa de crescimento radicular e nível endógeno de IAA e ABA. Observou-se que há uma clara relação entre os parâmetros, mostrando que quanto menor o nível endógeno destes hormônios maior é o crescimento radicular, sendo que no caso de raízes com crescimento lento, foi encontrado mais IAA na zona de extensão. Pode-se entender que as raízes com rápido crescimento apresentam concentrações sub-ótimas de IAA e ABA, o que permite o crescimento radicular quando há a aplicação de baixas concentrações destes hormônios.

Como ambos os hormônios provocam o mesmo comportamento, apesar de em diferente intensidade, há também a interpretação de que a resposta à auxina pode estar sendo influenciada pelo conteúdo endógeno de ABA e vice-versa. Em outras palavras, a regulação do crescimento radicular poderia se dar através de um balanço entre IAA e ABA (PERES; KERBAUY, 2000).

As citocininas são sintetizadas nos ápices radiculares e são transportadas até a parte aérea via xilema (VAN STADEN; DAVEY, 1979). Já se considerou que apesar de estarem presentes em alta concentração no ápice das raízes, as citocininas não estão envolvidas na regulação do crescimento radicular (TORREY, 1976). Entretanto alguns experimentos sugerem que as citocininas endógenas, em concentrações fisiológicas normais inibem o crescimento da raiz (SAKAI et al., 2001). Pode-se citar como exemplo o fato de que tanto um mutante deficiente para um dos receptores de citocinina, quanto um mutante com um alelo com perda de função para um elemento sinalizador de citocinina, apresentam raízes mais longas do que o tipo selvagem (SAKAI et al., 2001). Outro exemplo é a planta de tabaco transgênica, que super expressa a citocinina

oxidase e assim reduz os níveis de citocinina, apresentando também raízes mais longas do que o seu tipo selvagem (WERNER et al., 2001). Tais resultados indicam que as citocininas endógenas podem regular negativamente o alongamento das raízes.

Existem também vários relatos da resposta das raízes à aplicação de citocinina exógena. Stenlid (1982) observou que adicionando citocinina à solução de crescimento houve inibição do alongamento radicular. Bertell; Bolander e Eliasson, (1990) também observaram que uma resposta comum a aplicação exógena de citocinina é um aumento na no diâmetro das raízes. Bertell e Eliasson (1992), estudaram como a citocinina, o etileno e a auxina interagem no alongamento das raízes, confirmando que as raízes são afetadas pela citocinina, inibindo o crescimento radicular e induzindo a um inchaço das raízes, assim como a auxina e o etileno. Tal inchaço pode ser facilmente interpretado como sendo característico do efeito da auxina e da citocinina na indução da produção de etileno. Hashimoto (1961 apud BERTELL; ELIASSON, 1992) demonstrou que a citocinina causava inchaço em ervilha somente na presença de auxina. Bertell; Bolander e Eliasson, (1990) também notaram essa interação sinérgica em raízes de ervilha, sugerindo que o nível endógeno de auxina pode ser um fator importante determinando se a aplicação de citocinina vai resultar ou não no inchaço das raízes. Hoje sabemos que auxina e citocininas possuem funções complementares na biossíntese do etileno, sendo a primeira classe hormonal indutora da transcrição do gene da sintase do ACC (uma enzima chave na biossíntese do etileno) e a citocinina age pós - transcricionalmente favorecendo o acúmulo da proteína para a sintase do ACC (RASHOTTE et al., 2005). Um evento que pode favorecer esse sinergismo é a constatação de que tratamentos com citocinina normalmente aumentam o conteúdo de auxina dos tecidos das plantas (NOOR SALEH, 1981).

Stenlid (1982) já havia sugerido que o efeito inibitório da citocinina no crescimento é mediado pelo aumento na produção de etileno. Cary; Liu e Howell (1995) examinaram a relação entre as respostas em *Arabidopsis* da aplicação de citocinina e de etileno e descobriram que o etileno é mediador de uma série de respostas da planta a citocinina, como a inibição do crescimento radicular e do hipocótilo. Segundo os autores, a citocinina estimula a produção de etileno, que por sua vez, inibi o

crescimento radicular, e por isso o efeito inibitório da citocinina pode ser bloqueado, em parte, pela ação de inibidores de etileno ou por mutantes defectivos em etileno.

O etileno é conhecido por ter um papel importante na regulação de diversos processos fisiológicos, como senescência foliar, abscisão de órgãos, amadurecimento de frutos, entre outros. Entretanto, desde a descoberta de que o etileno apresenta efeito estimulante na formação de raízes adventícias em diversas espécies (ZIMMERMAN; HITCHCOCK apud CLARK et al., 1999), vários experimentos têm sido conduzidos com o intuito de verificar o papel deste hormônio na iniciação e desenvolvimento das raízes (CLARK et al., 1999).

Os resultados têm se apresentados contraditórios. Em experimentos com tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) usando aplicação exógena de etileno, verificaram-se efeitos estimulantes (PHATAK; JAWORSKI; LIPTAY, 1981) e inibitórios (COLEMAN et al., 1980).

Na maior parte dos trabalhos publicados, o etileno é citado como inibidor do crescimento radicular. Whalen e Feldman (1988) confirmaram esta hipótese, ao verificarem o controle do crescimento primário de raízes de milho pelo etileno e observarem que em concentrações de etileno iguais ou maiores que 0,1 $\mu\text{L/L}$ o alongamento radicular foi inibido por 24 horas, sendo este recuperado após 15 minutos da remoção do hormônio.

Entretanto Konings e Jackson (1979 apud FELDMAN, 1984) trabalhando com raízes intactas de arroz, mostarda branca e diversas variedades de tomateiros, mostraram que as raízes com maiores taxas de alongamento também mantinham as maiores taxas de etileno endógeno. Esses mesmos autores também observaram que quando raízes com níveis conhecidos de etileno endógeno eram expostas a etileno exógeno, a natureza da resposta dependia da concentração externa do hormônio. Em condições de baixa concentração de etileno (0,02-0,1 ppm), o alongamento era estimulado em todas as raízes examinadas. Entretanto quando a concentração passava de 0,1 ppm, podia-se observar inibição de algumas raízes, sendo que à concentração de 1 ppm, todas as raízes eram inibidas. Pode-se concluir que a planta precisa de uma concentração ótima de etileno endógeno sendo que, enquanto não se atinge essa concentração, a aplicação de etileno exógeno promove o crescimento radicular. Depois

de atingida esta concentração, o etileno passa a servir como inibidor do crescimento radicular.

O hormônio giberelina é considerado um regulador muito importante no controle do crescimento da parte aérea (HEDDEN; PROEBSTING, 1999). Entretanto, evidências em várias espécies indicam que as giberelinas são também requeridas para o desenvolvimento normal das raízes (Yaxley et al., 2001). Inada et al. (2000) em estudo com *Lemna minor*, mostrou que o crescimento radicular foi inibido pelo uniconazole-P, um inibidor da biossíntese de giberelina, e que a inibição pode ser suavizada pela aplicação de GA₃, indicando que a giberelina endógena está envolvida no controle do crescimento radicular.

Yaxley et al. (2001), em experimento com mutantes em giberelina de ervilha (*Pisum sativum*), mostraram que a deficiência em giberelina era acompanhada de menor alongamento radicular, e que estes mutantes respondem à aplicação exógena de giberelina. Esses autores também mostraram que no tipo selvagem de ervilha, a aplicação exógena de giberelina não aumenta o comprimento radicular, apoiando os resultados de Tanimoto (1988) que demonstraram a inabilidade da aplicação de GA promover maior alongamento radicular em ervilhas do tipo selvagem a não ser nas que foram previamente tratadas com inibidor de biossíntese de GA. Esses resultados sugerem que o nível de GA nas raízes de genótipos não mutantes é suficiente para o crescimento máximo das raízes. Recentemente foi demonstrado, através do uso de mutantes de *Arabidopsis*, que a promoção do crescimento radicular pela auxina endógena é através da desestabilização de proteínas repressoras (DELLA proteins) da resposta ao GA (FU; HARBERD, 2003). Tais resultados evidenciam que pelo menos parte do efeito da auxina na promoção do crescimento radicular é mediado por GA.

2.2 Estresse hídrico e crescimento radicular

Entre os vários fatores limitantes da produção vegetal, o déficit hídrico ocupa posição de destaque, pois além de afetar as relações hídricas nas plantas, alterando-lhes o metabolismo, é fenômeno que ocorre em grandes extensões de áreas cultiváveis (NOGUEIRA; MORAES; BURITY, 2001).

As respostas das plantas ao déficit hídrico dependem, entre outros, das características das plantas, incluindo órgão ou tecido atingido, estágio de desenvolvimento e genótipo.

Uma característica importante da resposta do sistema radicular ao estresse hídrico é a capacidade de algumas raízes de continuar o alongamento em potenciais hídricos que são baixos o suficiente para inibir completamente o crescimento da parte aérea (SHARP; DAVIES, 1979). Esses mesmos autores observaram esse processo em raízes adventícias de milho, que precisam penetrar na camada seca da superfície do solo. Sharp; Silk e Hsiao (1988) observaram um maior crescimento de raízes primárias em diversas espécies sob condições de estresse hídrico, o que proporcionava o estabelecimento das plântulas, uma vez que assegurava o suprimento de água antes da emergência da parte aérea.

2.3 Controle hormonal do crescimento radicular sob estresse hídrico

Os mecanismos que determinam a diferente sensibilidade das raízes e da parte aérea ao estresse hídrico não são bem entendidos. Os hormônios parecem ter importante papel regulatório. Entretanto, pouco se conhece sobre o papel dos hormônios e suas possíveis interações no controle deste crescimento radicular sob condições de estresse hídrico.

O hormônio mais estudado neste aspecto é o ácido abscísico (ABA). Tem sido mostrado que para manter o crescimento de raízes primárias de milho sob condições de baixo potencial hídrico é necessário o acúmulo de ácido abscísico (SHARP, 2002). Esse mesmo autor observou que quando plântulas de milho são conduzidas sob potenciais hídricos de $-1,6$ MPa, o conteúdo de ABA na zona de crescimento da raiz aumenta cerca de cinco vezes.

Ribaut e Pilet (1991) em estudo com raízes de milho, observaram que à medida que aumentava a severidade do estresse hídrico, ao conteúdo de ABA nas raízes também aumentava, atingindo o máximo valor no nível de estresse correspondente a um potencial hídrico de $-1,09$ MPa.

Saab et al. (1990), com o objetivo de reduzir o acúmulo de ABA endógeno em plântulas crescendo sob baixo potencial hídrico, utilizaram-se de duas técnicas: um mutante de milho (*vp5*) deficiente na biossíntese de ABA, e uma substância inibidora da biossíntese de carotenóide (fluridone), a qual é precursor de ABA (Taylor et al., 2000). No tratamento com fluridone, houve uma redução no crescimento das raízes primárias sob condições de baixo potencial hídrico. A taxa de alongamento das plântulas tratadas com fluridone foi reduzida em 83% nas primeiras 30 horas após o transplante para vermiculita com baixo potencial hídrico. Nas plântulas não tratadas, a taxa de alongamento foi reduzida em apenas 55% no mesmo potencial hídrico. O tratamento com fluridone teve pouco efeito na taxa de alongamento em condições de alto potencial hídrico (6-16% de redução no experimento). No experimento com o mutante *vp5*, a taxa de alongamento do mutante, sob baixo potencial hídrico, foi reduzida em 86% comparada com o genótipo selvagem. Como era esperado, baixo potencial hídrico induziu um significativo aumento no conteúdo de ABA nas plântulas não tratadas e de genótipo selvagem. Nas plântulas tratadas com fluridone e nos mutantes, no mesmo potencial hídrico, o acúmulo de ABA foi reduzido consideravelmente. Os autores sugerem que a redução no acúmulo de ABA foi responsável pela inibição severa do alongamento nas plântulas tratadas com fluridone e nos mutantes *vp5* em condições de baixo potencial hídrico. Isto indica que o acúmulo de ABA tem papel direto na manutenção do crescimento da raiz primária em condições de estresse hídrico.

Estudos recentes têm demonstrado que uma importante função do ABA endógeno na manutenção do crescimento da raiz primária em condições de baixo potencial hídrico é prevenir o excesso de produção de etileno (SHARP, 2002). A produção de etileno pelas plantas é aumentada por diversos tipos de estresse biótico ou abiótico (ABELES, 1973). Déficit hídrico é um dos fatores que tem sido extensivamente associado com elevada produção de etileno (GRAVES; GLADON, 1985).

Gertman e Fuchs (1972) estudando o efeito do ABA na produção de etileno em plântulas de ervilha (*Pisum sativum*) e suas interações com IAA, cinetina e ácido giberélico, mostraram que o ABA em concentração de 0,1 μ M a 1 μ M inibiu a produção de etileno nas plântulas. Já o IAA e a cinetina induziram a produção de etileno.

Foi observado que raízes de plântulas deficientes em ABA, crescendo em condições de baixo potencial hídrico apresentam, não somente menor crescimento, como também engrossamento da raiz acima dos 2 mm apicais. Etileno exógeno inibe o alongamento e causa um quadro similar de engrossamento das raízes em condições de alto potencial hídrico (WHALEN; FELDMAN, 1988).

Alem disso, foi demonstrado que sob estresse hídrico, a produção de etileno de plântulas deficientes em ABA foi significativamente maior que nas plantas controle, e esse efeito foi completamente revertido quando o conteúdo de ABA foi restaurado através da aplicação exógena, juntamente com a retomada do crescimento das raízes (SPOLLEN et al. 2000). Assim, pode-se deduzir que um aumento na concentração de ABA em raízes sob condições de estresse hídrico é suficiente para prevenir a produção excessiva de etileno, de acordo com os resultados já demonstrados que as raízes em condições de baixo potencial hídrico necessitam de um conteúdo ótimo de ABA para a manutenção do crescimento.

Alguns autores já discutem um possível papel do IAA na manutenção do crescimento radicular sob estresse hídrico. Ribaut e Pilet (1994) investigaram se existem mudanças nos níveis de auxina (livre e conjugada) em raízes de milho intactas e isoladas em condições de estresse hídrico. Foram realizadas medidas de peso, conteúdo de água, crescimento e nível de IAA destas raízes. Observou-se que com o aumento do estresse hídrico houve um aumento no nível de auxina. O maior aumento no nível de auxina (cerca de 2,7 vezes mais que o controle) foi observado quando as raízes foram submetidas a um estresse correspondente a um potencial osmótico de -1,39 MPa na solução. O aumento dos níveis de auxina não diferiu entre as raízes intactas e as isoladas. Considerando os resultados os autores chegaram à conclusão que o IAA parece ter importante papel na regulação do metabolismo e crescimento das raízes em condições de estresse hídrico.

Pode-se concluir, então, que os hormônios ABA, auxina e etileno controlam o crescimento radicular sob estresse hídrico, interagindo de um modo dinâmico e complexo e ainda não elucidado. Assim, é de extrema importância a realização de mais estudos, utilizando novas abordagens, para lançar luzes novas ao entendimento do controle hormonal do crescimento radicular sob déficit hídrico.

2.4 Abordagem para o estudo da ação dos hormônios

Para o estudo do papel dos hormônios no crescimento e no desenvolvimento como um todo das plantas, existem três abordagens experimentais: a aplicação exógena do hormônio ou do inibidor do hormônio; a realização de dosagens de hormônios endógenos e a utilização de mutantes ou plantas transgênicas. Como se verá adiante, todas essas abordagens são válidas e têm dado ou já deram consideráveis contribuições ao entendimento que temos hoje sobre os hormônios vegetais. Contudo, há limitações intrínsecas de cada abordagem que precisam ser levadas em conta antes de utilizá-las.

A técnica de aplicação de hormônios ou inibidores é normalmente utilizada quando o objetivo é buscar respostas específicas para cada classe hormonal e construir curvas de dose-resposta para se testar a sensibilidade de um genótipo ou determinar uma dose limite em um processo. A aplicação exógena do hormônio tem como limitação o fato de que há necessidade de se ter o hormônio purificado, o qual, dependendo da classe química, pode ser muito onerosos (ex. brassinoesteróides). Outro fator que encarece a purificação de hormônios é a presença de isomeria óptica (ex. forma + de ABA) e de posição (forma cis de ABA e trans de zeatina) na determinação da forma realmente ativa. Além disso, há pouco conhecimento relacionando as quantidades aplicadas com o que realmente é absorvido pelo tecido teste e sobre os possíveis efeitos do hormônio aplicado na biossíntese ou inativação dos hormônios endógenos. No caso do uso de inibidores, estes não são disponíveis para todas as classes hormonais e nem sempre são específicos. Desse modo, embora exista uma gama de inibidores para GA (RADEMACHER, 2000) e etileno (McKEON; FERNÁNDEZ-MACULET; YANG, 1995), inibidores inequivocamente relacionados com auxina só são disponíveis para bloquear seu transporte (exemplo TIBA e NPA). Como já mencionado anteriormente, inibidores da biossíntese de carotenóides podem ser utilizados para inibir a biossíntese de ABA, mas são obviamente inespecíficos. No caso das citocininas, já se relatou a produção de inibidores de sua biossíntese (SHIMIZU et al., 1989; SKOOG et al., 1973; SKOOG et al., 1975), mas estudos posteriores têm demonstrado que não são verdadeiros (PERES, comunicação pessoal).

Já a metodologia de dosagens hormonais consiste na utilização de métodos físico-químicos como a cromatografia gasosa, a HPLC e o teste ELISA, para a medição do conteúdo endógeno de hormônios em ensaios biológicos. Como os hormônios estão em baixa concentração nos tecidos vegetais, as técnicas existentes precisam ser muito sensíveis, o que demanda equipamentos e reagentes onerosos, além da técnica em si se tornar trabalhosa. Além disso, não se tem controle e/ ou conhecimento se o que está sendo dosado estava realmente ativo. Ou seja, toda dosagem envolve uma etapa de extração e purificação que pode gerar artefatos ativando hormônios antes inativos por conjugação. Há que se ter em conta que a própria maceração durante a extração mistura tecidos, células e compartimentos celulares com características distintas e faz com que se perca a informação sobre ativação ou desativação por compartimentarização. Nesse contexto, uma técnica de dosagem que parece ser promissora é a imunolocalização do hormônio ou, alternativamente, das proteínas ou transcritos (mRNAs) envolvidas no metabolismo (proteínas de biossíntese e inativação) ou sensibilidade (proteínas receptoras ou componentes da via de transdução de sinal).

Atualmente, uma das principais abordagens para o estudo do controle hormonal do desenvolvimento tem sido o uso de genótipos contrastantes, sejam eles mutantes, plantas transgênicas ou variação genética natural. Os mutantes podem ser encontrados espontaneamente ou podem ser obtidos através da indução artificial, que consiste na aplicação de substâncias químicas (EMS) ou de radiação (raio gama, raios-X ou nêutrons) e posterior triagem ou “screening”.

Tais estudos são geralmente realizados em um reduzido número de espécies vegetais, as quais possuem uma série de requisitos que as tornam bons modelos genéticos para estudos fisiológicos. Dentre as espécies que preenchem tais requisitos, o tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) está sendo amplamente utilizado. O tomateiro possui genoma relativamente pequeno ($7,1 \times 10^8$ pb), facilidade de manipulação *in vitro* e obtenção de plantas transgênicas (PERES; MAJEROWICS; KERBAUY, 2001), além de uma ampla riqueza de germoplasma constituída por diversas mutações e pela possibilidade de introgressão de variação genética natural vinda de 9 espécies selvagens de *Lycopersicon* que podem ser cruzadas com o tomateiro cultivado (STEVENS; RICK, 1986). Entre as várias mutações já descritas em

tomateiro, encontram-se mutantes com alterações no metabolismo e/ou sensibilidade de auxina (HICKS; RAYLE; LOMAX, 1989; KELLY; BRADFORD, 1986), ácido abscísico (TAYLOR; BURBIDGE; THOMPSON, 2000; BURBIDGE et al., 1999), giberelinas (JONES, 1987; BENSEN; ZEEVAART, 1990; KOORNNEEF et al., 1990), etileno (FUJINO et al., 1988; WIKINSON et al., 1995) e brassinoesteróides (BISHOP et al., 1999; KOKA et al., 2000), além de vários que alteram o desenvolvimento do sistema radicular (STEVENSON; RICK, 1986).

Para uma abordagem genética do controle hormonal do desenvolvimento está sendo desenvolvida (pela equipe do prof. Lázaro E. P. Peres, ESALQ/USP) uma produção de linhagens isogênicas contendo diversas mutações hormonais, plantas transgênicas e variação genética natural no “background” do cultivar de tomateiro Micro-Tom. O cultivar miniatura de tomateiro, proposto por Meissner et al. (1997) como modelo genético, produz frutos e sementes viáveis em vasos de apenas 50-100 mL de substrato, completando seu ciclo em 70-90 dias. Com essas características, o cultivar Micro-Tom pode crescer em laboratório na mesma estrutura mínima requerida para *Arabidopsis* (PERES, 2001).

Assim o objetivo do presente trabalho foi utilizar estes modelos genéticos, bem como sua coleção de mutantes hormonais, a fim de investigar a ação dos hormônios, bem como suas possíveis interações no processo de crescimento radicular em condições de estresse hídrico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

No presente trabalho foram utilizadas plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*): mutantes hormonais *dgt*, *epi*, *Nr*, *sit* e *flc* (tabela 1) e o cultivar Micro-Tom (MT). Os parentais dos mutantes hormonais foram gentilmente cedidos pelo Dr. Roger Chetelat do Tomato Genetics Research Center (TGRC, University of Califórnia, Davis, USA) e o parental MT foi doado pelo Dr.A. Levy (Weizmann Institute of Science – Israel). As mutações acima citadas e outras afetando o metabolismo ou a sensibilidade a diversas classes hormonais foram obtidas por cruzamentos e retrocruzamentos sucessivos (introgressão) para um mesmo “background” genético representado pelo cultivar MT. Esse trabalho vem sendo realizado no Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento da Esalq/USP. Detalhes sobre os processos de cruzamento e introgressão podem ser vistos em Lima et al. (2004) e no seguinte “site”:

<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/protocol/ManualCruzamento.PDF>

Tabela 1 - Caracterização dos mutantes de tomateiro com alterações no metabolismo/sensibilidade hormonal

Mutantes	Características Morfológicas e funções dos genes correspondentes	Referência
<i>diageotropica (dgt)</i>	Planta anã, crescimento dos caules e raízes; ramificação. Defectivo na via de sinal de auxina	Kelly & Bradford, 1986
<i>Never ripe (Nr)</i>	Plântulas não apresentam resposta ao serem tratadas com etileno. Frutos não amadurecem totalmente. Defectivo para um gene do receptor de etileno	Winkinson et al., 1995
<i>epinastic (epi)</i>	Epinastia severa; caule e pecíolos dilatados; raízes muito ramificadas. Superprodução de etileno.	Fujino et al., 1988
<i>Sitiens (sit)</i>	Planta pequena e fraca, folhas pequenas com supermurchamento sob estresse. Sementes tendem a germinar dentro dos frutos muito maduros (viviparidade). Defectivo para o gene que codifica uma ABA - aldeído oxidase.	Taylor et al., 2000

3.2 Desinfestação e germinação de sementes

As sementes de tomate foram colocadas em uma solução 5% de desinfetante comercial (Cândida) a qual continha cerca de 2% de hipoclorito de sódio por 5 minutos. Depois estas sementes foram lavadas com água destilada em abundância. As sementes já desinfestadas de cada genótipo foram colocadas para germinar em caixas Gerbox pretas contendo duas folhas papel de filtro embebido em água destilada. Foram colocadas 100 sementes em cada caixa por genótipo e estas foram deixadas em temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) para germinação no escuro. As sementes foram deixadas germinar por 02 dias em média, sendo posteriormente transferidas para os respectivos tratamentos assim que a ponta da radícula fosse visível. Foram utilizadas caixas pretas para que não houvesse ramificação da raiz primária promovida pela luz.

3.3 Avaliação da regulação hormonal múltipla do crescimento radicular sob estresse osmótico

A sementes germinadas dos mutantes *dgt*, *sit*, *epi* e *Nr* e do controle MT foram colocadas em caixas Gerbox pretas contendo 5 folhas de papel toalha comercial mais uma folha de papel de filtro e 30 ml de cada solução tratamento. As soluções tratamentos constaram de soluções de PEG 6000 (polietileno Glicol) em diferentes proporções para se chegar aos seguintes potenciais osmóticos:

1. Água = 100 ml de água destilada + 0 de PEG 6000
2. - 0,3 MPa = 100 ml de água destilada + 15,14 g de PEG 6000
3. - 0,6 MPa = 100 ml de água destilada + 22,37 g de PEG 6000
4. - 0,9 MPa = 100 ml de água destilada + 27,93 g de PEG 6000
5. - 1,2 MPa = 100 ml de água destilada + 32,63 g de PEG 6000

As quantidades de PEG 6000 para atingir os potenciais osmóticos determinados acima foram obtidas na tabela de potencial osmótico em função da concentração (molalidade) de PEG calculada por Villela; Filho e Siqueira (1991). Foi considerado 1 MPa = 10 atm ~ 1 bar. As sementes foram deixadas nas caixas contendo os tratamentos por 5 dias em temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e posteriormente foi avaliada o comprimento da raiz e do hipocótilo com auxílio de paquímetro.

3.4 Efeito da adição de etileno no crescimento de raízes com diferentes balanços ABA/IAA ou respostas a ele

Sementes germinadas de MT, *sit* e *dgt* foram colocadas em caixas Gerbox pretas com 5 folhas de papel toalha comercial mais uma folha de papel de filtro com papel de filtro embebidas com diversas concentrações de CEPA (0, 50, 100, 500 e 1000 μM) em água e em solução de PEG com potencial osmótico de - 0,6 MPa. A fim de não alterar o volume já determinado de 30 ml de solução tratamento em cada Gerbox, foram feitas soluções estoques de CEPA de modo a adicionar somente 30 μl destas para se obter a

concentração desejada de CEPA (tabela 2). Após 5 dias, determinou-se o comprimento das raízes.

Tabela 2 - Memória de cálculo para as soluções de CEPA

Tratamentos	Composição
Água	30 ml de água
50 μ M de CEPA (em água)	30 ml de água + 30 μ l de CEPA 50 mM
100 μ M de CEPA (em água)	30 ml de água + 30 μ l de CEPA 100 mM
500 μ M de CEPA (em água)	30 ml de água + 30 μ l de CEPA 500 mM
1000 μ M de CEPA (em água)	30 ml de água + 30 μ l de CEPA 1000 mM
PEG (- 0,6 MPa)	30 ml de - 0,6 MPa
50 μ M de CEPA (- 0,6 MPa)	30 ml de - 0,6 MPa + 30 μ l de CEPA 50 mM
100 μ M de CEPA (- 0,6 MPa)	30 ml de - 0,6 MPa + 30 μ l de CEPA 100 mM
500 μ M de CEPA (- 0,6 MPa)	30 ml de - 0,6 MPa + 30 μ l de CEPA 500 mM
1000 μ M de CEPA (- 0,6 MPa)	30 ml de - 0,6 MPa + 30 μ l de CEPA 1000 mM

3.5 Efeito da inibição da ação do etileno no crescimento radicular em condições de estresse osmótico

Sementes germinadas de Mt e dgt foram colocadas em caixas Gerbox pretas com 5 folhas de papel toalha comercial mais uma folha de papel de filtro embebidos com diversas concentrações de STS (0, 10, 50, 100 e 500 μ M) em água e em solução de PEG com potencial osmótico de - 0,6 MPa.

A solução de 0,02M de STS foi feita através da mistura dos reagentes tiosulfato de sódio 0,1M (15,8 g/L) e nitrato de prata 0,1M (17 g/L) na proporção 1:4. Como a molaridade da solução de STS é baixa não foi possível a adição de somente 30 μ l da solução. Portanto foram adicionados diferentes volumes da solução de STS para cada concentração desejada (tabela 3).

Após cinco dias, determinou-se o comprimento das raízes.

Tabela 3 - Memória de cálculo para as soluções de STS

Tratamentos	Composição
Água	30 ml de água
10 μ M de STS (em água)	30 ml de água + 45 μ l de STS 0,02 M
50 μ M de STS (em água)	30 ml de água + 225 μ l de STS 0,02 M
100 μ M de STS (em água)	30 ml de água + 450 μ l de STS 0,02 M
500 μ M de STS (em água)	30 ml de água + 2,25 ml de STS 0,02 M
PEG (- 0,6 MPa)	30 ml de - 0,6 MPa
10 μ M de STS (- 0,6 MPa)	30 ml de - 0,6 MPa + 45 μ l de STS 0,02 M
50 μ M de STS (- 0,6 MPa)	30 ml de - 0,6 MPa + 225 μ l de STS 0,02 M
100 μ M de STS (- 0,6 MPa)	30 ml de - 0,6 MPa + 450 μ l de STS 0,02 M
500 μ M de STS (- 0,6 MPa)	30 ml de - 0,6 MPa + 2,25 ml de STS 0,02 M

3.6 Efeito da inibição do ABA no crescimento radicular em condições de estresse osmótico

Sementes germinadas de *Mt*, *dgt*, *Nr* e *epi* foram colocadas em caixas Gerbox pretas com 5 folhas de papel toalha comercial mais uma folha de papel de filtro embebidas com diversas concentrações de fluridone (0, 5, 10, 100 e 500 μ M) em água e em solução de PEG com potencial osmótico de - 0,6 MPa. A fim de não alterar o volume já determinado de 30 ml de solução tratamento em cada Gerbox, foram feitas soluções estoques de fluridone de modo a adicionar somente 30 μ l destas para se obter a concentração desejada de fluridone (tabela 4).

Após cinco dias, determinou-se o comprimento das raízes com o auxílio de um paquímetro.

Tabela 4 - Memória de cálculo para as soluções de fluridone

Tratamentos	Composição
Água	30 ml de água
5 μ M de fluridone (em água)	30 ml de água + 30 μ l de fluridone 5 mM
10 μ M de fluridone (em água)	30 ml de água + 30 μ l de fluridone 10 mM
100 μ M de fluridone (em água)	30 ml de água + 30 μ l de fluridone 100 mM
500 μ M de fluridone (em água)	30 ml de água + 30 μ l de fluridone 500 mM
PEG (- 0,6 MPa)	30 ml de - 0,6 MPa
5 μ M de fluridone (- 0,6 MPa)	30 ml de - 0,6 MPa + 30 μ l de fluridone 5 mM
10 μ M de fluridone (- 0,6 MPa)	30 ml de - 0,6 MPa + 30 μ l de fluridone 10 mM
100 μ M de fluridone (- 0,6 MPa)	30 ml de - 0,6 MPa + 30 μ l de fluridone 100 mM
500 μ M de fluridone (- 0,6 MPa)	30 ml de - 0,6 MPa + 30 μ l de fluridone 500 mM

3.7 Análise dos resultados

Os resultados foram avaliados por meio de gráficos e da comparação de médias para as quais foram calculados os respectivos erros padrões.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da regulação hormonal múltipla do crescimento sob estresse osmótico

Ao se submeter plântulas de diferentes genótipos de tomateiro a diferentes potenciais osmóticos, pôde se observar que baixos potenciais inibem mais o caule do que a raiz (Figura 1), corroborando observações anteriores em outras espécies (SHARP; DAVIES, 1979).

Na raiz, verifica-se que quanto menor o potencial osmótico, menor é o comprimento. Entretanto, o potencial osmótico de $-0,6$ MPa, parece ter favorecido o crescimento radicular no genótipos MT (Figuras 1A e 1B), *dgt* (Figuras 1E e 1F) e em menor extensão em *epi* (Figuras 1I e 1J). Isso não ocorre com o genótipo *sit* (Figuras 1C e 1D) e, no caso de *Nr*, embora estresse hídrico moderado ($-0,6$ MPa) não tenha prejudicado muito o crescimento das raízes, esse foi muito inferior ao controle água (Figuras 1G e 1H). Peres; Kerbauy e Barriguelli (1998), em experimento envolvendo a incubação de raízes de uma espécie de orquídea em meio de cultura com diferentes potenciais de água, verificaram que raízes submetidas a um estresse hídrico moderado cresceram mais que aquelas submetidas a um potencial de água elevado. Esse fenômeno também foi observado por Spollen et al., (1993) em raízes primárias de diversas espécies, o que ajudou o estabelecimento de plântulas sob condições de baixa disponibilidade de água.

A raiz do mutante *sit* teve a maior inibição, como pode ser observado na figura 1C E 1D. Como *sit* apresenta baixo nível endógeno de ABA, sugere-se que o ABA seja necessário para o crescimento radicular sob estresse hídrico, conforme já proposto por Saab et al. (1990) e Sharp et al. (1994). Sendo assim, pode se especular que nos demais genótipos, o maior crescimento radicular em potencial de $-0,6$ MPa seja devido, pelo menos em parte, a um acúmulo de ABA. De fato, diversos autores já demonstraram que o conteúdo endógeno de ABA cresce em raízes sob estresse hídrico. Ribaut e Pilet (1991) verificaram que o estresse hídrico induziu a um significativo acúmulo ABA em raízes de milho e Peres; Kerbauy e Barriguelli (1998)

observaram que em orquídea, o nível de ABA na raiz apresentou uma correlação negativa ($r = - 0,99$) com o conteúdo relativo de água nesses órgãos. Uma vez que há uma correlação perfeita entre conteúdo de ABA e estresse osmótico, conclui-se que altos níveis de ABA endógenos podem estar relacionados ao mesmo tempo com dois processos antagônicos, ou seja, com a indução (em estresse hídrico moderado) e a inibição (estresse hídrico severo) do crescimento radicular. Tal paradoxo sugere que embora o aumento no nível endógeno de ABA possa ser condição necessária para o crescimento radicular sob estresse hídrico, não é condição suficiente.

O mutante *Nr*, o qual é insensível a etileno, em potencial de -0,6 MPa apresentou crescimento radicular alto, entretanto em água o crescimento radicular foi mais alto ainda (Figura 1G). Ao se comparar o crescimento de *Nr* em água com os demais genótipos nesse mesmo tratamento, pode - se inferir que o etileno é um dos principais inibidores do crescimento da raiz. Corroborando isso, observou-se que o mutante *epi*, o qual apresenta superprodução de etileno, apresentou pequeno crescimento em todos os potenciais, inclusive na água (Figura I). Stenlid (1982) já afirmava que o etileno é o principal inibidor do crescimento de raízes e Whalen e Feldman (1988) observaram que a aplicação de etileno diminuía o crescimento radicular de raízes primárias de milho. Esses resultados parecem indicar que o efeito do ABA na promoção do crescimento de raízes de tomateiro, discutido anteriormente, é justamente inibir o etileno, conforme já demonstrado por Spollen et al. (2000) para raízes de milho. Esses autores observaram que sob condições de estresse hídrico, plântulas deficientes em ABA apresentavam maior produção de etileno e esse efeito era prevenido com a aplicação de ABA, juntamente com a retomada do crescimento radicular.

Figura 1 – Efeito do estresse osmótico no comprimento de raízes e caules (hipocótilos) de tomateiro cultivar Micro-Tom (MT) e dos mutantes sitiens (*sit*), diagetropica (*dgt*), Never ripe (*Nr*) e epinastic (*epi*).

Antes mesmo dos trabalhos de Spollen et al. (2000), já se tinha uma idéia de que o ABA é necessário para a inibição do etileno, uma vez que Tal et al. (1979) demonstraram que o mutante de tomateiro *flacca*, que apresenta baixo nível endógeno de ABA, contém alto conteúdo endógeno de auxina e de etileno. Nesse contexto, é interessante notar que mutante *sit*, o qual apresenta baixo nível endógeno de ABA, apresentou raízes pequenas e mais grossas sob baixo potencial osmótico (Figura 1D). O engrossamento de raízes é uma resposta típica da aplicação de etileno exógeno ou de substâncias indutoras da biossíntese desse hormônio, como é o caso de altas concentrações de auxina.

Por outro lado, o baixo crescimento radicular observado no mutante *dgt*, que é insensível a auxina (Figuras 1E e 1F), em todos os tratamentos confirmou a hipótese proposta por Pilet e Saugy (1987) de que a auxina também é essencial para o crescimento radicular, tanto em condições ótimas de suprimento de água, como sob estresse hídrico.

Através dos resultados acima apresentados pode-se concluir que o acúmulo de ABA é necessário para que a raiz cresça em condições de estresse hídrico, possivelmente atuando como inibidor do etileno. Também foi discutido que é necessário o acúmulo de auxina para o crescimento radicular, embora esse hormônio leve a produção do inibidor etileno. Como ABA e auxina são promotores do crescimento radicular e têm efeitos contrários no “status” do etileno endógeno, uma hipótese interessante seria de que o crescimento radicular é controlado por um balanço ABA/IAA endógeno, conforme já sugerido por Peres; Kerbauy e Barriguelli (1998). Esse balanço teria um ponto ótimo quando a auxina atuaria somente como um indutor do crescimento radicular, tendo seu efeito deletério na produção de etileno minimizado, graças a ação do ABA. Se tal hipótese estiver correta, o efeito deletério do etileno no crescimento radicular sob estresse osmótico dependerá do balanço ABA/IAA endógeno, o que foi testado, conforme relatado abaixo.

4.2 Efeito da adição de etileno no crescimento de raízes com diferentes balanços ABA/IAA ou respostas a ele

O efeito da adição de etileno em diferentes balanços ABA/IAA foi testado adicionando o ácido cloro-etil-fosfônico (CEPA), uma substância liberadora desse hormônio, em raízes de MT, *dgt* e *sit*. Desse modo, considerando-se MT como controle, o mutante *sit* representa um balanço ABA/IAA baixo, já que é defectivo para produção de ABA. Embora *dgt* não seja um mutante no metabolismo, mas sim na sensibilidade a IAA, ele pode ser considerado como representante de um balanço ABA/IAA alto, já que é pouco sensível a IAA. Pode-se observar através das figuras 2A e 3, que a adição do etileno inibiu profundamente o crescimento radicular em água. A inibição tendeu a ser menor no mutante *dgt*, o que sugere que quando o balanço é favorável ao ABA, o efeito deletério do etileno tende a ser menor. Por outro lado, um baixo balanço ABA/IAA, representado pelo mutante *sit* está coerentemente correlacionado com uma maior inibição do crescimento radicular pela aplicação de etileno (Figura 2A).

Figura 2 – Efeito da aplicação de CEPA (liberador de etileno) sobre o comprimento de raízes em água (A) e sob estresse osmótico moderado (B) em MT e nos mutantes *sit* e *dgt*.

Figura 3 – Aspecto das plântulas de MT, *sit* e *dgt* em água e em potencial de $-0,6$ Mpa nas concentrações de 0 e 500 µM de CEPA

Em baixo potencial osmótico (Figura 2B), o efeito inibitório do etileno sobre o crescimento radicular foi mais pronunciado. Em MT o crescimento radicular sob potencial de $-0,6$ MPa teve uma queda acentuada com a aplicação de 50 µM de CEPA, o que não ocorreu em água. Mesmo nestas condições de estresse hídrico o genótipo com balanço favorável a ABA (*dgt*) tendeu a um menor efeito inibitório do etileno (Figuras 2B e 3).

Esses resultados sugerem fortemente que o crescimento radicular sob estresse hídrico depende do balanço ABA/IAA, o qual modula a resposta ao etileno. Contudo, uma questão que se levanta é se certa quantidade de etileno não seria necessária para o crescimento radicular. Razões para levantar tal hipótese vêm do fato do etileno estar intimamente relacionado com a capacidade das plantas de responderem a fatores de estresse biótico e abiótico (MORGAN; MALCOLM, 1997) e com o fato do etileno poder ter um efeito tanto positivo quanto negativo no crescimento de órgãos (ROBBINS; KAYS; DIRR, 1983; GENEVE; HEUSER, 1983).

4.3 Efeito da inibição da ação do etileno no crescimento radicular em condições de estresse osmótico

Como visto anteriormente, o mutante *Nr*, o qual é insensível a etileno, não apresentou um maior crescimento radicular sob estresse hídrico. Esse resultado levanta a hipótese de que certa quantidade de etileno seria necessária para o crescimento radicular nessas condições. Desse modo, o efeito da inibição do etileno no crescimento de raízes em condições de estresse osmótico foi avaliado através da aplicação de um inibidor da ação do etileno (STS) em MT e em *dgt*. Pode-se observar que em MT à medida que se diminui o etileno (aumento da concentração de STS) há uma maior diferença entre o crescimento em H₂O e em – 0,6 MPa (Figuras 4A e 5). Isso sugere que, embora o etileno possa ser um inibidor do crescimento radicular, uma dose mínima é necessária quando estas estão sob estresse hídrico. De fato, Konings & Jackson (1979 apud FELDMAN, 1984), já haviam demonstrado que a resposta das raízes a aplicação de etileno exógeno depende do teor de etileno endógeno, sugerindo que existe um nível endógeno ótimo de etileno requerido nas raízes das plantas para seu crescimento. Tal requerimento de etileno parece não ser necessário quando o material é insensível a IAA (*dgt*), sugerindo que estímulo ao crescimento por etileno seja via auxina (figuras 4B e 5).

Figura 4 – Efeito de um inibidor da ação de etileno (STS) no comprimento de raízes com e sem estresse osmótico em MT (A) e no mutante *dgt* (B)

Figura 5 – Aspecto de plântulas de MTe *dgt* em água e em potencial de – 0,6 MPa em diferentes concentrações de STS

4.4 Efeito da inibição do ABA no crescimento radicular em condições de estresse osmótico

O inibidor de ABA fluridone foi aplicado nos mutantes hormonais com o objetivo de diminuir ABA nas raízes, com isso diminuindo o balanço ABA/IAA (figura 6). A diferença entre as raízes crescidas em água e aquelas crescidas em condições de baixo potencial osmótico (-0,6 MPa) é que embora o balanço ABA/IAA seja o mesmo em ambas condições, ele é alcançado com níveis mais baixos de ambos os hormônios em água e altos níveis dos hormônios em condições de estresse hídrico, uma vez que tanto o nível endógeno de ABA quanto de IAA aumentam sob esse estresse (RIBAUT; & PILET, 1994)

Figura 6 - Efeito de um inibidor de ABA (fluridone) no comprimento de raízes sem estresse osmótico (A) e com estresse osmótico (B) em MT e nos mutantes *dgt*, *epi* e *Nr*

A adição de fluridone diminui o teor de ABA e tem, portanto, o efeito de abaixar o balanço ABA/IAA, sendo esse efeito mais acentuado em condições de baixo potencial osmótico já que o nível de ABA necessário para o balanço ideal é alto. Em água fica claro que à medida que o balanço ABA/IAA diminui, há uma inibição do crescimento radicular, sendo esta menos acentuada em *Nr* e em *dgt*, os quais são mutantes pouco sensíveis a etileno e auxina, respectivamente (Figuras 6A e 7). Uma interpretação simples para esse resultado é que a diminuição no nível endógeno de ABA age menos pela alteração de seu nível absoluto do que pelo deslocamento do balanço ABA/IAA para auxina, o que é pouco efetivo no mutante *dgt*. Por outro lado, o efeito final do

balanço deletério voltado para auxina seria aumentar a ação inibitória do etileno, o que é igualmente pouco efetivo no mutante *Nr*. A inibição do crescimento radicular em $-0,6$ MPa (Figura 6B) foi muito acentuada, dificultando a distinção entre os genótipos, mas de modo geral, os resultados seguiram a mesma tendência observada em água.

Em todos os genótipos, tanto em água quanto em baixo potencial hídrico, altas concentrações de fluridone (100 e 500 μ M) provocaram ramificações nas raízes, interferindo, portanto, na medição do comprimento radicular. Como tal resultado não é observado nos mutantes com baixo nível endógeno de ABA (Figura 1D), sugere-se que seja um efeito colateral do fluridone em si. Nesse sentido, é interessante observar que recentemente descobriu-se que um inibidor de ramificação pelo menos de caules é derivado da clivagem de carotenóides (BOOKER et al., 2004), os quais estariam obviamente em baixos níveis em raízes tratadas com fluridone.

Figura 7 – Aspectos de plântulas de MT *dgt*, *epi* e *Nr* em água e em potencial de – 0,6 MPa em diferentes concentrações de fluridone

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos conclui-se que:

- Em condições de déficit hídrico moderado há um aumento do crescimento radicular quando comparado com o crescimento em condições normais de suprimento de água.
- O balanço ABA/IAA, o qual modula a resposta ao etileno, é possivelmente o regulador no crescimento radicular sob estresse hídrico.
- Existe um balanço ABA/IAA ideal, o qual proporcional o maior crescimento sob estresse hídrico. Quando este balanço é aumentado ou diminuído, por qualquer motivo, há uma diminuição no crescimento radicular ou mesmo uma inibição deste crescimento.

Figura 8 – Uma hipótese para a modulação do crescimento do sistema radicular pelo balanço entre auxina e ácido abscísico

Têm-se como perspectivas:

- Obtenção de duplos mutantes hormonais a fim de melhor elucidar a interação entre os hormônios ABA, Auxina e Etileno no controle do crescimento radicular sob condições de estresse hídrico.

REFERÊNCIAS

ABELES, F.B. **Ethylene in Plant Biology**. New York: Academic Press, 1973. 302p.

ASPINALL, D.; PALEG, L. G.; ADDICOTT, F. T. Abscisin II and some hormone-regulated plant responses. **Australian Journal of Biology Science**, Melbourne, Australia, v.20, p.869-882, 1967.

BENSEN, R. J. ; ZEEVAART, J. A. D. Comparison of ent-kaurene synthetase A and B activities in cell-free extracts from young tomato fruits of wild-type and gib-1, gib-2 and gib-3 tomato plants. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 9, p.237-242, 1990.

BERTELL, G.; BOLANDER, E.; ELIASSON, L. Factors increasing ethylene production enhance the sensitivity of root growth to auxins. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen v.79, p.255-258, Jun. 1990.

BERTELL, G.; ELIASSON, L. Cytokinin effects on root growth and possible interactions with ethylene na indole-3-acetic acid. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.84, p.255-261, Feb. 1992.

BISHOP, G. J.; NOMURA, T.; YOKOTA, T.; HARRISON K.; NOGUCHI, T.; FUJIOKA, S.; TAKATSUTO, S.; JONES, J. D. G.; KAMIYA, Y. The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. **Proceedings of National Academy of Science**, Washington, v.96, p.1761-1766, 1999.

BOOKER, J.; AULDRIDGE, M.; WILLS, S.; McCARTY, D.; KLEE, H.; LEYSER, O. MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for synthesis of a novel plant signaling molecule. **Current Biology**, London, v.14, p.1232-1238, Jul. 2004.

BURBIDGE, A.; GRIEVE, T. M.; JACKSON, A.; THOMPSON, A.; McCARTY, D. R.; TAYLOR, I. B. Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize *Vp14*. **Plant Journal**, Oxford, v.17, p.427-431, Feb.1999.

CARY, A.J.; LIU, W.; HOWELL, S.H. Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.107, p.1075-1082, Apr. 1995.

CLARK, D.G.; GUBRIUM, E.K.; BARRETT, J.E.; NELL, T.A.; KLEE, H.J. Root formation in ethylene-insensitive plants. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.121, p.53-59, Sept. 1999.

COLEMAN, W.K.; HUXTER, T.J.; REID, D.M.; THORPE, T.A. Ethylene as an endogenous inhibitor of root regeneration in tomato leaf disc cultures in vitro. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.48, p.519-525, 1980.

FELDMAN, L.J. Regulation of root development. **Annual Review of Plant Physiology**. Palo Alto, v.35, p.223-242, Jun. 1984.

FU, X.; HARBERD, N.P. Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. **Nature**, London v. 421, p.740-743, Feb. 2003.

FUJINO, D. W.; BURGER, D. W.; YANG, S. F.; BRADFORD, K. J. Characterization of an ethylene overproducing mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cultivar VFN8). **Plant Physiology**, Minneapolis, v.88, p.774-779, 1988.

GABELMAN, W. H.; GERLOFF, G. C.; SCHETTINI, T.; COLTMAN, R. Genetic variability in root systems associated with nutrient acquisition and use. **HortScience**, Alexandria, v.21, p.971-973, 1986.

GAITHER, D. H.; LUTZ, D. H.; FORRENCE, L. E. Absciscic acid stimulates elongation of excised pea root tips. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.55, p. 9748-949, May, 1975.

GENEVE, R.L.; HEUSER, C.W. The relationship between ethephon and auxin on adventitious root initiation in cuttings of *Vigna radiata* (L.) R. Wilcz. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.108, p.330-333, 1983.

GERTMAN, E.; FUCHS, Y. Effect of absciscic acid and its interactions with other plant hormones on ethylene production in two plant systems. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.50, p.194-195, Sept. 1972.

GRAVES, W.R.; GLADON, R.J. Water stress, endogenous ethylene and *Ficus benjamina* L. leaf abscission. **HortScience**, Alexandria, v.20, p.273-275, 1985.

HEDDEN, P.; PROEBSTING, W.M. Genetic analysis of gibberellin biosynthesis. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.119, p.365-370, Feb. 1999

HICKS, G. R.; RAYLE, D. L.; LOMAX, T. L. The diageotropica mutant of tomato lacks high specific activity auxin binding sites. **Science**, Washington, v.245, p.52-54, 1989.

KELLY, M.O.; BRADFORD, K. J. Insensitivity of the diageotropica tomato mutant to auxin. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.82, p.713-717, 1986.

KOKA, C. V.; CERNY, R. E.; GARDNER, R. G.; NOGUCHI, T.; FUJIOKA, S.; TAKATSUTO, S.; YOSHIDA, S.; CLOUSE, S. D. A putative role for the tomato genes DUMPY and CURL-3 in brassinosteroid biosynthesis and response. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.122, p.85-98, 2000.

KOORNNEEF, M.; BOSMA, T. D. G.; HANHART, C. J.; VAN DER VEEN, J. H.; ZEEVAART, J. A. D. The isolation and characterization of gibberellin-deficient mutants in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.80, p.852-857, 1990.

INADA, S.; TOMINAGA, M.; SHIMMEN, T. Regulation of root growth by gibberellin in *Lemna minor*. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v.41, n.6, p.657-665, 2000.

JONES, M. G. Gibberellins and the *procera* mutant of tomato. **Planta**, Berlin, v.172, p.280-284, 1987.

LIMA, J. E.; CARVALHO, R. F.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A.; PERES, L. E. P. Micro-MsK: a tomato genotype with miniature size, short life cycle and improved in vitro shoot regeneration. **Plant Science**, Limerick, v.167, p.753-757, 2004.

MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYATUV, S.; SHALEV, G.; ASHRI, A.; ELKIND, Y.; LEVY, A. A new model system for tomato genetics. **Plant Journal** Oxford, v.12, p.1465-1472, Dec.1997.

McKEON, T.A.; FERNÁNDEZ-MACULET, J.C.; YANG, S-F. Biosynthesis and metabolism of ethylene. In: DAVIES, P. J. (Ed.) **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer Acad. Publi., 1995. p. 118 - 139.

MORGAN, P.W.; MALCOLM, C.D. Ethylene and plant responses to stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, p.620-630, Jul.1997.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; MORAES, J. A. P. V.; BURITY, H. A. Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relações hídricas em aceroleira submetidas a déficit de água. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.13, n.1, p.75-87, 2001.

NOOR SALEH, A. The effect of kinetin on the idoleacetic acid level and idoleacetic acid oxidase activity in roots of young plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.51, p.399-401, 1981.

PERES, L.E.P. Use of the miniature tomato cultivar (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) as a repository of mutations useful for plant development studies. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISOLOGIA VEGETAL, 8., 2001, Ilhéus, **Resumos...** Ilhéus: s. ed. 2001, p. 65.

PERES, L.E.P.; KERBAUY, G.B. Controle hormonal do desenvolvimento das raízes. **Universa**, Brasília, v.8, p.181-195, Set. 2000.

PERES, L.E.P.; KERBAUY, G.B.; BARRIGUELLI, G.C. Effects of water stress on the endogenous IAA and ABA levels and growth of excised roots *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BOTÂNICA DE SÃO PAULO, 12., 1998. Piracicaba, **Anais...** Piracicaba, 1998. p.132.

PERES, L. E. P.; MAJEROWICZ, N.; KERBAUY, G. B. Dry matter partitioning differences between shoots and roots in two contrasting genotypes of orchids and their relationship with endogenous levels of auxins, cytokinins and abscisic acid . **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v.13, p.185-195, 2001.

PERES, L. E. P.; CARVALHO, R. F.; NUNES, L. E. P.; LIMA, J. E.; PIOTO, F.A. A collection of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom) mutants useful to study the multiple hormonal control of plant development. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT GROWTH REGULATOR, 18., 2004, Canberra, **Proceedings....s. ed.** Canberra, 2004.

PILET, P.E. Some cellular and molecular properties of abscisic acid: its particular involvement in growing plant roots. **Cellular and Molecular Life Science**, Basel, v.54, p.851–865, Aug.1998.

PILET, P.E.; SAUGY, M. Effect on root of endogenous and applied IAA and ABA. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.83, p.33-38, Jan. 1987.

PILET, P.E.; ELLIOTT, M.C.; MOLONEY, M.M. Endogenous and exogenous auxin in the control of root growth. **Planta**, Berlin, v.146, n.4, p.405-408, sept. 1979.

PHATAK, S.C.; JAWORSKI, C.A.; LIPTAY, A. Flowering and adventitious root growth of tomato cultivars as influenced by ethephon. **HortScience**, Alexandria, v.16, p.181-182, 1981.

RADEMACHER, W. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.51, p.501-531, 2000.

RASHOTTE, A.M.; CHAE, H.S.; MAXWELL, B.B.; KIEBER, J.J. The interaction of cytokinin with other signals. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.123, p.184-194, Feb. 2005.

RIBAUT, J-M; PILET, P. E. Effect of water stress on growth osmotic potential and abscisic acid content of maize roots. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.81, p.156-162, 1991.

RIBAUT, J. M.; PILET, P. E. Water stress and indol-3yl-acetic acid content of maize roots. **Planta**, Berlin, v.193, p.502-507, 1994.

ROBBINS, J.A.; KAYS, S.J.; DIRR, M.A. Enhanced rooting of wounded mung bean cuttings by wounding and ethephon. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.108, p.325-329, 1983.

SAAB, I.N.; SHARP, Q. E.; PRITCHARD, J.; VOETBERG, G.S. Increased endogenous abscisic acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings of low water potentials. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.93, p.1329-1336, 1990.

SAKAI, H.; HONMA, T.; AOYAMA, T.; SATO, S.; KATO, T.; TABATA, S.; OKA, A. *Arabidopsis* ARR1 is a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. **Science**, Washington, v.294, p.1519-1521, 2001.

SHARP, R.E. Interaction with ethylene: changing views on the role of ABA in root and shoot growth responses to water stress. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.25, p.211-222, 2002.

SHARP, R.E.; DAVIES, W.J. Solute regulation and growth by roots and shoots of water-stressed maize plants. **Planta**, Berlin, v. 147, p.43-49, 1989.

SHARP, R.E.; SILK, W.K.; HSIAO, T.C. Growth of maize primary roots at low water potentials. I. Spatial distribution of expansive growth. **Plant Physiology**, Minneapolis v.87, p.50-57, 1988.

SHARP, R. E.; WU, Y.; VOETBERG, G. S.; SAAB, I. N.; LENOBLE, M. E. Confirmation that abscisic acid accumulation is required for maize primary root elongation at low water potentials. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.45, p.1743-1751, 1994.

SHIMIZU, R.; IWAMURA, H.; MATSUBARA, S.; FUJITA, T. Development of s-triazine anticytokinins and their quantitative structure-activity relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.37, p. 236-240, 1989.

SKOOG, F.; SCHMITZ, R.Y.; BOCK, R.M.; HECHT, S.M. Cytokinin antagonists: synthesis and physiological effects of 7-substituted-3-methylpyrazolo[4,3-d]pyrimidines. **Phytochemistry**, New York, v.12, p.25-37, 1973.

SKOOG, F.; SCHMITZ, R.Y.; HECHT, S.M.; FRYE, R.B. Anticytokinin activity of substituted pyrrolo [2,3 d]pyrimidines. **Proceedings of National Academy of Science**, Washington, v.72, p. 3508-3512, 1975.

SPOLEN, W.G.; LENOBLE, M.E.; SAMUELS, T.D.; BERNSTEIN, N.; SHARP, R.E. Absciscic acid accumulation maintains maize primary roots elongation at low water potentials by restricting ethylene production. **Plant Physiology**, Minneapolis v.122, p.967-976, 2000.

SPOLEN, W.G.; SHARP, R.E.; SAAB, I.N.; WU, Y. Regulation of cell expansion in roots and shoots at low water potentials. In: SMITH, J.A.C.; GRIFFITHS, H. (Ed.). **Water deficits: Plant responses from cell to community**. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1993. p.37-52.

STENLID, G. Cytokinins as inhibitors of root growth. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.56, p.500-506, 1982.

STEVENS, M. A.; RICK, C. M. Genetic and breeding In: ATHERTON, J. G. & RUDICH, J. (Eds.) **The tomato crop: a scientific basis for improvement**. London: Chapman and Hall, 1986. p. 35-109.

STREET, H.E. Factors influencing the initiation and activity of meristems in roots. In: WJ Whittington (Ed.) **Root growth**. London: Butterworths, 1969. p. 20– 41.

TAL, M.; IMBER, D.; EREZ, A.; EPSTEIN, E. Abnormal stomatal behavior and hormonal imbalance in flacca, a wilted mutant of tomato. V. Effect of abscisic acid on indoleacetic acid metabolism and ethylene evolution. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.63, p.1044–1048, 1979.

TANIMOTO, E. Gibberellin regulation of root growth with change in galactose content of cell walls in *Pisum sativum*. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v.29, p.269-280, Mar. 1988.

TAYLOR, I. B.; BURBIDGE, A.; THOMPSON, A. J. Control of abscisic acid synthesis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.51, p.1563-1574, 2000.

TORREY, J.G. Root hormones and plant growth. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.27, p.435-459, Jun. 1976.

VAN STADEN, J.; DAVEY, J.E. The synthesis, transport and metabolism of endogenous cytokinins. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v.2, p.93-106, 1979.

VILLELA, F.A.; FILHO, L.D.; SIQUEIRA, E.L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.26, n.11/12, p.1957-1968, 1992.

WERNER, T.; MOTYKA, V.; STAD, M.; SCHMULLING, T. Regulation of plant growth by cytokinin. **Proceedings of National Academy of Science**, Washington, v.98, p.10487-10492, 2001.

WHALEN, M.C.; FELDMAN, L.J. The effect of the ethylene on root growth of *Zea mays* seedlings. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.66, p.719-723, 1988.

WIKINSON, J. Q.; LANAHAHAN, M. B.; YEN, H-C; GIOVANNONI, J. J.; KLEE, H. J. An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by Never-ripe. **Science**, Washington, v.270, p.1807-1809, 1995.

YAXLEY, J.R.; ROSS, J.J.; SHERRIFF, L.J.; REID, J.B. Gibberellin biosynthesis and root development in pea. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.125, p.627-633, Feb. 2001.